

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Veterinária**



Dissertação

**GnRH34 com ou sem cipionato de estradiol na IATF de vacas *Bos indicus***

**Samira Alves de Souza Silva**

Pelotas, 2024

**Samira Alves de Souza Silva**

**GnRH34 com ou sem cipionato de estradiol na IATF de vacas *Bos indicus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Reprodução e Patologia Animal).

Orientador: Rafael Gianella Mondadori

Co-orientador: Luiz Francisco Machado Pfeifer

Pelotas, 2024

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação da Publicação

S586g Silva, Samira Alves de Souza

GnRH34 com ou sem cipionato de estradiol na IATF de vacas *Bos indicus* [recurso eletrônico] / Samira Alves de Souza Silva ; Rafael Gianella Mondadori, orientador ; Luiz Francisco Machado Pfeifer, coorientador. — Pelotas, 2024.  
65 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2024.

1. Gado de corte. 2. Fertilidade. 3. Prenhez. 4. Ovulação. I. Mondadori, Rafael Gianella, orient. II. Pfeifer, Luiz Francisco Machado, coorient. III. Título.

CDD 636.21308245

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Samira Alves de Souza Silva

GnRH34 com ou sem cipionato de estradiol na IATF de vacas *Bos indicus*

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 22/02/2024

Banca examinadora:

Prof. Dr. Rafael Gianella Mondadori (Orientador)  
Doutor em Biologia Celular pela Universidade de Brasília

Prof. Dr. Eduardo Schmitt  
Doutor em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Fabiane Pereira de Moraes  
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Sergio Farias Vargas Junior  
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

## **Dedicatória**

**A Deus e à todas as pessoas que estiveram ao meu lado durante todo esse processo de aprendizado, essa conquista só se concretiza por que tive o amor e apoio de vocês!**

## **Agradecimentos**

As palavras nunca serão suficientes para demonstrar toda minha gratidão. Fica aqui, uma tentativa de expressá-la. Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida, pela sua graça e misericórdia, que foram demonstradas através do seu amor, que sempre me sustentou em todos os bons e maus momentos, e pelo cumprimento de todas as Suas promessas que me trouxeram até aqui.

Agradeço aos meus pais pelo amor incondicional e por todo o suporte que me deram ao decorrer dessa caminhada. À minha mãe, por ser a minha amiga e me ajudar a enfrentar todas as minhas inseguranças e medos. Ao meu pai, por sempre demonstrar seu amor de uma maneira singular, e se orgulhar do caminho profissional que escolhi seguir. Aos meus irmãos por sempre estarem presentes me incentivando e demonstrando o seu amor através de atos de serviços.

Agradeço a todos os meus amigos e amigas que me apoiaram nessa decisão de iniciar o mestrado, e se empolgaram junto comigo quando novas oportunidades surgiram, sempre me falando palavras que me faziam sentir mais confiante mesmo nos meus momentos de maior fragilidade e dificuldade de acreditar que eu conseguiria me tornar a profissional que eu sonhava ser no decorrer dessa jornada. Obrigada por terem sido a rede de apoio que eu precisava ter, e por tornarem a minha vida mais leve a cada encontro, com risadas e descontrações, essas pausas e encontros fizeram com que a escrita fosse mais fácil entre um parágrafo e outro.

Agradeço aos meus colegas de trabalho da Embrapa Rondônia, por toda a paciência e por insistirem em ensinar, isso só me mostrou o quão afortunada eu sou por ter tido pessoas tão extraordinárias ao meu lado, e que com certeza, levarei para a minha vida mesmo após o encerramento dessa etapa. Agradeço também, a equipe de trabalho da Fazenda Areia Branca, por toda a parceria e apoio para a realização desse trabalho.

