

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ASSOCIAÇÃO DE CIPIONATO DE ESTRADIOL E GNRH NO CONTROLE DA  
OVULAÇÃO EM VACAS TAURINAS E SINTÉTICAS**

**Gabriella dos Santos Velho**

**PORTO ALEGRE**

**2023**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ASSOCIAÇÃO DE CIPIONATO DE ESTRADIOL E GNRH NO CONTROLE DA  
OVULAÇÃO EM VACAS TAURINAS E SINTÉTICAS**

**Autora: Gabriella dos Santos Velho**

**Dissertação apresentada como requisito  
parcial para a obtenção do grau de Mestre  
em Ciências Veterinárias na Área de  
Fisiopatologia da Reprodução de Bovinos.**

**Orientadora: Dra. Monique Tomazele  
Rovani**

**Coorientador: Dr. André Gustavo Cabrera  
Dalto**

**PORTO ALEGRE**

**2023**

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

CIP - Catalogação na Publicação

dos Santos Velho, Gabriella  
ASSOCIAÇÃO DE CIPIONATO DE ESTRADIOL E GNRH NO  
CONTROLE DA OVULAÇÃO EM VACAS TAURINAS E SINTÉTICAS /  
Gabriella dos Santos Velho. -- 2023.  
44 f.

Orientadora: Monique Tomazele Rovani.

Coorientador: André Gustavo Cabrera Dalto.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto  
Alegre, BR-RS, 2023.

1. Reprodução Bovina. 2. Fisiologia Reprodutiva  
Bovina. 3. IATF. 4. Indutor de Ovulação. 5. GnRH. I.  
Tomazele Rovani, Monique, orient. II. Gustavo Cabrera  
Dalto, André, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Gabriella dos Santos Velho

ESTRATÉGIAS PARA MAIOR CONTROLE DA OVULAÇÃO EM BOVINOS

Aprovada em 28 de fevereiro de 2023

APROVADO POR:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Monique Tomazele Rovani

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Orientadora e Presidente da Comissão

---

Dra. Juliana Germano Ferst

Membro da Comissão  
Universidade de São Paulo (USP)

---

Dr. Luiz Francisco Machado Pfeifer

Membro da Comissão  
EMPRAPA, Rondônia

---

Dr. Gustavo Desire Antunes Gastal

Membro da Comissão  
INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria) – La Estanzuela, Uruguay

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus, pela vida e oportunidade de continuar estudando.

À minha família e ao meu namorado, pelo apoio incondicional.

À minha orientadora Monique Rovani e Coorientador André Dalto. Sou muito grata pelos ensinamentos, oportunidades, conversas e mates.

Ao Setor de Grandes Ruminantes (SGR), em que tive oportunidade de permanecer durante o período de graduação e pós-graduação. Palavras não são suficientes para agradecer a esse setor que me acolheu tão bem e me ensinou tanto.

Aos meus colegas de pós-graduação, pelo companheirismo.

Às propriedades, onde ocorreram os experimentos, sem elas este estudo não seria possível. E, além disso, aos proprietários e veterinários responsáveis pelas propriedades.

Às empresas parcerias pelos medicamentos para a realização deste estudo.

À UFRGS e à Capes, pelo ensino de qualidade e pelo apoio financeiro.

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo verificar o impacto do tratamento com GnRH 34 horas após a remoção do dispositivo intravaginal de progesterona (DIV) na ocorrência de ovulação, morfologia do corpo lúteo e concentração de progesterona (P4). Além disso, avaliar se o tratamento implicaria em um incremento na taxa de concepção em vacas taurinas e sintéticas. Para isto, foi realizado um Experimento Piloto, em que vacas de raças leiteiras foram sincronizadas com protocolo de 8 dias à base de estradiol e progesterona (P4). No D9, as vacas foram distribuídas nos grupos conforme o diâmetro do folículo pré-ovulatório (FPO) para receber GnRH (25 ug; Lecirelina); ou somente o CE (Grupo Controle). Observou-se 100% de ovulação no grupo GnRH (4/4) e 75% no grupo Controle (3/4;  $p=0,2$ ) até 72 h após remoção do DIV, e a concentração sérica de P4 diferiu entre os dias avaliados (D5,5 e D12 após IATF;  $p=0,005$ ), mas não em relação ao tratamento ( $p=0,2$ ). No Experimento 1, a fim de testar o tratamento com maior número de animais, foram sincronizadas vacas sintéticas da raça Brangus, com o protocolo descrito anteriormente adicionado de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG; 300 UI) na retirada do DIV. Observou-se 95,8% de ovulação no grupo GnRH (23/24) e 80,9% no grupo Controle (17/21;  $p=0,1$ ). A concentração sérica de P4 diferiu entre grupos ( $p=0,02$ ) e os dias avaliados (D7 e D12 após IATF;  $p=0,001$ ), mas não houve interação entre grupo e dia ( $p=0,8$ ). No Experimento 2, o objetivo foi identificar o efeito do tratamento com GnRH na fertilidade de vacas taurinas de corte. Não foi observado efeito do tratamento na taxa de concepção (P/IA), sendo as taxas de P/IA de 51,6 % ( $n=184$ ) e 54,1% ( $n=246$ ) nos grupos no Controle e GnRH, respectivamente ( $p=0,2$ ). No entanto, vacas com ECC (4-4,5) do grupo GnRH tiveram maior P/IA ( $p=0,003$ ) e, vacas que manifestaram estro também tiveram maior P/IA em relação aos animais não detectados em estro (55,49% vs. 42,25%;  $p=0,03$ ). No Experimento 3, as vacas foram sincronizadas com um protocolo diferente dos demais experimentos, em que no D0 receberam 5,5mg 17b estradiol e 50mg P4 injetáveis e DIV 0,96g de P4. As vacas foram distribuídas aleatoriamente nos grupos Controle ( $n=79$ ) e GnRH ( $n=78$ ), que recebeu 25ug de Lecirelina 34h após remoção do DIV. As vacas do grupo Controle que não apresentaram estro receberam GnRH na IATF (48h após a retirada do DIV). Vacas que receberam GnRH tiveram maior P/IA comparado ao grupo Controle (67,94 e 51,79%, respectivamente;  $p=0,03$ ). Em resumo, o GnRH não proporcionou aumento na taxa de concepção em vacas taurinas e sintéticas, embora tenha incrementado significativamente a P/IA quando associado a um protocolo com 17b e progesterona

injetável. Além disso, não promoveu incremento na função luteal (morfologia e progesterona sérica).

**Palavras-chave:** Reprodução. GnRH. Bovinos. Ovulação.

## ABSTRACT

*The present study aimed to verify the impact of treatment with GnRH 34 hours after removal of the intravaginal progesterone device (IVD) on the occurrence of ovulation, corpus luteum morphology and progesterone concentration (P4). In addition, to evaluate whether the treatment would imply an increase in the conception rate in taurine and synthetic cows. For this, a Pilot Experiment was carried out, in which dairy cows were synchronized with an 8-day protocol based on estradiol and progesterone (P4). On D9, cows were assigned to groups according to preovulatory follicle (POF) diameter to receive GnRH (25 ug; Lecirelin); or just the EC (Control Group). 100% ovulation was observed in the GnRH group (4/4) and 75% in the Control group (3/4;  $p=0.2$ ) up to 72 h after IVD removal, and serum P4 concentration differed between days evaluated (D5.5 and D12 after TAI;  $p=0.005$ ), but not in relation to treatment ( $p=0.2$ ). In Experiment 1, in order to test the treatment with a larger number of animals, synthetic cows of the Brangus breed were synchronized, with the previously described protocol added with Equine Chorionic Gonadotropin (eCG; 300 IU) in the removal of the IVD. There was 95.8% ovulation in the GnRH group (23/24) and 80.9% in the Control group (17/21;  $p=0.1$ ). Serum P4 concentration differed between groups ( $p=0.02$ ) and days evaluated (D7 and D12 after TAI;  $p=0.001$ ), but there was no interaction between group and day ( $p=0.8$ ). In Experiment 2, the objective was to identify the effect of GnRH treatment on the fertility of taurine beef cows. No treatment effect was observed on the conception rate (P/AI), with P/AI rates of 51.6% ( $n=184$ ) and 54.1% ( $n=246$ ) in the Control and GnRH groups, respectively ( $p=0.2$ ). However, cows with ECC (4-4.5) from the GnRH group had higher P/AI ( $p=0.003$ ) and cows that showed estrus also had higher P/AI compared to animals not detected in estrus (55.49 % vs. 42.25%;  $p=0.03$ ). In Experiment 3, the cows were synchronized with a protocol different from the other experiments, in which on D0 they received 5.5mg injectable estradiol 17b and 50mg P4 and DIV 0.96g of P4. Cows were randomly assigned to Control ( $n=79$ ) and GnRH ( $n=78$ ) groups, which received 25ug of Lecirelin 34h after IVD removal. Cows in the Control group that did not show estrus received GnRH in TAI (48h after IVD removal). Cows that received GnRH had higher P/AI compared to the Control group (67.94 and 51.79%, respectively;  $p=0.03$ ). In summary, GnRH did not increase the conception rate in taurine and synthetic cows, although it significantly increased P/AI when associated with a protocol with 17b and injectable progesterone. Furthermore, it did not promote an increase in luteal function (morphology and serum progesterone).*

***Keywords:*** *Reproduction. GnRH. Cattle. Ovulation.*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Avaliações ovarianas do Experimento Piloto em vacas secas das raças Jersey e Holandesa tratadas com GnRH (Grupo GnRH; n=4) 34 horas após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona (DIV) ou não tratadas (Grupo Controle; n=4). A) Taxa de ovulação 0h, 36h, 48h e 72h após remoção do DIV nos Grupos Controle e GnRH (p=0,2; ns). B) Concentração sérica de progesterona dos Grupos Controle e GnRH nos dias 5,5 e 12 após IATF. ....37
- Figura 2** - Avaliações ovarianas do Experimento 1 em vacas com cria ao pé da raça Brangus tratadas com GnRH (Grupo GnRH; n=24) 34 horas após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona (DIV) ou não tratadas (Grupo Controle; n=22). A) Taxa de ovulação até 72 horas após remoção do DIV nos Grupos GnRH e Grupo Controle (p=0,1; ns). B) Diâmetro do corpo lúteo (CL) nos dias 7 e 12 após IATF nos Grupos GnRH e Controle (p=0,4; ns). C) Taxa de ovulação em 32h, 56h, 72h e 80h após a remoção do DIV (lote 3) nos Grupos Controle (n=9) e GnRH (n=10), considerando todas as vacas. Não foram observadas ovulações em 2 vacas do Grupo Controle (22,2%). ....38
- Figura 3**- Função luteal de vacas com cria ao pé da raça Brangus tratadas com GnRH (Grupo GnRH; n=12) 34 horas após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona (DIV) ou não tratadas (Grupo Controle; n=12) do Experimento 2. A) Diâmetro do CL após remoção do DIV nos Grupos GnRH e Grupo Controle (p=0,1). B) Diâmetro do corpo lúteo (CL) nos dias 11 e 12 após IATF nos Grupos GnRH e Controle (p=0,4). Experimento 1, lotes 1 e 2. A) Diâmetro do CL teve efeito positivo em relação ao dia (7 e 12; p=0,07) mas não em relação ao tratamento. B) Progesterona teve efeito positivo em relação ao dia da coleta (7 e 12; p<0,001), mas não em relação ao grupo de tratamento. ....39
- Figura 4** - Experimento 2. A) Taxa de concepção (P/IA) nos Grupos Controle e GnRH nas Fazendas A e B. B) Taxa de concepção (P/IA) nos Grupos Controle e GnRH, categorizados em Escores de Condição Corporal. C) Manifestação de estro na IATF nos Grupos Controle e GnRH. D) Taxa de concepção (P/IA) conforme manifestação de estro na IATF. ....40
- Figura 5** - Taxa de concepção (P/IA) de lotes de vacas taurinas com cria ao pé tratadas com GnRH (Grupo GnRH; n=78) 34 horas após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona (DIV) ou não tratadas (Grupo Controle; n=79) no Experimento 3. Os

animais foram sincronizados com 17B e progesterona injetável no início do protocolo.....41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Avaliações ovarianas e concentração sérica de Progesterona (Experimento 2) em vacas sintéticas de corte tratadas com GnRH (GnRH) 34h após remoção do DIV ou Controle.....	36
---	----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>14</b>
2.1 Ciclo estral.....	14
2.2 Protocolos de sincronização do ciclo estral.....	16
2.3 Hormônios utilizados na sincronização da ovulação em bovinos.....	17
2.4 Sincronização da ovulação e incremento na fertilidade em vacas de corte .....	21
<b>3 ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>23</b>
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>43</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A sincronização do ciclo estral com a utilização de hormônios exógenos foi desenvolvida e tem sido aplicada em sistemas de produção de gado de corte para facilitar a utilização da Inseminação Artificial (IA) desde a década de 40 (DAHLEN; LARSON; LAMB, 2014). Entretanto, a ampla utilização da IA em rebanhos de corte é muito recente e se deve, principalmente ao uso de protocolos que possibilitam a realização da técnica em grupos grandes de animais em um determinado momento, denominada de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF; (BÓ et al., 2016). Essa técnica tem sido utilizada como uma ferramenta para melhorar a eficiência reprodutiva em rebanhos de corte, em que protocolos de sincronização do estro foram desenvolvidos e aplicados no manejo reprodutivo das propriedades (SÁ FILHO et al., 2010). Entretanto, a técnica ainda possui algumas limitações, como a dispersão no momento da ovulação e a ocorrência de ovulação sem a expressão de estro (BÓ; CEDEÑO, 2018), que está associada a menor fertilidade.

Os protocolos de IATF mais utilizados em bovinos de corte são baseados em estradiol com inserção de dispositivo intravaginal de progesterona (DIV) no início do protocolo (CEDEÑO et al., 2021; BÓ et al., 2016; SÁ FILHO et al., 2010). Na maioria das vezes, em protocolos à base de estradiol e progesterona, as ovulações são induzidas com uma dose baixa de ciproionato de estradiol (CE), administrada no momento da retirada do DIV (BÓ; BARUSELLI, 2014). Porém, nesses protocolos com ésteres de estradiol, a ovulação é mais tardia quando comparada a protocolos que utilizam hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (D'AVILA, C.A.; MORAES, F.P.; JR, T.L.; GASPERINI, 2019a). As ovulações são observadas em média 55h e 69h após a remoção do DIV em protocolos que utilizam benzoato de estradiol (BE) e CE, respectivamente (PFEIFER et al., 2014; (PANCARCI et al., 2002). Apesar da relativa boa sincronia, há uma dispersão no momento das ovulações (48 a 96h) com o uso de CE (SALES et al., 2012). Sabe-se que a fertilidade é maior quando há uma maior sincronia entre o momento da ovulação e a deposição do sêmen no útero (DALTON et al., 2001). Portanto, essa falha na sincronia da ovulação também está associada a menor sobrevivência do embrião pós-IA e, conseqüentemente, nas baixas taxas de concepção (PUGLIESI et al., 2016).

A maioria dos protocolos para sincronização da ovulação no Brasil utilizam ésteres de estradiol por serem de custo mais baixo e induzirem a manifestação do estro (STEVENSON; TIFFANY; LUCY, 2004). Vacas com proestro mais curto antes da ovulação tiveram menores

taxas de concepção na IATF e menores concentrações de estradiol durante o período pré-ovulatório do que aquelas com proestro mais longo (BRIDGES et al., 2010). Essas evidências justificam o uso de dois indutores associados, proporcionando a ocorrência de um proestro (estradiol) e uma maior sincronia de ovulação (GnRH). Um estudo prévio do grupo demonstrou que a utilização do GnRH prévio à IATF (14h antes) proporciona um incremento na fertilidade em vacas zebuínas tratadas com CE na retirada do implante (BARBOSA et al., 2022). No referido estudo, atribui-se a maior taxa de concepção à maior sincronia da ovulação em vacas tratadas com GnRH. Entretanto, a concentração sérica de progesterona (P4) não foi avaliada. Dadas as diferenças em relação à fisiologia de *Bos taurus* e *Bos indicus*, este estudo teve como objetivo avaliar o uso de GnRH 34h após a remoção do DIV como indutor de ovulação no protocolo de IATF em vacas taurinas e sintéticas de corte, além de observar a função luteal.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Ciclo estral

O ciclo estral consiste em eventos fisiológicos que ocorrem entre períodos de receptividade sexual, e é compreendido entre um estro e o seguinte. Além disso, é categorizado conforme a frequência de ocorrência do estro durante o ano. Essas classificações são: poliéstricas, poliéstricas sazonais ou monoéstricas. Fêmeas poliéstricas, como as vacas, porcas e roedores, têm uma distribuição regular do estro durante todo o ano; as poliéstricas sazonais (éguas, ovelhas, cabras), durante determinada estação do ano. Portanto, as vacas são classificadas como poliéstricas e têm o seu ciclo dividido em: proestro, estro, metaestro e diestro. Estes estágios do ciclo também são denominados de fase folicular (proestro e estro) e fase lútea (metaestro e diestro) (SENGER, 2005).

Em bovinos, a fase folicular é relativamente curta, correspondendo a 20% do período do ciclo estral, marcada pela regressão do corpo lúteo (CL) e ocorrência da ovulação. O proestro inicia quando ocorre um declínio da progesterona (P4), resultado da luteólise que determina o início do estro. Com duração média de 2 a 5 dias, o proestro é a fase do ciclo de maior transição endócrina, pois passa da fase de dominância de P4 para período de dominância de estradiol (E2). O estro é considerado o momento do ciclo de receptividade sexual e pode ser observado em média a cada 21 dias, com uma variação de 18 a 24 dias. É considerado o dia zero do ciclo (BALL; PETERS, 2007), com duração de aproximadamente 18 horas ( $\pm 4$  a 24 horas), e a ovulação ocorre geralmente 30 horas após o início do estro, no metaestro (PTASZYNSKA, 2013).

A fase luteal é o período compreendido entre a ovulação até a regressão do CL, que corresponde a 80% do ciclo estral (SENGER, 2003). Portanto, é no metaestro que ocorre a ovulação, período em que E2 e P4 estão relativamente em concentrações baixas, pois as células foliculares que antes excretavam E2 passam a produzir P4, devido ao pico do hormônio luteinizante (LH) (BALL; PETERS, 2004). No momento da ovulação, há um rompimento dos vasos sanguíneos, resultando em uma estrutura denominada corpo hemorrágico (devido à sua aparência). Essa estrutura permanece entre 3 e 5 dias e logo perde a sua aparência hemorrágica resultando em um corpo lúteo (CL). No diestro, o CL é totalmente funcional e produz P4 em altas concentrações (SENGER, 2005; PTASZYNSKA, 2013).

A função primária da alta concentração de P4 durante a fase luteal é preparar o útero para receber o embrião, em que a P4 exerce *feedback* negativo inibindo o GnRH e o LH. No entanto, ondas foliculares continuam a crescer e regredir, sendo que cada ciclo pode ocorrer de 2 a 3 ondas (BALL; PETTERS, 2004). As duas primeiras ondas foliculares ocorrem durante a elevação da P4, no metaestro, ou durante o pico de produção no diestro. Os folículos recrutados e selecionados durante essas fases do ciclo entrarão em atresia. Entretanto, a última onda folicular, que ocorre quando ainda há P4 circulante, resulta em um folículo dominante que irá ovular quando ocorre a luteólise (SENGER, 2003). Portanto, os estágios finais do desenvolvimento folicular ocorrem em um padrão de ondas (FORTUNE; SIROIS; QUIRK, 1988) e a seleção do folículo dominante está associada a um desvio na taxa de crescimento entre o folículo dominante (8,5 mm de diâmetro) e o maior subordinado, um evento denominado divergência folicular. A divergência folicular está relacionada principalmente à expressão de receptores de LH nas células da granulosa, aumento do estradiol circulante e diminuição no FSH plasmático (GINTHER et al., 1996; MIHM et al., 2006). Os folículos atingem a capacidade ovulatória com 10 mm em raças europeias leiteiras (SARTORI et al., 2001), já em novilhas taurinas de corte, os folículos atingem essa capacidade aos 9 mm (MARTINEZ et al., 1999). Além disso, novilhas taurinas que ovulam com folículos entre 10,7 mm e 15,7 mm de diâmetro têm maior probabilidade de concepção (PERRY et al., 2007). Zebuínos e taurinos são diferentes em relação à fisiologia ovariana em vários aspectos, como em relação ao tecido luteal, em que zebuínos possuem menor área luteal. Além disso, no momento da divergência folicular e ovulação, as vacas zebuínas possuem menor diâmetro e também tem possuem uma maior população de folículos ovarianos e ovócitos recuperados por aspiração folicular (OPU) (PINHEIRO et al., 1998; PONTES et al., 2010; PONTES et al., 2009).

A luteólise acontece em vacas não gestantes, em que o CL regride 16 a 18 dias do início do ciclo devido à secreção de prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF) pelo endométrio uterino, cuja liberação é iniciada a partir da ocitocina excretada pelo próprio CL (GORDON, 2002). A PGF estimula a secreção de ocitocina pelo CL e a ocitocina, por sua vez, estimula a secreção de PGF no útero. Estes hormônios compreendem um mecanismo de retroalimentação, que atua entre o útero e o CL para reforçar a regressão luteal. Além disso, os principais agentes responsáveis pela liberação de PGF são fatores angiogênicos e vasoativos (NISWENDER et al., 2000). O mesmo não acontece com fêmeas gestantes, em que o embrião secreta uma proteína denominada de interferon tau (IFNT), que alcança seus níveis máximos entre os dias 16 e 18, sinalizando para a mãe que ele está presente no lúmen uterino. Com isso, ocorre uma

inibição da produção de ocitocina no útero e, conseqüentemente o bloqueio da liberação de PGF, hormônio responsável pela luteólise (ANTONIAZZI et al., 2011).

## **2.2 Protocolos de sincronização do ciclo estral**

Os protocolos de sincronização da ovulação para Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) têm como vantagem a inseminação sem a necessidade de detecção de estro. As pesquisas têm mostrado como esses protocolos são práticos e eficientes, visto que são encontrados resultados repetíveis em diferentes propriedades e, além disso, são uma excelente forma de melhorar geneticamente um rebanho (BÓ; BARUSELLI, 2014).

Dois tipos de protocolos de IATF são comumente utilizados na pecuária de corte: protocolos que preconizam o uso de GnRH ou de E2 como indutores de ovulação, ambos combinados com dispositivos intravaginais de P4 e E2 no início do protocolo (BÓ et al., 2016; CEDEÑO et al., 2021). A utilização desses protocolos está relacionada à disponibilidade e possibilidade de uso dos hormônios em determinado país. Os protocolos à base de estradiol são mais utilizados na América do Sul; já aqueles com GnRH são mais frequentes na América do Norte, Europa e Nova Zelândia, onde o uso do estradiol é proibido (BÓ et al., 2016).

Os protocolos com estradiol consistem na inserção de um DIV e na aplicação de 2 mg de BE no Dia 0 do protocolo para induzir a atresia folicular e sincronizar a onda. Além disso, é utilizada PGF $2\alpha$  no momento da retirada do DIV (nos dias 7, 8 ou 9) a fim de garantir a luteólise. Com o intuito de sincronizar a ovulação (COLAZO; KASTELIC; MAPLETOFT, 2003), pode ser aplicado 2 mg de BE 24 horas após remoção do DIV (BARUSELLI et al., 2004) ou 0,5 a 1 mg de CE no momento da retirada do DIV (COLAZO; KASTELIC; MAPLETOFT, 2003). Os protocolos com GnRH, em que as vacas recebem GnRH 48 h após PGF $2\alpha$  foram desenvolvidos para vacas leiteiras (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995), e são amplamente utilizados em bovinos de corte norte americanos (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995; DAY, 2015).