Agradeço ao meu orientador, Rafael Mondadori, por sua imensa paciência ao me ensinar e por demonstrar que somos capazes de alcançar todos os nossos sonhos

e desejos. Agradeço por aceitar me orientar e pela oportunidade de trabalharmos juntos. Sua orientação foi fundamental para perceber a importância de ser um profissional dedicado à busca por uma qualidade de ensino adequada. No tempo que convivemos, pude ver que o Sr. é alguém que se preocupa genuinamente e que procura fazer a diferença na docência e me sinto inspirada a colocar em prática todas essas virtudes. Sou grata pelo convívio ao longo desta jornada, e o reconheço como um exemplo e inspiração, não apenas como profissional, mas também como ser humano. Além disso, expresso minha gratidão aos colegas da Rede Fibra por todo apoio e companheirismo.

Agradeço ao meu outro orientador, Luiz Pfeifer, por ter sido alguém que me ensinou não somente a como ser uma boa profissional, dando seu exemplo de honestidade e idoneidade nesse tempo que estivemos juntos na realização desse trabalho, mas também por sempre se fazer acessível para ouvir (mesmo não sendo relacionado ao trabalho), e ajudar a enxergar com mais clareza o próximo passo a ser dado. Fica aqui por escrito, todo o meu agradecimento e admiração pelo orientador, professor, pai, e profissional que és.

Agradeço ao apoio financeiro da Capes (código de financiamento 001), CNPq (310932/2021-1; 305650/2022-0; 406866/2022-8; 303544/2022-88), FAPERGS (Edital RITEs 06/2021, 22/2551-0000391-5), FAPERÓ (Projeto Universal 0012.366568/2021-94) e EMBRAPA pela concessão da bolsa e por todo o suporte pra realização deste projeto.

***Há um tempo certo para todas as coisas. Há um momento apropriado para todo propósito debaixo do céu. Ele fez tudo apropriado ao seu tempo. O homem não tem vantagem alguma sobre os animais, ambos tem o mesmo espírito e o mesmo fôlego de vida, e tudo não passa de vaidade, porque tudo vem do pó e tudo retorna ao pó. Sendo assim, não há felicidade maior para o homem do que fazer o bem durante toda sua vida e desfrutar das recompensas pelo seu trabalho; porquanto, quem de nós tem o poder de saber o que vai acontecer depois da nossa morte?***

***Eclesiastes 3 – 1:22***



## Resumo

SILVA, Samira Alves de Souza. **GnRH34 com ou sem cipionato de estradiol na IATF de vacas *Bos indicus***. 2024. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

A sincronia entre a ovulação e a inseminação artificial (IA) é um dos principais fatores para melhorar os índices de prenhez em protocolos hormonais para uso da inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Visando melhorar esta sincronia, dois experimentos foram realizados para avaliar os efeitos do tratamento com GnRH na fertilidade de vacas Nelore pós-parto tratadas com protocolo baseado em estradiol/progesterona (E2/P4) para IATF. O Experimento 1 foi realizado para comparar o efeito do GnRH administrado 34 h após a progesterona isoladamente (GnRH34); e associado com cipionato de estradiol (CE-GnRH34) no momento da ovulação, na produção de progesterona e vascularização do corpo lúteo. Vacas Nelore pós-parto (n = 26) foram tratadas com 2 mg de benzoato de estradiol (BE) e DIV contendo 1 g de P4. Após 8 dias, o DIV foi removido, e todas as vacas foram tratadas com 150 mg de d-cloprostenol (análogo da prostaglandina F2 alfa) e 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG), além de terem a base da cauda pintada para detecção de estro. Nesse momento foram distribuídas aleatoriamente para receber: 1) solução salina 0,9% i.m. (grupo GnRH34, n = 13) ou 2) 0,6 mg i.m. de CE (grupo CE-GnRH34, n = 13). No dia 9 (17:00), todas as vacas receberam análogo de GnRH (10,5 µg de acetato de busarelina) i.m. O status do folículo dominante foi acompanhado por ultrassonografia transretal em intervalos de 12 horas, desde a remoção do DIV até a ovulação. O momento da ovulação e a proporção de vacas que ovularam foi similar ( $P > 0,05$ ) entre os grupos, e não houveram diferenças quanto as características do CL e produção de P4. O Experimento 2 foi realizado para avaliar a eficácia dos protocolos GnRH34 e CE-GnRH34 na fertilidade de vacas Nelore pós-parto. Além disso, esses tratamentos foram comparados com o protocolo CE-GnRH48, no qual as vacas receberam CE na remoção do DIV, enquanto aquelas que não manifestaram estro, receberam GnRH na IATF. As vacas (n = 981) foram submetidas ao mesmo protocolo descrito no Experimento 1. Assim, neste experimento, os grupos consistiram de GnRH34 (n = 322), CE-GnRH34 (n = 335) e CE-GnRH48 (n = 324). Uma maior ( $P < 0,05$ ) taxa de expressão de estro foi observada em vacas tratadas com CE após remoção do DIV (CE-GnRH34: 69%, CE-GnRH48: 64,8%) do que em vacas do grupo GnRH34 (45,6%). A P/IA no grupo CE-GnRH34 (64,2%; 215/335) tendeu ( $P = 0,1$ ) a ser maior que no grupo GnRH34 (58%; 187/322), não sendo observada essa tendência entre esses grupos e o CE-GnRH48 (59,9%; 194/324).. Embora não tenham sido detectadas diferenças na sincronia da ovulação entre os grupos, a P/IA em vacas tratadas com CE e GnRH 34 h após a remoção da DIV tendeu a ser maior do que em vacas tratadas apenas com GnRH34. Portanto, dado que a P/IA não diferiu entre os grupos CE-GnRH34 e CE-GnRH48, nossos resultados sugerem que o protocolo de melhor custo-benefício consiste na