## 2.3 Hormônios utilizados na sincronização da ovulação em bovinos

Existe uma variedade de hormônios que podem ser utilizados em protocolos de sincronização da ovulação com o objetivo otimizar a utilização das biotécnicas reprodutivas, como a IATF. Esses hormônios são utilizados com o objetivo de controlar o ciclo estral e sincronizar a ovulação (D'AVILA, C.A.; MORAES, F.P.; JR, T.L.; GASPERIN, 2019)

### 2.3.1 Prostaglandinas

Durante a década de 70, várias pesquisas foram desenvolvidas sobre as propriedades biológicas das prostaglandinas, as quais são derivadas do ácido araquidônico. Essa substância foi detectada pela primeira vez no fluido seminal de carneiro e inicialmente foram consideradas secretadas pela próstata, por esse motivo o termo “prostaglandina” (GORDON, 2002). Dentre as prostaglandinas, a  $PGF2\alpha$  é a de maior interesse na reprodução, pois é muito utilizada em protocolos de sincronização do estro, devido ao seu efeito luteolítico. Porém, o uso da  $PGF2\alpha$  sozinha não viabiliza a sincronização para a IATF, visto que, o estro pode ocorrer em até 5 dias após sua aplicação. Portanto, nos protocolos de IATF, a  $PGF2\alpha$  é associada a uma fonte exógena de P4 e indutores da ovulação (D'AVILA, C.A.; MORAES, F.P.; JR, T.L.; GASPERIN, 2019).

Além do efeito luteolítico, a  $PGF2\alpha$  e seus análogos também podem ser utilizados para indução da ovulação (PFEIFER et al., 2014). Em novilhas mestiças Angus, o tratamento com PGF foi associado com ovulação independente da progesterona exógena. Portanto, foi aprovada a hipótese que a PGF induz a ovulação por mecanismo independente da luteólise (LEONARDI et al., 2012). Em pesquisas mais recentes, mostrou-se tão eficaz quanto o CE em protocolos que utilizam GnRH e P4 (CASTRO et al., 2018). Os mecanismos pelo qual a prostaglandina atua como indutor de ovulação ainda não estão bem estabelecidos, pois os fatores que medeiam a produção e a ação específica de PGE e  $PGF2\alpha$  durante a cascata ovulatória permanecem desconhecidas. Porém, as prostaglandinas derivadas das células da granulosa são necessárias para a ovulação (BRIDGES; FORTUNE, 2007).

### 2.3.2 Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH)

O GnRH é um polipeptídeo que consiste em dez resíduos de aminoácidos, e é liberado pelo hipotálamo de forma pulsátil sendo responsável pela secreção e liberação de LH pela

hipófise anterior (BALL; PETERS, 2007). Dessa forma, o GnRH pode causar a ovulação ou luteinização de um folículo dominante caso esteja presente no momento da aplicação. Além disso, o GnRH resulta em ovulações com intervalos menores quando comparado aos ésteres de estradiol, pois têm sua ação diretamente na hipófise (D'AVILA, C.A.; MORAES, F.P.; JR, T.L.; GASPERIN, 2019).

Um dos protocolos pioneiros na utilização do GnRH é o *Ovsynch*, utilizado para controlar o ciclo estral e a ovulação em vacas e novilhas leiteiras. O protocolo consiste na aplicação de GnRH no dia 0, pois as hipóteses eram que a injeção de GnRH faria com que o folículo dominante ovulasse e iniciasse uma nova onda folicular ou fosse aplicado em um período do ciclo estral em que uma nova onda estivesse se formando espontaneamente. Após 7 dias aplica-se PGF $2\alpha$  para regredir o CL, pois se este é resultado da aplicação inicial de GnRH, o intervalo de 7 dias possibilita que o CL se torne responsivo à PGF. As vacas recebem uma segunda injeção de GnRH 48h após a PGF, com o intuito de induzir a ovulação de um folículo dominante. Este período entre as duas aplicações de GnRH possibilita que um novo folículo seja capaz de emergir e se desenvolver até um tamanho pré-ovulatório, respondendo à luteinização. Com base nesse estudo, as ovulações ocorrem entre 24h e 32h após a aplicação da segunda dose de GnRH (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995; WILTBANK; PURSLEY, 2014). Portanto, esse trabalho trouxe uma resposta muito interessante, sendo o primeiro que relata a sincronização da ovulação em um período consolidado. Esse fato tem um grande impacto na reprodução, pois possibilitou que a IA fosse realizada mais próxima da ovulação e, sem necessidade de detecção do estro em vacas leiteiras (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995).

Em rebanhos de corte na América do Sul, protocolos baseados em estradiol e P4 são mais utilizados para sincronizar a emergência da onda folicular e ovulação. Geralmente, nesses protocolos as ovulações são induzidas com doses baixas de CE, administradas no momento da retirada do dispositivo de P4 (BÓ; BARUSELLI, 2014). Contudo, as vacas induzidas com CE têm suas ovulações ocorrendo entre 42 e 102 horas após a retirada do dispositivo, ou seja, ovulações mais espaçadas. Já as vacas que foram induzidas com CE e GnRH, tiveram suas ovulações ocorrendo no intervalo de 60 a 72 horas. Além disso, Barbosa *et al* (2022) observaram que as ovulações tiveram uma maior concentração quando aplicado GnRH 34 horas após a retirada do DIV (66h) em relação ao grupo controle que recebeu apenas CE como indutor de ovulação (77,2h). A taxa de concepção (P/IA) também foi superior no grupo que recebeu o GnRH (63%) em relação ao controle (50,4%). Portanto, a

administração de GnRH está associada com maior sincronização da ovulação e maior P/IA em vacas zebuínas de corte (BARBOSA et al., 2022).

### 2.3.3 Hormônio Luteinizante (LH)

O LH é uma glicoproteína secretada pelas células gonadotróficas da adeno-hipófise. Em folículos pré-ovulatórios, o LH tem função de estimular a ovulação e age nas células da granulosa, que passa a expressar receptores de LH. Além disso, a resposta do folículo ao LH é morfológica (ovulação e formação do corpo lúteo) e secretória (produção de P4) (SPINOSA, 2017). Além disso, foi testada a hipótese que o LH atuaria melhor como indutor de ovulação do que o GnRH no protocolo *Ovsynch*. Porém, não encontraram diferença significativa, pois o tempo de ovulação após a aplicação do segundo indutor de ovulação foi similar, sendo de  $\pm 26,5$  h para o GnRH e  $\pm 24,9$  h para LH, em búfalas. Portanto, o GnRH pode ser utilizado como substituto do LH em programas de *Ovsynch* (DE ARAUJO BERBER; MADUREIRA; BARUSELLI, 2002).

### 2.3.4 Ésteres de Estradiol

Os ésteres de estradiol são esteroides naturais que têm como principais compostos o 17 $\beta$ -estradiol, a estrona e o estriol. Estes ésteres de estradiol são usados para o controle do ciclo estral, porém induzem uma ovulação mais tardia quando comparado aos protocolos que utilizam GnRH (D'AVILA, C.A.; MORAES, F.P.; JR, T.L.; GASPERIN, 2019). Em novilhas mestiças induzidas com BE 24 horas após a remoção do DIV, as ovulações ocorreram  $69,81 \pm 3,23$  horas após a remoção do mesmo (PFEIFER et al., 2014). Já em vacas leiteiras as ovulações ocorreram entre 66 e 78 horas (PFEIFER et al., 2016). Contudo, a utilização do BE após a remoção do DIV é eficiente em induzir a ovulação, porém é necessário um manejo a mais, pois o BE é aplicado um dia após a retirada do DIV. Isso acontece pelo fato de que o BE tem meia vida menor (em média 3 dias) em comparação ao CE (10 a 12 dias) (D'AVILA, C.A.; MORAES, F.P.; JR, T.L.; GASPERIN, 2019). Portanto, a distribuição das ovulações utilizando os dois fármacos são bastante uniformes. Além disso, a taxa de concepção e diâmetro do folículo pré-ovulatório também não diferem, ou seja, para facilitar o manejo, pode ser utilizado o CE como indutor de ovulação sem comprometimento na taxa de concepção (DE ARAÚJO ANDRADE et al., 2012; FRANÇA et al., 2015).

O tratamento com  $17\beta$  estradiol determina atresia do folículo dominante e emergência de uma nova onda folicular, sendo sua eficiência melhorada quando associado à progesterona (KASTELIC et al., 1997). A administração de 5 mg de  $17\beta$  estradiol gerou uma emergência de nova onda folicular, em média de 4,3 dias mais tarde. Entretanto, quando aplicado benzoato de estradiol uma nova onda folicular iniciou após 5,4 dias após a aplicação (BO et al., 1995).

### 2.3.5 Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG)

O hCG é um hormônio glicoproteico, muito utilizado por ter uma ação semelhante ao LH, porém com uma ação mais prolongada, em torno de 30 horas após o tratamento (D'AVILA, C.A., 2019; DE RENSIS et al., 2008). Em bovinos, o hCG se liga nos receptores de LH nas células da granulosa e da teca dos folículos ovarianos, e é utilizado para induzir a ovulação em protocolos de IATF. O seu uso foi associado com o incremento na fertilidade de vacas leiteiras, reduzindo as perdas gestacionais devido ao estresse calórico (DE RENSIS et al., 2008). Em vacas da raça Holandês que receberam tratamento com hCG 7 dias depois da inseminação tiveram produção de um corpo lúteo acessório, aumento da concentração plasmática de P4 e redução da morte embrionária precoce (RAJAMAHENDRAN; SIANANGAMA, 1992). Portanto, além do potencial de ovulação, o hCG mostrou aumento da taxa de concepção após o tratamento. Entretanto, a substituição do GnRH por hCG no início do protocolo *Ovsynch* não mostrou aumento nas taxas de concepção e ovulação em vacas leiteiras (KESKIN et al., 2010).

### 2.3.6 Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG)

A eCG é um fármaco que possui meia vida de 46h, e é produzida nos cálices endometriais de éguas prenhes, entre 40 a 130 dias de gestação (BD; SD, 1991). Além disso, é a única gonadotrofina capaz de se ligar tanto aos receptores de LH, quanto de FSH, possuindo atividade folículo estimulante e luteinizante. Ao se ligar aos receptores de FSH e LH, pode promover o crescimento folicular, ovulação e maturação (BARUSELLI et al., 2008).

A administração de eCG no momento da retirada do dispositivo em um protocolo com progesterona e estradiol, aumenta a taxa de ovulação e do crescimento do folículo ovulatório, em vacas de corte em anestro. Além disso, induz a formação de um corpo lúteo maior com

capacidade de produzir mais progesterona. Portanto, o eCG pode melhorar a eficiência reprodutiva em animais no período pós parto ou com baixa condição corporal (BARUSELLI et al., 2008; DOROTEU; OLIVEIRA; PIVATO, 2015).

### 2.3.7 Progesterona injetável (P4i)

Os protocolos com progesterona injetável podem ser uma alternativa interessante para a IATF, pois facilita o manejo de animais devido a aspectos práticos, como benefícios de uma aplicação parenteral, rápida, precisa e com uma alta garantia de absorção pelo animal, eliminando casos de perdas de dispositivos. Além disso, as vantagens higiênico-sanitárias que evitam casos de vaginite e/ou vulvovaginite, frequentemente observados no uso de dispositivos intravaginais, especialmente quando são reutilizados. Além disso, é menos laborioso, principalmente pela maior facilidade na aplicação parenteral e não envolve a limpeza como observado em dispositivos intravaginais (MOROTTI et al., 2018).

Em protocolos de pré-sincronização a administração de 150mg de P4i 10 dias antes do protocolo de IATF aumentou o diâmetro folicular no início do protocolo (D0), no dia da retirada do DIV (D8) e aumentou a taxa de concepção (P/IA). Além disso, essa dosagem manteve a concentração de P4 acima de 1,5ng/ml por 7 dias, mostrando que o tratamento foi eficaz em aumentar a P4 (SIMÕES et al., 2018).

Quando se comparou E2+P4i com BE para sincronização da onda folicular em *Bos indicus*, submetidos a protocolo de IATF à base de estradiol/P4, viram que ambos os tratamentos tiveram eficácia em induzir uma nova onda folicular. Porém, o uso do protocolo em primíparas com E2+P4i é mais vantajoso, visto que aumentou a P/IA (ROCHA et al., 2022).

## 2.4 Sincronização da ovulação e incremento na fertilidade em vacas de corte

Quando a IA foi desenvolvida e validada, os estudos realizados determinavam o tempo ideal de IA em relação ao estro. A recomendação era realizar a IA 12 horas após o primeiro estro observado. Porém, a variabilidade entre o início do estro e sua observação dificultavam definir o momento ideal da IA em relação à ovulação. Portanto, foi desenvolvido um protocolo que sincroniza o tempo de ovulação, denominado *Ovsynch* (administração de GnRH no início do protocolo, PGF2 $\alpha$  7 dias depois e GnRH novamente no dia 9, realizando a IATF 16 horas depois (RICHARD PURSLEY; SILCOX; WILTBANK, 1998). A partir disso,

durante os últimos 20 anos, vários protocolos de sincronização para a IATF foram desenvolvidos (BARBOSA et al., 2022). Com base nesses estudos foi possível eliminar a necessidade de detecção do estro e, além disso, esses protocolos permitiram que a IA seja realizada em um momento conhecido da ovulação (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995).

Na América do Sul, os protocolos à base de estradiol e P4 são os mais utilizados para sincronização da onda folicular e ovulação para IATF (BARBOSA et al., 2022), pois protocolos à base de GnRH e PGF2 $\alpha$  (*Ovsynch*) apresentaram resultados inconsistentes, provavelmente por causa do número variável de vacas em anestro pós-parto (BARUSELLI et al., 2004). Nos protocolos com estradiol e P4, as ovulações são induzidas com doses baixas de CE, geralmente concomitante com a retirada do DIV. Entretanto, vacas induzidas com CE podem falhar em demonstrar estro comportamental e isso está associado a menor P/IA (RODRIGUES et al., 2019). Portanto, a falha em demonstrar estro em vacas induzidas com CE pode estar relacionado a um folículo dominante pequeno e conseqüentemente, baixa produção de estradiol (BARBOSA et al., 2022).

Alguns estudos têm mostrado que em vacas que não demonstram estro, o GnRH pode ser uma alternativa para incremento na taxa de prenhez em vacas de corte submetidas à protocolos de IATF contendo estradiol e P4 (RODRIGUES et al., 2019; CEDEÑO et al., 2021). Em vacas *Bos indicus* (Nelore), com protocolo de 7 dias à base de estradiol e P4, multíparas e primíparas foram randomizadas para receber ou não GnRH no dia da IATF. As vacas que receberam GnRH tiveram maior P/IA do que as que não receberam (62,5% e 56,8%, respectivamente). Além disso, o tratamento com GnRH aumentou a P/IA daquelas vacas que não demonstraram estro (52,1% e 34,3%, respectivamente) (CORTAT et al., 2022). Portanto, o tratamento com GnRH traz um benefício nos protocolos de IATF, aumentando a P/IA em vacas da raça Nelore. A hipótese desse estudo foi avaliar a aplicação de GnRH 34 horas após a remoção do DIV aumentaria a taxa de ovulação (%), teria efeito na área do CL e concentração sérica de P4 nos Experimentos 1 e 2. Já nos Experimentos 3 e 4, o objetivo foi avaliar a taxa de concepção (P/IA).

### **3 ARTIGO CIENTÍFICO**

Neste item será apresentado o artigo intitulado:

**GnRH previamente à IATF na taxa de ovulação e função luteal em vacas taurinas  
cruzadas de corte**

Gabriella S. Velho, Vanessa Fernandes, Fernando Caetano de Oliveira, Luiz Francisco  
Machado Pfeifer, Bernardo Garziera Gasperin, Rogério Ferreira, André Gustavo Cabrera  
Dalto, Monique Tomazele Rovani

### 3 ARTIGO CIENTÍFICO

#### **GnRH previamente à IATF na taxa de ovulação e função luteal em vacas taurinas cruzadas de corte**

Gabriella S. Velho<sup>1</sup>, Vanessa Fernandes<sup>2</sup>, Fernando Caetano de Oliveira<sup>2</sup>, Luiz Francisco Machado Pfeifer<sup>3</sup>, Bernardo Garziera Gasperin<sup>4</sup>, Rogério Ferreira<sup>5</sup>, André Gustavo Cabrera Dalto<sup>1,2</sup>, Monique Tomazele Rovani<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil, <sup>2</sup>Faculdade de Veterinária (UFRGS), <sup>3</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa, Rondônia, <sup>4</sup>UFPEL – Universidade Federal de Pelotas, <sup>5</sup>Universidade Estadual de Santa Catarina (UDESC), \*Corresponding author: monique.rovani@ufrgs.br

#### **Resumo**

Foram realizados quatro experimentos para avaliar os efeitos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) antes da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em vacas multíparas taurinas e sintéticas de corte. Inicialmente, foi realizado um Experimento Piloto em que vacas Jersey e Holandesas (n=8) foram sincronizadas com 2 mg de benzoato de estradiol (BE) e DIV contendo 1g de P4. Oito dias depois, foi retirado o DIV e aplicado 500ug de d-cloprostenol (PGF); 0,5mg de cipionato de estradiol (CE). O objetivo foi avaliar os efeitos da aplicação do GnRH 36 horas após a retirada do DIV na taxa de ovulação, concentração sérica de progesterona (P4) e diâmetro do corpo lúteo (CL). Observou-se 100% de ovulação no grupo GnRH (4/4) e 75% no grupo Controle (3/4; p=0,2) até 72 h após remoção do DIV. A concentração sérica de P4 diferiu entre os dias avaliados (D5,5 e D12 após IATF; p=0,005), mas não em relação ao tratamento (p=0,2). A fim de testar um maior número de animais, no Experimento 1 vacas primíparas e multíparas da raça Brangus (n=51) foram sincronizadas com o mesmo protocolo do Experimento Piloto, porém com a adição da gonadotrofina coriônica equina (eCG 300UI). Além disso, foram marcadas na base da cauda para identificação do estro. No D9, as vacas foram distribuídas nos grupos conforme o diâmetro do folículo pré-ovulatório (FPO): GnRH (25 ug lecorelina) ou Controle (não receber nenhum tratamento). Observou-se 95,8% de ovulação no grupo GnRH (23/24) e 80,9% no grupo Controle (17/21; p=0,1). A concentração sérica de P4 diferiu entre grupos (p=0,02) e os dias avaliados (D7 e D12 após IATF; p=0,001), mas não houve interação entre grupo e dia (p=0,8). No Experimento 2, o objetivo foi identificar o efeito do tratamento com GnRH

(n=243) e Controle (n=183) na fertilidade de vacas taurinas de corte. Não foi observado efeito do tratamento em taxa de concepção (P/IA), sendo as taxas de P/IA de 51,6 % (n=184) e 54,1% (n=246) nos grupos no Controle e GnRH, respectivamente (p=0,2). No entanto, vacas com ECC (4-4,5) do grupo GnRH tiveram maior P/IA (p=0,003) e, vacas que manifestaram estro também tiveram maior P/IA em relação aos animais não detectados em cio (55,49% vs. 42,25%; p=0,03). No Experimento 3, as vacas foram sincronizadas com um protocolo diferente dos demais estudos, em que receberam 5,5mg 17 $\beta$  estradiol e 50mg P4 e DIV 0,96g de P4. Oito dias depois, foi retirado o DIV e aplicado PGF (500ug); eCG (300UI) e CE (0,5mg). As vacas foram distribuídas aleatoriamente nos grupos Controle (n=79) e GnRH (n=78), que recebeu 25ug de lecorelina 34h após remoção do DIV. As vacas do grupo Controle que não apresentaram estro receberam GnRH na IATF (48h após a retirada do DIV). As vacas do grupo GnRH tiveram maior P/IA comparado ao grupo controle (67,94 e 51,79%, respectivamente; p=0,03). Em resumo, verificou-se que não houve diferença na função luteal de vacas tratadas ou não com o GnRH; o GnRH não aumentou a taxa de concepção em vacas sincronizadas com protocolo convencional (P4 e BE) em relação aos animais que receberam somente CE como indutor de ovulação; vacas que receberam GnRH tiveram maior P/IA quando comparado ao grupo controle, quando associado a um protocolo com 17 $\beta$  e progesterona injetável; e vacas que manifestaram estro independente do tratamento tiveram maior taxa de concepção.

## 1. Introdução

Os protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) mais utilizados em bovinos de corte são baseados em estradiol com inserção de dispositivo intravaginal de progesterona (DIV) no início do protocolo (BÓ, 2020; CEDEÑO *et al.*, 2021b; SÁ FILHO *et al.*, 2010). Nesses protocolos as ovulações são induzidas com uma dose baixa de cipionato de estradiol (CE), administrada no momento da retirada do DIV (BÓ; BARUSELLI, 2014). Porém, as vacas que são induzidas com estradiol podem manifestar um estro artificial (PFEIFER *et al.*, 2020), e a concentração de estradiol endógena pode ser baixa, associada a um folículo dominante pequeno (PFEIFER *et al.*, 2020; SÁ FILHO *et al.*, 2010). Além disso, nesses protocolos com ésteres de estradiol, a ovulação é mais tardia quando comparada a protocolos que utilizam GnRH (D'AVILA *et al.*, 2019). Os protocolos que utilizam benzoato de estradiol (BE) 24 h após a remoção do DIV, tiveram ovulações ocorrendo 69h após a remoção do mesmo (PFEIFER *et al.*, 2014), já em protocolos que utilizaram CE na remoção do DIV, as ovulações ocorreram 55h depois (PANCARCI *et al.*, 2002). No entanto, existe

uma dispersão no momento da ovulação, em que as vacas ovulam de 42 a 102 horas após a retirada do DIV (BARBOSA *et al.*, 2022a) e esse fator está associado a menor sobrevivência do embrião pós-IA e, conseqüentemente, baixas taxas de concepção (PERRY *et al.*, 2007a) Além disso, quanto maior o intervalo da IATF até a ovulação menor a taxa de concepção, que pode estar relacionada ao menor número de células espermáticas viáveis (SAACKE, 2008).

Recentemente, um estudo demonstrou que vacas que não manifestaram estro em 48 horas após a remoção do DIV, quando receberam GnRH e foram inseminadas 8 horas depois (56 horas), tiveram maior taxa de concepção 65,8% do que aquelas que não receberam GnRH e não demonstraram estro P/IA (17,5%) (CEDEÑO *et al.*, 2021a). Além disso, em outro estudo conduzido por Barbosa et al (BARBOSA *et al.*, 2022a), observou-se que vacas *Bos indicus* que receberam GnRH 34 horas após a remoção do DIV tiveram um expressivo incremento na concepção do que aquelas que não receberam (63% e 50,4%, respectivamente). No referido estudo, atribui-se a maior taxa de concepção à maior concentração no momento da ovulação em vacas tratadas com GnRH. Entretanto, a função luteal foi parcialmente avaliada. No entanto, dadas as diferenças na fisiologia reprodutiva entre zebuínos e taurinos, como fisiologia ovariana e diâmetro folicular, ainda não foi relatado o benefício do uso do GnRH aplicado 34 horas após a remoção do DIV em raças taurinas e sintéticas. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a resposta ovulatória, função luteal e P/IA em vacas taurinas e sintéticas com cria ao pé após tratamento com GnRH.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1 Animais*

A Comissão de Ética No Uso De Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul aprovou todos os procedimentos realizados neste manuscrito (Número 41037 – 2021).