administração de CE no momento da remoção da DIV seguida de tratamento com GnRH no momento da IATF nas vacas que não manifestaram estro.

**Palavras-chave:** gado de corte; fertilidade; prenhez; ovulação.

## Abstract

SILVA, Samira Alves de Souza. **GnRH34 with or without estradiol cypionate in timed AI in *Bos indicus* beef cows.** 2024. 65s. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

The synchrony between ovulation artificial insemination (AI) is one of the main factors to improve pregnancy rates in hormonal protocols for the use of fixed-time artificial insemination (FTAI). Aiming to improve this synchrony, two experiments were conducted to evaluate the effects of GnRH treatment on the fertility of postpartum Nelore cows treated with a protocol based on estradiol/progesterone (E2/P4) for FTAI. Experiment 1 was carried out to compare the effect of GnRH administered 34 h after progesterone alone (GnRH34); and associated with estradiol cypionate (CE-GnRH34) at the time of ovulation, in the production of progesterone and vascularization of the corpus luteum. Postpartum Nelore cows (n = 26) were treated with 2 mg of estradiol benzoate (EB) and IPD containing 1 g of P4. After 8 days, the IPD were removed, and all cows were treated with 150 mg of d-cloprostenol (prostaglandin F2 alpha analogue) and 300 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG), in addition to having the base of the tail painted for estrus detection. At this time, they were randomly distributed to receive: 1) 0.9% saline solution i.m. (GnRH34 group, n = 13) or 2) 0.6 mg i.m. of EC (EC-GnRH34 group, n = 13). On day 9 (17:00), all cows received a GnRH analogue (10.5 mg of buserelin acetate) i.m. The status of the dominant follicle was monitored by transrectal ultrasonography at 12-hour intervals, from the removal of the IPD until ovulation. The time of ovulation and the proportion of cows that ovulated were similar ( $P > 0.05$ ) between the groups, and there were no differences regarding CL characteristics and P4 production. Experiment 2 was conducted to evaluate the efficacy of the GnRH34 and EC-GnRH34 protocols on the fertility of postpartum Nelore cows. In addition, these treatments were compared with the EC-GnRH48 protocol, in which the cows received EC at the removal of the IPD, while those that did not show estrus, received GnRH at FTAI. The cows (n = 981) underwent the same protocol described in Experiment 1. Thus, in this experiment, the groups consisted of GnRH34 (n = 322), EC-GnRH34 (n = 335) and EC-GnRH48 (n = 324). A higher ( $P < 0.05$ ) rate of estrus expression was observed in cows treated with EC after removal of the IPD (EC-GnRH34: 69%, EC-GnRH48: 64.8%) than in cows in the GnRH34 group (45.6%). The P/AI in the EC-GnRH34 group (64.2%; 215/335) tended ( $P = 0.1$ ) to be higher than in the GnRH34 group (58%; 187/322), this trend was not observed between these groups and the EC-GnR48 (59.9%; 194/324). Although no differences in ovulation synchrony were detected between groups, P/AI in cows treated with CE and GnRH 34 h after IVD removal tended to be higher than in cows treated with GnRH alone<sup>34</sup>. Therefore, given that P/AI did not differ between the CE-GnRH34 and CE-GnRH48 groups, our results suggest that the most cost-effective protocol consists of administering CE at the time of IVD removal followed by GnRH treatment at the time IATF in cows that did not show estrus.