### *2.2 Experimento Piloto*

O objetivo foi avaliar a taxa de ovulação e função luteal em resposta ao tratamento com GnRH. Para isto, vacas secas das raças Jersey e Holandesa (n=8), com escore de condição corporal (ECC) 3 (escala de 1 a 5; 1=magra e 5=obesa), foram sincronizadas com um DIV (1g P4; Primer, Agener União), juntamente com 2 mg de BE (RIC-BE, Agener União, i.m) no D0. No D8, foi retirado o DIV e aplicado 500ug de cloprostenol (PGF; Estron, Agener União). Além disso, as vacas receberam 0,5mg de cipionato de estradiol (CE; Cipiotec; Agener União) e foram marcadas na base da cauda para identificação do estro com

bastão marcador Walmur®. No D9, as vacas foram distribuídas conforme o diâmetro folicular para receber GnRH (25 ug lecirelina; Agener União) 34h após a retirada do DIV (Grupo GnRH) ou não receber nenhum tratamento (Grupo Controle). O diâmetro do folículo pré-ovulatório (FPO) no momento do tratamento nos grupos Controle e GnRH foram  $15,1 \pm 1,2$  e  $13,8 \pm 0,96$ , respectivamente ( $p=0,4$ ). Foi realizado o acompanhamento folicular das vacas no momento da retirada do DIV e no dia da aplicação do GnRH do folículo pré-ovulatório (FPO). Além disso, a ovulação foi considerada quando houve a ausência do FPO previamente identificado na avaliação anterior 72 horas após a retirada do DIV, por ultrassonografia modo-B (Mindray®DP10-vet com 7,5MHZ, probe retal). No dia 5,5 e 12 após a IATF foi realizada coleta de sangue para mensuração de progesterona (P4) sérica.

### *2.3 Experimento 1*

Vacas primíparas (Lote 1, n=14) e multíparas com cria ao pé (Lote 2, n=16; Lote 3, n=21) da raça Brangus, com ECC  $3,5 \pm 0,1$  tiveram a onda folicular sincronizada com protocolo de 8 dias (lotes 1 e 3) e de 9 dias (lote 2). Os animais receberam BE (2mg im; Ourofino) e DIV (1g P4, Agener União). Na retirada do DIV, as vacas receberam PGF (0,5mg; Ourofino), gonadotrofina coriônica equina (eCG 300UI; Ourofino) e CE (0,5mg im; Agener União). Nos Lotes 1 e 2, os folículos foram escaneados por ultrassonografia na remoção do DIV e 34h da remoção do DIV, quando as vacas foram distribuídas para receber GnRH (25 ug Lecirelina; Agener União) ou não receber tratamento (Grupo Controle). Já as vacas do Lote 3 tiveram os folículos escaneados 34h, 56h, 72h e 80h após a remoção do DIV. Os grupos foram equilibrados conforme o diâmetro folicular a partir da avaliação ultrassonográfica dos folículos: Lote 1 (Controle  $11,3 \pm 0,6$ mm, n=4; GnRH  $11,9 \pm 0,6$ mm, n=7), Lote 2 (Controle  $12,4 \pm 0,8$ mm, n=8; GnRH  $12,3 \pm 0,5$ mm, n=8) e Lote 3 (Controle  $10,35 \pm 0,50$ mm, n=9; GnRH  $10,67 \pm 0,60$ mm, n=10). A ovulação foi confirmada 72h após a remoção do DIV, que foi considerada quando houve a ausência do FPO, conforme descrito no Experimento 1. Além disso, foi realizada a avaliação morfológica do corpo lúteo (CL) registrando-se o diâmetro do CL através de ultrassonografia modo-B. Foi realizada coleta de sangue para mensuração de P4 sérica nos dias 7 e 12 após a IATF e todos os animais foram submetidos ao diagnóstico de gestação 30 dias após a IATF.

### *2.4 Experimento 2*

Nesse experimento, o objetivo foi obter dados sobre taxa de concepção por inseminação (P/IA) e, além disso, foi realizada a avaliação da manifestação do estro na hora

da IATF. Essa avaliação foi feita a partir da aplicação de tinta na região sacral das fêmeas no dia da retirada do DIV e a leitura foi realizada no momento da IATF, sendo considerada em estro a vaca que tinha  $\geq 75\%$  de tinta removida. Foram utilizadas vacas multíparas taurinas em lactação (n=342) e multíparas sintéticas (n=88), mantidas em pastagens nativas, com ECC  $2,94\pm 0,02$ . Além disso, o ECC foi agrupado em categorias para permitir avaliação do efeito do ECC sobre a P/IA ( $\leq 2,75$ , n= 166; 3 - 3,75, n=207;  $\geq 4,5$ , n = 49). Todas as vacas tiveram a onda folicular sincronizada e no D0 receberam a aplicação de BE (2mg; Ourofino; im) e DIV (1g P4, Ourofino); e CE (1mg Ourofino; im), PGF (500ug, Ouro fino; im), eCG (300UI im; Ourofino; im) no D8. No D9, as vacas foram aleatoriamente distribuídas nos grupos Controle (sem tratamento; n=144) ou GnRH (25 ug lecirelina; Agener União; n=198) e todas as vacas foram submetidas ao diagnóstico de gestação com 30 dias.

### 2.5 Experimento 3

Foram utilizadas vacas multíparas em lactação (n=157), com ECC de  $2,90\pm 0,04$ , mantidas em pastagem de azevém (*Lolium multiflorum*) e submetidas ao seguinte protocolo de IATF: os animais receberam um DIV (0,96g P4; Boehringer Ingelheim) e 5,5mg 17b estradiol e 50mg P4 (Boehringer Ingelheim; im) no Dia 0 (D0). As vacas foram tratadas com PGF (500ug, Boehringer Ingelheim; im), eCG (300UI im; Ourofino; im) e CE (0,5mg, Zoetis; im), simultaneamente à remoção do DIV no D8. No D9, as vacas foram aleatoriamente distribuídas nos grupos Controle (GnRH48; n=79) ou GnRH34 (25 $\mu$ g lecirelina; Agener União; im; n=78) 34h após a remoção do DIV. Foi realizada aplicação de tinta na região sacral das fêmeas no dia da retirada do DIV e a leitura foi realizada no momento da IATF, sendo considerada em estro a vaca que tinha  $\geq 75\%$  de tinta removida. As vacas do grupo controle que não apresentaram estro receberam GnRH na IATF (GnRH48, receberam GnRH 48h após a retirada do DIV).

### 2.6 Coleta de sangue e dosagem hormonal

As amostras de sangue foram coletadas dos vasos coccígeos, com auxílio de tubos *vacutainer* com ativador de coágulo e agulhas de 25 x 0,70 mm (Vacuplast®). Os tubos de coleta permaneceram em temperatura ambiente (22–25 ° C) por 30 minutos para retração do coágulo antes da centrifugação (1600 x g por 10 minutos, temperatura ambiente). O soro foi armazenado em microtubos de 1,5 ml a -20 °C até a análise. As concentrações séricas de P4 foram realizadas pelo método de quimiluminescência (ADVIA Centaur Systems Progesterone

Kit; Siemens; Ref. 01586287; sensibilidade de 0,21 ng/mL), com coeficientes de variação intra- e inter-ensaio inferiores a 12%.

### 2.7 Análise estatística

Os dados contínuos foram analisados quanto à distribuição e normalizados quando necessário pelo teste de Shapiro-Wilk. Dados de diâmetro de CL e concentração sérica de progesterona nos diferentes momentos foram comparadas através de *Mixed Model*. Foram incluídos no modelo os efeitos de fazenda, lote, ECC, estro e foram excluídos quando não significativos ( $p > 0,2$ ). A taxa de concepção foi comparada utilizando-se regressão logística e utilizou-se o contraste para as comparações de proporções de P/IA nos diferentes ECCs e estro. As análises foram realizadas com o software estatístico JMP (JMP Statistical Discovery LLC.) e consideradas a um nível de significância mínimo de 5% para as comparações estabelecidas.

## 3. Resultados

### 3.1 Experimento Piloto

O diâmetro folicular das vacas de ambos os grupos no dia do tratamento com GnRH não diferiu ( $p=0,4$ ). Observou-se que as vacas tratadas com GnRH ovularam até 72 h (Fig. 1A), e a taxa de ovulação nos grupos Controle e GnRH não diferiu nas 72h após a retirada do DIV ( $p=0,2$ ). Além disso, não foi observada diferença na concentração sérica de P4 em relação aos grupos ( $p=0,2$ ), somente efeito do dia de avaliação após a IATF (5,5 e 12;  $p=0,005$ ) (Fig. 1B).

### 3.2 Experimento 1

Em um segundo momento, foram testadas as mesmas variáveis do Experimento 1 com um maior número de animais da raça Brangus em 3 réplicas (Tabela 1). O diâmetro folicular das vacas dos grupos Controle e GnRH não diferiu no momento do tratamento ( $11,3 \pm 0,4$  e  $11,5 \pm 0,4$ , respectivamente;  $p=0,7$ ). Não foi observada diferença na taxa de ovulação 72h após a retirada do DIV (Fig. 2A;  $p=0,1$ ), sendo que 95,8% e 80,95% das vacas ovularam dos grupos GnRH e Controle, respectivamente ( $p=0,1$ ). Não foi observada diferença no diâmetro do CL nos dias 11 e 12 após IATF (Fig. 2B;  $p=0,4$ ). Em uma réplica acompanhou-se a ovulação em vários momentos, em que ocorrera entre 56 e 80h (Fig. 2C).

Em 2 réplicas (Lotes 1 e 2), os animais tiveram uma avaliação adicional, em que tiveram a função luteal avaliada nos dias 7 e 12 após IATF. Não foram observadas diferenças

na análise pareada de diâmetro do CL (Fig. 3A). A concentração sérica de P4 diferiu entre grupos ( $p=0,02$ ) e os dias avaliados (D7 e D12 após IATF;  $p=0,001$ ), mas não houve interação entre grupo e dia (Fig. 3B;  $p=0,8$ ).

### 3.3 Experimento 2

Não foi observado efeito do tratamento na taxa de concepção (P/IA), sendo as taxas de P/IA de 51,6 % ( $n=184$ ) e 54,1% ( $n=246$ ) nos grupos no controle e GnRH, respectivamente (Figura 4A;  $p=0,2$ ). No entanto, ao categorizar os animais em ECC (Figura 4B), observou-se que o ECC tem efeito sobre P/IA ( $p=0,003$ ), mas o grupo ( $p=0,2$ ) não tem efeito, com uma tendência de interação entre grupo e ECC ( $p=0,07$ ). Vacas com ECC (4-4,5) do grupo GnRH tiveram maior P/IA (%) quando comparado ao grupo controle ( $p=0,003$ ; Fig.4B). Observou-se que vacas do grupo Controle tiveram maior manifestação de estro na IATF ( $p=0,002$ ) do que as vacas do grupo GnRH (Fig. 4C). Além disso, vacas que manifestaram estro tiveram maior P/IA (55,5%) do que as que não detectados em estro (42,3%; Fig. 4D;  $p=0,03$ ).

### 3.4 Experimento 3

Com a utilização de um protocolo com 17b, progesterona injetável e DIV no início da sincronização em três réplicas (Figura 5), as vacas do grupo GnRH34 tiveram incremento significativo da P/IA (67,94%), comparadas às vacas do grupo controle GnRH48 (51,79%;  $p=0,03$ ).