**Keywords:** beef cattle; fertility; pregnancy; ovulation.

## Lista de Figuras

- Figura 1 Distribuição e porcentagem de vacas Nelore pós-parto ovulando após retirada do DIV tratadas com GnRH34 ou CE-GnRH34 para indução da ovulação (Experimento 1). Todas as vacas foram tratadas com GnRH 34 horas após a remoção do DIV. Entretanto, apenas vacas do grupo CE-GnRH34 foram tratadas com 0,6 mg de CE na remoção da DIV..... 56
- Figura 2 Características do corpo lúteo (CL) e concentração plasmática de progesterona em vacas Nelore pós-parto tratadas com GnRH34 ou CE-GnRH34 para indução da ovulação (Experimento 1). Os dados são média  $\pm$  EP. (A) Área de tecido lúteo (ATL); (B) quantidade de fluxo sanguíneo para o CL (FSCL); (C) relação FSCL:ATL (FSCL ajustado em %) e (D) concentração plasmática de progesterona..... 56
- Figura 3 Prenhez por IA em vacas Nelore pós-parto de acordo com tratamento (GnRH34, CE-GnRH34 e CE-GnRH48) e expressão de estro na IATF (Experimento 2). Letras diferentes indicam efeito entre tratamentos ( $P < 0,05$ ). O número de vacas prenhes e o número total de vacas por tratamento estão representados em cada barra..... 57

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Número de vacas em cada categoria, ECC, e intervalo médio entre parto-IATF de acordo com o grupos do Experimento 2.....	52
Tabela 2	Respostas ovarianas em vacas Nelore pós-parto tratadas com GnRH34 ou CE-GnRH34 para indução da ovulação no Experimento 1. Todas as vacas foram tratadas com GnRH 34 horas após a remoção do DIV. Entretanto, somente vacas do grupo CE-GnRH34 foram tratadas com 0,6 mg de CE na remoção do DIV.....	53
Tabela 3	Prenhez por inseminação artificial (IA) de acordo com fazenda, sêmen do touro utilizado para IATF, escore de condição corporal (ECC) avaliado pelo aparelho Vetscore e intervalo parto-IATF no Experimento 2.....	54
Tabela 4	Taxa de expressão de estro na IATF e prenhez por IA de acordo com tratamento (GnRH34, CE-GnRH34 e CE-GnRH48) e categoria animal (primíparas e múltiparas). Vacas do grupo GnRH34 não foram tratadas com CE na remoção do DIV e foram tratadas com GnRH 34h depois. Apenas vacas dos grupos CE-GnRH34 e CE-GnRH48 foram tratadas com CE na remoção da DIV; entretanto, vacas CE-GnRH34 foram tratadas com GnRH 34 horas depois. No grupo CE-GnRH48, apenas as vacas que não expressaram estro receberam GnRH na IATF.....	55

## Lista de Abreviaturas e Siglas

aCAMP	Adenosina monofosfato cíclica
AC	Enzima adenil-ciclase
ATP	Adenosina trifosfato
AVPV	Área periventricular anteroventral
BE	Benzoato de estradiol
CE	Cipionato de estradiol
CL	Corpo lúteo
DIV	Dispositivo intravaginal de progesterona
E2	Estradiol
ECC	Escore de condição corporal
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
FSH	Hormônio folículo estimulante
FSHr	Receptores do hormônio folículo estimulante
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GnRHR	Receptores do hormônio liberador de gonadotrofinas
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo-fixo
LH	Hormônio Luteinizante
LHr	Receptores do hormônio luteinizante
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina F dois alfa
SNC	Sistema nervoso central
VE	Valerato de estradiol