## 4. Discussão

O presente estudo avaliou o efeito da administração de GnRH 34 horas após a remoção do DIV no protocolo de IATF em vacas taurinas e sintéticas de corte com cria ao pé, utilizando um protocolo à base de estradiol e P4. Além disso, avaliamos o efeito do tratamento com GnRH na função luteal. Não foram observadas diferenças entre grupos Controle e GnRH em relação ao diâmetro do CL ou concentração de P4 no Experimento Piloto e no Experimento 1. Essas variáveis foram parcialmente avaliadas por outros pesquisadores utilizando como base a aplicação de GnRH 34h após a retirada do DIV em vacas da raça Nelore (BARBOSA *et al.*, 2022a). Porém, em vacas leiteiras quando aplicado GnRH na hora da IA, melhorou a maturação do oócito e a função lútea (SHEPHARD; MORTON; NORMAN, 2014). Ressalta-se que neste estudo foi utilizado o princípio ativo Lecirelina e, no trabalho conduzido em vacas Nelore por (BARBOSA *et al.*, 2022) foi

utilizado Buserelina. Existem diferenças na estrutura molecular dessas duas formas sintéticas de GnRH. Entretanto, mesmo com essas diferenças estruturais das moléculas, foi demonstrado que o pico de LH ocorre duas horas após a administração intramuscular de buserelina e lecirelina (VANZETTO *et al.*, 2018).

A administração de GnRH em vacas que manifestaram estro aumentou a P/IA quando comparado às vacas que manifestaram estro e não receberam o hormônio (Experimento 2). Este resultado diverge de outros estudos em que não houve diferença significativa quando utilizado o GnRH em novilhas que manifestaram estro hora da IA, porém melhorou a P/IA nas novilhas que não fizeram estro e receberam o hormônio (59,10%) vs. não manifestaram e não receberam GnRH (48,20%) (MADUREIRA *et al.*, 2020) e 53,8% (estro e GnRH) vs. 37,9% (Controle) (CEDEÑO *et al.*, 2021a). Entretanto, em nosso estudo vacas que manifestaram estro tiveram maior P/IA, independente do tratamento (55,39% vs. 42,25%), também observado por outros autores (BARBOSA *et al.*, 2022b; CEDEÑO *et al.*, 2021b; CORTAT *et al.*, 2022). Além disso, vacas com ECC (4-4,5) tiveram maior P/IA no Experimento 2, porém o número amostral é pequeno (n=49, sendo GnRH; n = 21 e Controle; n=28) e são necessários mais estudos com o número maior de animais para confirmar esse dado.

A administração de GnRH possibilitou um incremento na fertilidade no Experimento 3, resultando em um acréscimo de 16% na P/IA em vacas taurinas de corte com cria ao pé. Resultados similares foram encontrados em estudos conduzidos com animais da raça Nelore, em que o incremento na P/IA foi de 13% (BARBOSA *et al.*, 2022a). Alguns estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar a aplicação de GnRH no momento da IATF em vacas que não manifestam estro (BISHOP *et al.*, 2017; CEDEÑO *et al.*, 2021b; HILL *et al.*, 2016), porém é necessário que seja feita a marcação na região sacral e avaliação do estro no dia da IATF para avaliar a necessidade ou não de aplicar o GnRH. A proposta deste estudo visa a eliminação da marcação com tinta, e conseqüentemente, avaliação no dia da inseminação, porém com um manejo a mais a ser realizado 14h antes da IATF. Portanto, o incremento na prenhez observado por Barbosa *et al.* (BARBOSA *et al.*, 2022a) em vacas zebuínas de corte justificou a adição de um manejo no protocolo, o que foi observado em uma das fazendas do nosso estudo em que se testou o GnRH (Experimento 3). No entanto, foi utilizado protocolo diferente dos demais experimentos, em que no D0 utilizou-se o 17 $\beta$  estradiol associado com P4 injetável. Em vacas *Bos indicus*, testou-se a hipótese de que a associação desses dois hormônios poderia induzir o surgimento de uma onda folicular mais precoce, aumentando o diâmetro do folículo pré-ovulatório e as taxas de prenhez na IATF. Foi observado que a taxa

de crescimento do folículo dominante no grupo 17b e P4 foi maior no D9 do que no grupo que foi utilizado somente BE, e em primíparas melhorou a P/IA (ROCHA *et al.*, 2022).

Em nosso estudo, não foi possível realizar avaliações ovarianas no Experimento 3 (17b+P4). Mais estudos precisam ser realizados para entender o que acontece em relação à dinâmica folicular dessas vacas tratadas com 17b e, se o motivo de termos melhores taxas de prenhez está associado ou não ao maior diâmetro do folículo pré-ovulatório, ou seja, por ser mais responsivo ao GnRH. Portanto, o incremento na P/IA não foi observado no Experimento 1, somente tendo um efeito positivo no Experimento 3. Esse incremento na fertilidade também pode estar associado à população e diâmetro folicular das diferentes raças, em que fêmeas taurinas iniciam a divergência folicular aos 8,5 a 9 mm (GINTHER *et al.*, 1996; SARTORI *et al.*, 2001) e as zebuínas entre 5 e 6 mm (CARVALHO *et al.*, 2008). Além disso, novilhas de corte taurinas possuem capacidade ovulatória a partir dos 9 mm (MARTINEZ *et al.*, 1999) e a maior capacidade de concepção foi observada quando as novilhas ovulam folículos entre 10,7 mm e 15,7 mm de diâmetro (DALTON *et al.*, 2001); (PERRY *et al.*, 2007).

## **5. Conclusão**

Coletivamente, não foi observado efeito aditivo de GnRH na indução da ovulação e em taxa de concepção em comparação ao uso isolado de CE. Ressalta-se que a taxa de ovulação é elevada com o uso de CE. O uso de GnRH parece promover incremento da P/IA quando é usado 17b para regressão folicular e indução de nova onda folicular; no entanto, mais estudos são necessários, uma vez que o experimento foi realizado somente em uma propriedade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, I. P. et al. **GnRH34: An alternative for increasing pregnancy in timed AI beef cows** *Theriogenology*, 2022.

BARUSELLI, P. et al. importancia do emprego de eCG em protocolos de IA , TE e IATF. **III Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, n. January, 2008.

BD, M.; SD, M. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrine reviews**, v. 12, n. 1, p. 27–44, 1991.

BISHOP, B. E. et al. Split-time artificial insemination in beef cattle: II. Comparing pregnancy rates among nonestrous heifers based on administration of GnRH at AI. **Theriogenology**, v. 87, p. 229–234, 2017.

BO, G. A. et al. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 31–40, 1995.

BÓ, G. A. et al. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 388–396, 2016.

BÓ, G. A. Pursuit of a means of manipulating ovarian function in the cow: An adventure of serendipity, collaboration and friendship. **Theriogenology**, v. 150, p. 480–489, 2020.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Animal**, v. 8, n. SUPPL. 1, p. 144–150, 2014.

BÓ, G. A.; CEDEÑO, A. Expression of estrus as a relevant factor in fixed-time embryo transfer programs using estradiol/progesterone-based protocols in cattle. **Animal Reproduction**, v. 15, n. 3, p. 224–230, 2018.

CARVALHO, N. A. T. et al. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. v. 69, p. 852–858, 2008.

CEDEÑO, A. V. et al. Effect of expression of estrus and treatment with GnRH on pregnancies per AI in beef cattle synchronized with an estradiol/progesterone-based protocol. **Theriogenology**, v. 161, p. 294–300, 2021.

CORTAT, P. R. et al. Effect of GnRH treatment at the time of artificial insemination on fertility of *Bos indicus* ( Nelore ) beef cows. v. 19, p. 20220070, 2022.

D'AVILA, C.A.; MORAES, F.P.; JR, T.L.; GASPERIN, G. **Efeito da prostaglandina e anti-inflamatório não esteroideal na ovulação de bovinos** *Αγαη*, 2019a. Disponível em: <<https://wp.ufpel.edu.br/ppgveterinaria/files/2019/09/Camila-Amaral-DAvila.pdf>>

D'AVILA, C.A.; MORAES, F.P.; JR, T.L.; GASPERIN, G. Hormônios utilizados na indução da ovulação em bovinos – Artigo de revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, p. 797–802, 2019b.

DAHLEN, C.; LARSON, J.; LAMB, G. C. Impacts of reproductive technologies on beef production in the united states. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 752, p. 97–114, 2014.

- DALTON, J. C. et al. Effect of Time of Insemination on Number of Accessory Sperm , Fertilization Rate , and Embryo Quality in Nonlactating Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 11, p. 2413–2418, 2001.
- DOROTEU, E. M.; OLIVEIRA, R. A. DE; PIVATO, I. Avaliação de diferentes doses de eCG na ressincronização da ovulação em vacas nelore lactantes submetidas à IATF. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 16, n. 2, p. 449–457, 2015.
- FORTUNE, J. E.; SIROIS, J.; QUIRK, S. M. The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. **Theriogenology**, v. 29, n. 1, p. 95–109, 1988.
- FRANÇA, L. M. et al. Comparison of two esters estradiol as inductors on ovulation follicular diameter and pregnancy rate of dairy cattle subject to program of FTAI. **Revista Brasileira de Saude e Producao Animal**, v. 16, n. 4, p. 958–965, 2015.
- GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1187–1194, 1996.
- HILL, S. L. et al. Gonadotropin-releasing hormone increased pregnancy risk in suckled beef cows not detected in estrus and subjected to a split-time artificial insemination program. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 9, p. 3722–3728, 2016.
- KASTELIC, J. R. et al. Melengestrol acetate and estradiol-17 $\beta$  for synchronizing estrus and improving reproductive performance in beef cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 77, n. 4, p. 683–688, 1997.
- LEONARDI, C. E. P. et al. Prostaglandin F2 $\alpha$  promotes ovulation in prepubertal heifers. **Theriogenology**, v. 78, n. 7, p. 1578–1582, 2012.
- MADUREIRA, G. et al. Progesterone-based timed AI protocols for *Bos indicus* cattle II: Reproductive outcomes of either EB or GnRH-type protocol, using or not GnRH at AI. **Theriogenology**, v. 145, p. 86–93, 2020.
- MARTINEZ, M. F. et al. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 57, n. 1–2, p. 23–33, 1999.
- MOROTTI, F. et al. Injectable progesterone in timed artificial insemination programs in beef cows. p. 17–22, 2018.
- NISWENDER, G. D. et al. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1–29, 2000.
- PANCARCI, S. M. et al. Use of estradiol cypionate in a presynchronized timed artificial insemination program for lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 1, p. 122–131, 2002.
- PERRY, G. A. et al. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 3, p. 684–689, 2007.
- PFEIFER, L. F. M. et al. The use of PGF2 $\alpha$  as ovulatory stimulus for timed artificial insemination in cattle. **Theriogenology**, v. 81, n. 5, p. 689–695, 2014.
- PUGLIESI, G. et al. Improved fertility in suckled beef cows ovulating large follicles or supplemented with long-acting progesterone after timed-AI. **Theriogenology**, v. 85, n. 7, p.

1239–1248, 2016.

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

ROCHA, C. C. et al. Comparing the effect of estradiol benzoate and 17 $\beta$ -estradiol plus progesterone on follicular turnover and development, and pregnancy outcomes in a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 192, p. 73–80, 2022.

SÁ FILHO, M. F. et al. 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. **Animal Reproduction Science**, v. 120, n. 1–4, p. 23–30, 2010.

SALES, J. N. S. et al. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 510–516, 2012.

SARTORI, R. et al. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1403–1409, 2001.

SHEPARD, R. W.; MORTON, J. M.; NORMAN, S. T. Effects of administration of gonadotropin-releasing hormone at artificial insemination on conception rates in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 144, n. 1–2, p. 14–21, 2014.

SIMÕES, L. M. S. et al. Exposure to progesterone previous to the protocol of ovulation synchronization increases the follicular diameter and the fertility of suckled *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 116, p. 28–33, 2018.

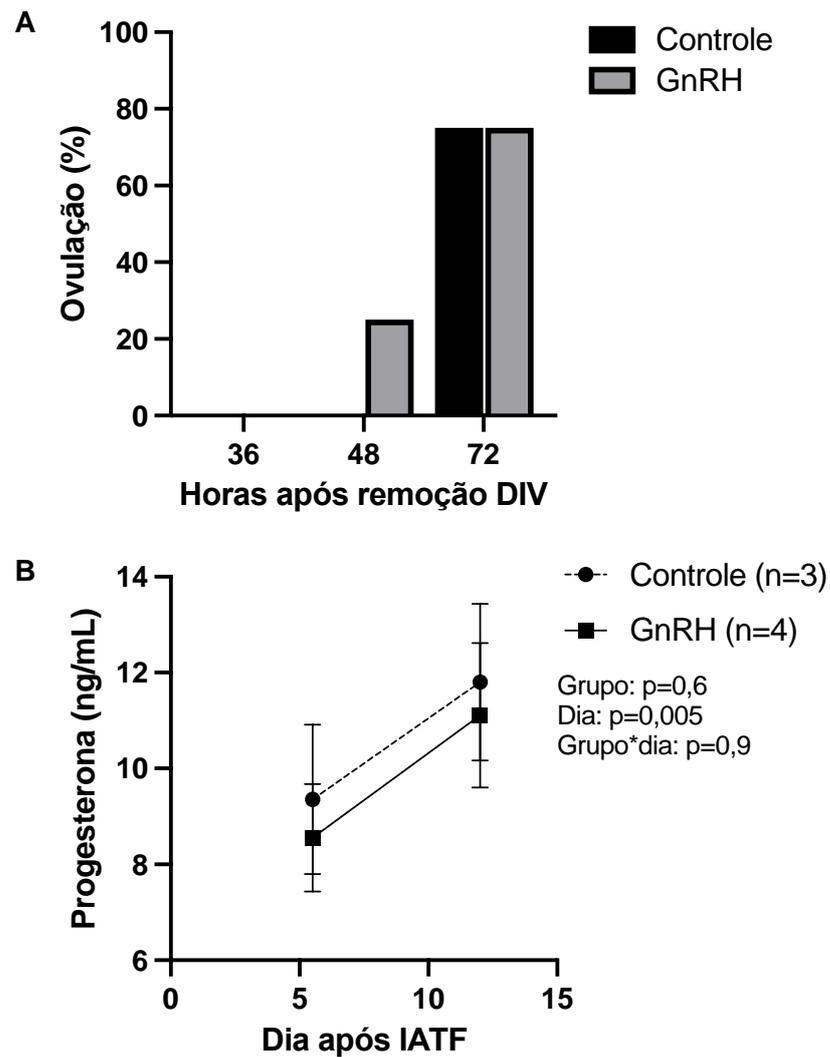
STEVENSON, J. S.; TIFFANY, S. M.; LUCY, M. C. Use of estradiol cypionate as a substitute for GnRH in protocols for synchronizing ovulation in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 10, p. 3298–3305, 2004.

**Tabela 1** - Avaliações ovarianas e concentração sérica de Progesterona (Experimento 2) em vacas sintéticas de corte tratadas com GnRH (GnRH) 34h após remoção do DIV ou Controle.

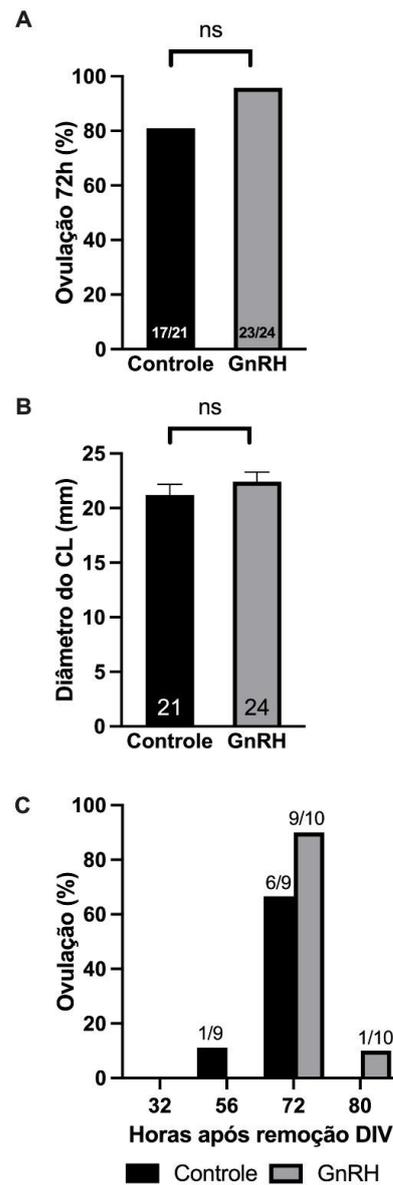
<b>Avaliação</b>	<b>Dia</b>	<b>Controle</b>	<b>GnRH</b>	<b>Valor - P</b>
<b>Lote 1 (Primíparas)</b>		n = 4	n = 7	
Diâmetro FPO (mm) <sup>b</sup>		11,27±0,64	11,88±0,62	0,5
Taxa de ovulação (72h) <sup>a</sup>		75% (3/4)	100% (7/7)	0,13
Diâmetro CL (mm)	7	19,85±0,53	20,10±0,75	0,8
	12	22,98±0,63	21,42±1,53	0,43
Concentração de P4 (ng/mL)	7	8,57±1,24	8,57±1,15	0,2
	12	12,85±1,27	13,98±1,86	0,2
<b>Lote 2 (Multíparas)</b>		n = 8	n = 8	
Diâmetro FPO (mm) <sup>b</sup>		12,39±0,82	12,34±0,53	0,4
Taxa de ovulação (72h) <sup>a</sup>		87,5 % (7/8)	100% (8/8)	0,3
Diâmetro CL (mm)	7	20,47±1,09	22,59±0,85	0,6
	12	21,33±1,18	23,09±2,11	0,8
Concentração de P4 (ng/mL)	7	5,34±0,69	6,75±1,20	0,3
	12	10,44±1,78	12,65±2,66	0,3
<b>Lote 3 (Multíparas)</b>		n = 9	n = 10	
Diâmetro FPO (mm) <sup>b</sup>		10,26±0,56	10,67±0,60	0,8
Taxa de ovulação (72h) <sup>a</sup>		77,8% (7/9)	90% (9/10)	0,4
Diâmetro CL (mm)	7	20,27±2,0	22,08±1,54	0,4
Concentração de P4 (ng/mL)	7	9,80±0,60	9,85±0,76	0,9

<sup>a</sup> Horas após a retirada do DIV.

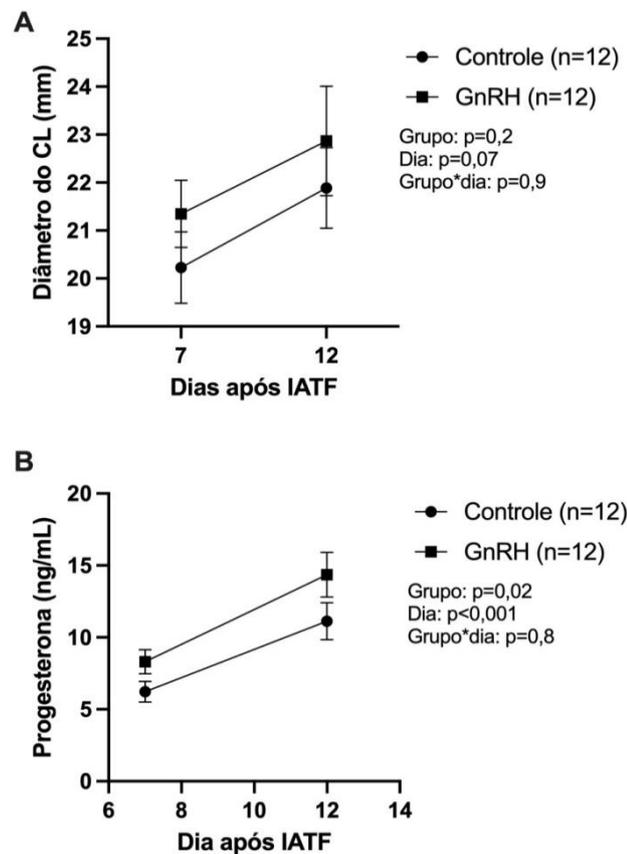
<sup>b</sup> Diâmetro do folículo pré-ovulatório (FPO) no momento do tratamento.



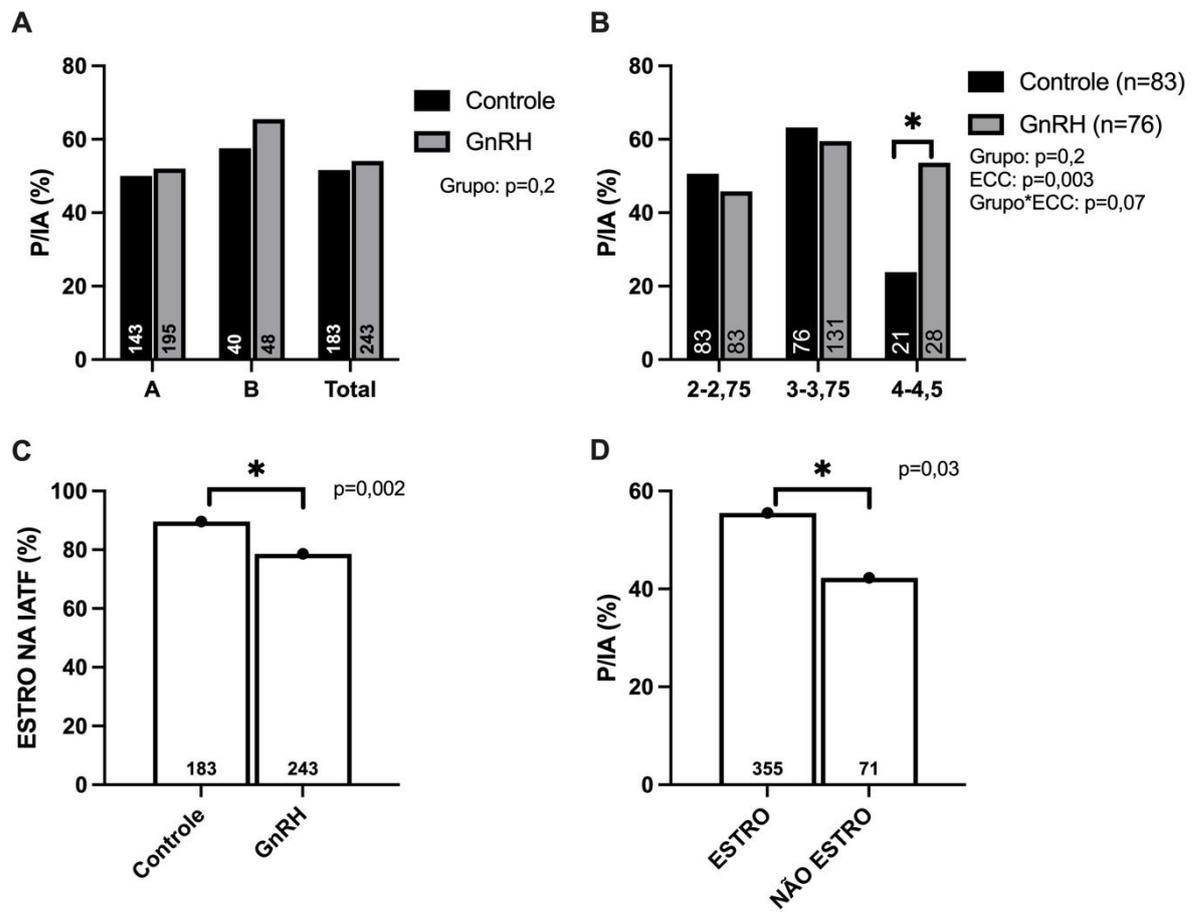
**Figura 1** - Avaliações ovarianas do Experimento Piloto em vacas secas das raças Jersey e Holandesa tratadas com GnRH (Grupo GnRH;  $n=4$ ) 34 horas após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona (DIV) ou não tratadas (Grupo Controle;  $n=4$ ). A) Taxa de ovulação 0h, 36h, 48h e 72h após remoção do DIV nos Grupos Controle e GnRH ( $p=0,2$ ; ns). B) Concentração sérica de progesterona dos Grupos Controle e GnRH nos dias 5,5 e 12 após IATF.