## Sumário

<b>1 Introdução.....</b>	<b>17</b>
<b>2 Revisão da Literatura.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Ciclo estral e desenvolvimento folicular.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Inseminação Artificial em tempo fixo - IATF .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3 Fármacos utilizados nos protocolos de IATF.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3.1 Prostaglandinas.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3.2 Progestágenos.....</b>	<b>24</b>
<b>2.3.3 Estrógenos.....</b>	<b>25</b>
<b>2.3.4 Gonadotrofina coriônica equina.....</b>	<b>26</b>
<b>2.4 Hormônio liberador de gonadotrofinas e seus análogos .....</b>	<b>27</b>
<b>2.5 Papel do estradiol no pico pré-ovulatório de GnRH/LH.....</b>	<b>32</b>
<b>3 Artigo.....</b>	<b>34</b>
<b>4 Considerações Finais.....</b>	<b>58</b>
<b>Referências.....</b>	<b>59</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>65</b>



## 1 Introdução

Notadamente nas duas últimas décadas o Brasil saiu da condição de importador da maioria dos produtos agropecuários passando a ocupar espaço de destaque no agronegócio mundial. Apresenta-se como detentor do maior rebanho bovino comercial do mundo, contando com mais de 234,3 milhões de cabeças de gado (IBGE, 2022). No ano de 2022, o produto interno bruto brasileiro alcançou a marca de 9,9 trilhões de reais, desse total, o agronegócio movimentou cerca 2,4 trilhões, e a indústria de carne bovina movimentou 1,02 trilhão (ABIEC, 2023). O país corresponde às expectativas de demanda e sanidade do comércio, ocupando uma posição estratégica entre os grandes fornecedores mundiais. Em 2022, o total de carne produzida foi de 10,79 milhões de toneladas equivalente carcaça – TEC, desse total cerca de 71,48% (7,78 milhões TEC) foi destinado ao mercado interno, ao passo que 27,9% (3,02 milhões TEC) foi destinado à exportação, do total exportado, 2,59 milhões TEC foram de carne *in natura* (ABIEC, 2023).

O Nelore constitui-se na principal raça bovina criada no Brasil, representando cerca de 80% do rebanho nacional, sendo determinante no fornecimento da carne brasileira para o abastecimento do mercado. A raça apresenta particularidades que cooperaram para a sua disseminação, seleção e consolidação como base genética do rebanho bovino brasileiro, pois, estes animais demonstram adaptação ao clima tropical (tolerância térmica), resistência a parasitas e melhor aproveitamento das pastagens nativas, o que justifica a predileção pela raça na pecuária brasileira (Carvalho, 2019; Oliveira et al., 2002; Bianchini et al., 2006).

Nesse cenário, estudos sobre os protocolos hormonais para inseminação artificial (IA) têm sido ampliados para que o estabelecimento de programas de sincronização da ovulação para a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), sejam cada vez mais utilizados nos sistemas de produção. A IA acelera o ganho genético, devido ao aumento do número de bezerros nascidos de machos geneticamente superiores, reduz o número de touros necessários nas fazendas, e aumenta a produtividade da cadeia (Sá Filho, 2012; Silva et al., 2022).

Fatores como o manejo nutricional, podem afetar o desempenho reprodutivo de fêmeas Nelore mantidas em sistemas extensivos de pastagem, pois já é reconhecido que a reprodução é afetada pela energia corporal disponível (Pfeifer et al., 2017). Dessa forma, os protocolos à base de estradiol/progesterona (E2/P4), facilitam a utilização da IA nos países produtores de carne da América do Sul, onde os sistemas de produção de carne são extensivos, pois, a associação entre E2 e P4 é mais eficaz para induzir a sincronização da emergência de uma nova onda folicular e ovulação em vacas *Bos indicus* no pós-parto, do que protocolos à base de prostaglandinas e GnRH (Bó et al., 2003; Sá Filho, 2012).