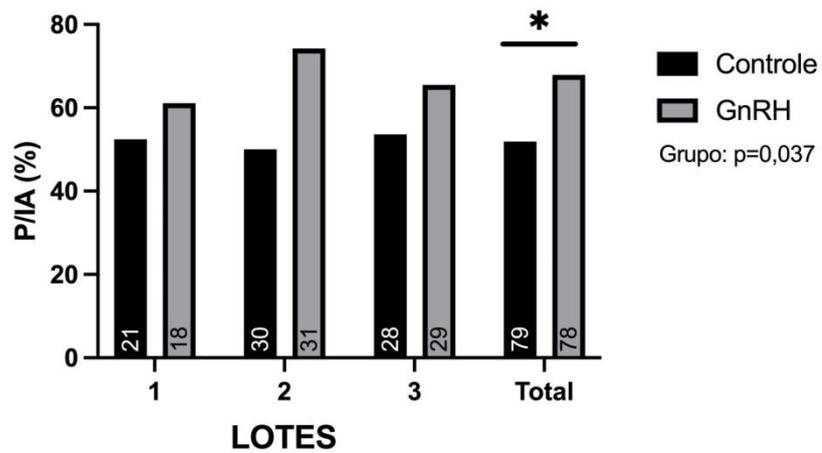
**Figura 2** - Avaliações ovarianas do Experimento 1 em vacas com cria ao pé da raça Brangus tratadas com GnRH (Grupo GnRH; n=24) 34 horas após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona (DIV) ou não tratadas (Grupo Controle; n=22). A) Taxa de ovulação até 72 horas após remoção do DIV nos Grupos GnRH e Grupo Controle ( $p=0,1$ ; ns). B) Diâmetro do corpo lúteo (CL) nos dias 7 e 12 após IATF nos Grupos GnRH e Controle ( $p=0,4$ ; ns). C) Taxa de ovulação em 32h, 56h, 72h e 80h após a remoção do DIV (lote 3) nos Grupos Controle (n=9) e GnRH (n=10), considerando todas as vacas. Não foram observadas ovulações em 2 vacas do Grupo Controle (22,2%).



**Figura 3-** Função luteal de vacas com cria ao pé da raça Brangus tratadas com GnRH (Grupo GnRH; n=12) 34 horas após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona (DIV) ou não tratadas (Grupo Controle; n=12) do Experimento 2. A) Diâmetro do CL após remoção do DIV nos Grupos GnRH e Grupo Controle (p=0,1). B) Diâmetro do corpo lúteo (CL) nos dias 11 e 12 após IATF nos Grupos GnRH e Controle (p=0,4). Experimento 1, lotes 1 e 2. A) Diâmetro do CL teve efeito positivo em relação ao dia (7 e 12; p=0,07) mas não em relação ao tratamento. B) Progesterona teve efeito positivo em relação ao dia da coleta (7 e 12; p<0,001), mas não em relação ao grupo de tratamento.



**Figura 4** - Experimento 2. A) Taxa de concepção (P/IA) nos Grupos Controle e GnRH nas Fazendas A e B. B) Taxa de concepção (P/IA) nos Grupos Controle e GnRH, categorizados em Escores de Condição Corporal. C) Manifestação de estro na IATF nos Grupos Controle e GnRH. D) Taxa de concepção (P/IA) conforme manifestação de estro na IATF.



**Figura 5** - Taxa de concepção (P/IA) de lotes de vacas taurinas com cria ao pé tratadas com GnRH (Grupo GnRH; n=78) 34 horas após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona (DIV) ou não tratadas (Grupo Controle; n=79) no Experimento 3. Os animais foram sincronizados com 17B e progesterona injetável no início do protocolo.

#### 4 CONCLUSÃO

Em resumo, verificou-se que não houve diferença na função luteal de vacas tratadas ou não com o GnRH; o GnRH não aumentou a taxa de concepção em vacas sincronizadas com protocolo convencional (P4 e BE) em relação aos animais que receberam somente CE como indutor de ovulação. No entanto, vacas que receberam GnRH tiveram maior P/IA quando comparado ao grupo Controle quando associado a um protocolo com 17b e progesterona injetável; vacas que manifestaram estro independente do tratamento tiveram maior P/IA.

Coletivamente, os resultados do presente estudo nos permitem concluir que não há benefício na adição de GnRH como indutor de ovulação ao protocolo de IATF com CE; visto que não houve incremento na função luteal e na P/IA de vacas taurinas e sintéticas tratadas com GnRH. Além disso, mais estudos são necessários para confirmar a interação entre o uso do GnRH associado a um protocolo com 17b e progesterona injetável, visto que houve um incremento na fertilidade quando se utilizou o 17b estradiol no início do protocolo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTONIAZZI, A. Q. et al. Função do interferon-tau durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes. *Ciência Rural*, v. 41, n. 1, p. 176–185, 2011.
- BALL, P. J. H.; PETERS, A. R. *Reproduction in Cattle: Third Edition*. [s.l.: s.n.], 2007.
- BARBOSA, I. P. et al. **GnRH34: An alternative for increasing pregnancy in timed AI beef cows** *Theriogenology*, 2022.
- BARUSELLI, P. et al. importância do emprego de eCG em protocolos de IA, TE e IATF. **III Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, n. January, 2008.
- BD, M.; SD, M. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrine reviews**, v. 12, n. 1, p. 27–44, 1991.
- BISHOP, B. E. et al. Split-time artificial insemination in beef cattle: II. Comparing pregnancy rates among nonestrous heifers based on administration of GnRH at AI. **Theriogenology**, v. 87, p. 229–234, 2017.
- BO, G. A. et al. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 31–40, 1995.
- BÓ, G. A. et al. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 388–396, 2016.
- BÓ, G. A. Pursuit of a means of manipulating ovarian function in the cow: An adventure of serendipity, collaboration and friendship. **Theriogenology**, v. 150, p. 480–489, 2020.
- BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Animal**, v. 8, n. SUPPL. 1, p. 144–150, 2014.
- BÓ, G. A.; CEDEÑO, A. Expression of estrus as a relevant factor in fixed-time embryo transfer programs using estradiol/progesterone-based protocols in cattle. **Animal Reproduction**, v. 15, n. 3, p. 224–230, 2018.
- CARVALHO, N. A. T. et al. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. v. 69, p. 852–858, 2008.
- CEDEÑO, A. V. et al. Effect of expression of estrus and treatment with GnRH on pregnancies per AI in beef cattle synchronized with an estradiol/progesterone-based protocol. **Theriogenology**, v. 161, p. 294–300, 2021.
- CORTAT, P. R. et al. Effect of GnRH treatment at the time of artificial insemination on fertility of *Bos indicus* (Nelore) beef cows. v. 19, p. 20220070, 2022.
- D'AVILA, C.A.; MORAES, F.P.; JR, T.L.; GASPERIN, G. **Efeito da prostaglandina e anti-inflamatório não esteroide na ovulação de bovinos**  $\text{\u0391}\gamma\alpha\eta$ , 2019a. Disponível em: <<https://wp.ufpel.edu.br/ppgveterinaria/files/2019/09/Camila-Amaral-DAvila.pdf>>
- D'AVILA, C.A.; MORAES, F.P.; JR, T.L.; GASPERIN, G. Hormônios utilizados na indução da ovulação em bovinos – Artigo de revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, p. 797–802, 2019b.

- DAHLEN, C.; LARSON, J.; LAMB, G. C. Impacts of reproductive technologies on beef production in the united states. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 752, p. 97–114, 2014.
- DALTON, J. C. et al. Effect of Time of Insemination on Number of Accessory Sperm , Fertilization Rate , and Embryo Quality in Nonlactating Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 11, p. 2413–2418, 2001.
- DOROTEU, E. M.; OLIVEIRA, R. A. DE; PIVATO, I. Avaliação de diferentes doses de eCG na resincronização da ovulação em vacas nelore lactantes submetidas à IATF. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 16, n. 2, p. 449–457, 2015.
- FORTUNE, J. E.; SIROIS, J.; QUIRK, S. M. The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. **Theriogenology**, v. 29, n. 1, p. 95–109, 1988.
- FRANÇA, L. M. et al. Comparison of two esters estradiol as inductors on ovulation follicular diameter and pregnancy rate of dairy cattle subject to program of FTAI. **Revista Brasileira de Saude e Producao Animal**, v. 16, n. 4, p. 958–965, 2015.
- GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1187–1194, 1996.
- HILL, S. L. et al. Gonadotropin-releasing hormone increased pregnancy risk in suckled beef cows not detected in estrus and subjected to a split-time artificial insemination program. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 9, p. 3722–3728, 2016.
- KASTELIC, J. R. et al. Melengestrol acetate and estradiol-17 $\beta$  for synchronizing estrus and improving reproductive performance in beef cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 77, n. 4, p. 683–688, 1997.
- LEONARDI, C. E. P. et al. Prostaglandin F $2\alpha$  promotes ovulation in prepubertal heifers. **Theriogenology**, v. 78, n. 7, p. 1578–1582, 2012.
- MADUREIRA, G. et al. Progesterone-based timed AI protocols for Bos indicus cattle II: Reproductive outcomes of either EB or GnRH-type protocol, using or not GnRH at AI. **Theriogenology**, v. 145, p. 86–93, 2020.
- MARTINEZ, M. F. et al. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 57, n. 1–2, p. 23–33, 1999.
- MOROTTI, F. et al. Injectable progesterone in timed artificial insemination programs in beef cows. p. 17–22, 2018.
- NISWENDER, G. D. et al. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1–29, 2000.
- PANCARCI, S. M. et al. Use of estradiol cypionate in a presynchronized timed artificial insemination program for lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 1, p. 122–131, 2002.
- PERRY, G. A. et al. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 3, p. 684–689, 2007.
- PFEIFER, L. F. M. et al. The use of PGF $2\alpha$  as ovulatory stimulus for timed artificial

insemination in cattle. **Theriogenology**, v. 81, n. 5, p. 689–695, 2014.

PUGLIESI, G. et al. Improved fertility in suckled beef cows ovulating large follicles or supplemented with long-acting progesterone after timed-AI. **Theriogenology**, v. 85, n. 7, p. 1239–1248, 2016.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF $2\alpha$  and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915–923, 1995.

ROCHA, C. C. et al. Comparing the effect of estradiol benzoate and 17 $\beta$ -estradiol plus progesterone on follicular turnover and development, and pregnancy outcomes in a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 192, p. 73–80, 2022.

SÁ FILHO, M. F. et al. 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. **Animal Reproduction Science**, v. 120, n. 1–4, p. 23–30, 2010.

SALES, J. N. S. et al. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 510–516, 2012.

SARTORI, R. et al. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1403–1409, 2001.

SHEPHARD, R. W.; MORTON, J. M.; NORMAN, S. T. Effects of administration of gonadotropin-releasing hormone at artificial insemination on conception rates in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 144, n. 1–2, p. 14–21, 2014.

SIMÕES, L. M. S. et al. Exposure to progesterone previous to the protocol of ovulation synchronization increases the follicular diameter and the fertility of suckled *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 116, p. 28–33, 2018.

STEVENSON, J. S.; TIFFANY, S. M.; LUCY, M. C. Use of estradiol cypionate as a substitute for GnRH in protocols for synchronizing ovulation in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 10, p. 3298–3305, 2004.

WILTBANK, M. C.; PURSLEY, J. R. The cow as an induced ovulator: Timed AI after synchronization of ovulation. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 170–185, 2014.