A aplicação do éster de cipionato de estradiol (CE), é comumente realizada no momento da remoção do dispositivo intravaginal de progesterona (DIV), pois induz a ovulação entre 71 a 78 horas e reduz o manejo de curral, com a IATF realizada 48 horas após a remoção da P4 (Torres Júnior et al., 2014). Embora a aplicação do CE seja amplamente realizada, em um estudo recente, Barbosa et al (2022), observaram que a aplicação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) 34 horas após a remoção do dispositivo de P4 seguida da aplicação de CE, melhorou significativamente as taxas de prenhez de vacas Nelore lactantes no pós-parto, quando comparada com àquelas que receberam somente a aplicação do CE, e ainda, a aplicação do GnRH nesse momento aumentou as taxas de prenhez independente a expressão de estro.

A incorporação do GnRH nos protocolos à base de E2/P4, passou a ser realizada rotineiramente nos programas de sincronização da ovulação em vacas que não expressam estro até o momento da IATF, pois, foi observado que essa técnica pode melhorar as taxas de prenhez, enquanto, que, a aplicação do GnRH em vacas que expressam estro, parece não surtir efeito tão benéfico (Madureira et al., 2020; Sá Filho et al., 2011; Nogueira et al., 2019). Apesar dos estudos avaliarem a eficácia do GnRH 34 ou 48 horas após a remoção da P4 e da aplicação de CE em vacas *Bos indicus*, o efeito do GnRH aplicado 34 horas após a P4 sem a presença do CE ainda não foi estudado.

Mediante o apresentado, os objetivos deste estudo foram comparar a sincronia da ovulação em vacas submetidas ao tratamento com CE e GnRH34, com àquelas tratadas apenas com GnRH34, e comparar a fertilidade de vacas tratadas com estes protocolos, com a fertilidade de vacas tratadas com o protocolo CE-GnRH48, a abordagem mais comum realizada nos programas de IATF.

## 2 Revisão da Literatura

### 2.1 Ciclo estral e desenvolvimento folicular

Em bovinos, o ciclo estral tem a duração média de 21 dias que pode variar de 17 a 24 dias (Polizel, 2019), caracterizado por duas a três ondas foliculares (Figueiredo et al., 1997) e é dividido em quatro estágios: proestro, estro, metaestro, e diestro. A fase folicular, é marcada por maiores concentrações circulantes de estradiol (E2), e compreende os estágios do proestro e estro, enquanto que, na fase luteal as concentrações de progesterona (P4) são predominantes e compreende os estágios metaestro e diestro (Rathbone et al., 2001).

A ação do GnRH sobre a secreção das gonadotrofinas segue um padrão diferente e é influenciada pelos estágios do ciclo estral. O hormônio folículo estimulante (FSH), assim que produzido é liberado pela hipófise e mantém níveis séricos constantes, já o hormônio luteinizante (LH) é produzido e armazenado nos gonadotrofos hipofisários e necessita do estímulo do pulso de GnRH para ser liberado, obedecendo assim, o mesmo padrão pulsátil de liberação do GnRH (Millar, 2005).

Dessa forma, sob altos níveis de P4 (diestro), ocorre o *feedback* negativo do E2 sobre o hipotálamo (Herbison, 2020), nessa mesma fase a ação inibitória do ácido gama-aminobutírico (GABA) é aumentada, o que sugere um bloqueio na atividade das células secretoras de GnRH e conseqüentemente, diminui frequência do pulso de GnRH e LH (Christian e Moenter, 2010).

Quando os níveis de P4 decaem ( proestro e estro), e há o aumento constante da concentração de E2, caracterizado pela presença de um folículo dominante, ocorre o *feedback* positivo do E2 sobre o hipotálamo, nesse mesmo período a atividade supressora do GABA diminui, induzindo o aumento da frequência do pulso de GnRH e conseqüentemente LH (Christian e Moenter, 2010; Herbison, 2020; Ginther et al., 2001), estimulando o crescimento folicular final até a ovulação (Rathbone et al., 2001; Ciechanowska et al., 2010). Portanto, a P4 e o E2 controlam os mecanismo chaves, por meio de *feedback* positivo ou negativo

para regular os pulsos de GnRH durante as diferentes fases do ciclo estral, conduzindo o processo reprodutivo (Herbison, 2020).

O eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal é a principal via de regulação que conduz o processo reprodutivo em mamíferos (Herbison, 2020). O hipotálamo está localizado no diencéfalo, abaixo do tálamo, e é formado por estruturas citoarquitetônicas que desempenham papéis fundamentais nos processos básicos para a manutenção da vida, como a reprodução (Saper e Lowell, 2014; Ciechanowska et al., 2010).

O lobo anterior da hipófise está sob o controle de neurônios na área periventricular, esses neurônios comunicam-se com as células alvo através de um rede de capilares sanguíneos, localizados no assoalho do terceiro ventrículo, que se estendem para baixo da eminência mediana, onde secretam hormônios na região porta-hipotalâmica-hipofisária, que através dessas veias, transportam o GnRH para o lobo anterior da hipófise, que controla a secreção de hormônios essenciais para a reprodução, FSH e LH (Saper e Lowell, 2014; D'occhio et al., 2000).

O surgimento de uma nova onda folicular é induzido pelo aumento da secreção de FSH, que pode ser feita através da indução da ovulação de um folículo dominante (Ginther et al., 2001). O pico de FSH pode ser induzido de duas formas diferentes: através do aumento da produção e secreção de GnRH no início do estro (pico pré-ovulatório de LH/FSH); ou, pode ser induzido pela ausência dos fatores inibidores de FSH (estradiol e inibina) após a ovulação (pico-perioovulatório), onde não há o aumento concomitante com LH, assim o aumento de FSH induzido pelo pico-perioovulatório é devido a secreção "constitutiva" de FSH e não requer estimulação direta do GnRH, mas ocorre devido a falta dos inibidores de FSH (Sartori et al., 2023).

Assim, sob as altas concentrações de FSH ocorre o recrutamento de um *pool* de folículos, quando atingem de 2 a 4 mm esses folículos se tornam responsivos as gonadotrofinas, principalmente ao FSH (Ginther et al., 2001). Em fêmeas *B. indicus*, após os folículos atingirem 6 a 8 mm de diâmetro ocorre a divergência folicular, enquanto que em fêmeas *Bos taurus*, a divergência ocorre com 8 a 9 mm (Gimenes et al., 2008).

Após a divergência, as células da granulosa passam por um processo de proliferação e diferenciação em duas subpopulações, células do *cummulus* e

células murais da granulosa, que ficam abaixo da lâmina basal, limite entre as camadas das células da teca e células da granulosa, o espaço formado entre as células da granulosa e o oócito é denominado de cavidade antral, e é preenchido por fluído folicular (Costa et al., 2023).

Simultaneamente, ocorre a proliferação da células do tecido conjuntivo que envolvem o folículo, dando origem às células da teca interna e externa. A expressão do receptor de LH (LHr) é detectada no momento da formação da teca interna, estabelecendo a dependência do folículo dominante em relação ao LH (Fair, 2003; Barnett et al., 2006).

Inicialmente, a cascata da biossíntese inicia nas células da teca, que possuem os receptores de LH. Sob a influência do LH, a enzima adenilil-ciclase (AC) sintetiza o monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) a partir do trifosfato de adenosina (ATP), aumentando assim a disponibilidade de androgênio. Posteriormente, esse androgênio é convertido em estrogênio pela enzima aromatase nas células da granulosa (Ginther et al., 2001).

Após a divergência, há um aumento da abundância dos receptores de LHr e FSHr nas células da granulosa. Sob a ação conjunta do LH e FSH, ocorre uma cascata de eventos que culminam na biossíntese de cAMP a partir de ATP, aumentando a atividade da aromatase. Esse aumento da atividade enzimática estimula ainda mais a conversão de androgênio em E2, promovendo o crescimento final do folículo e a subsequente ovulação (Ginther et al., 2001).

Além disso, após o maior folículo se tornar dominante, este passa a secretar E2e a inibina, ambos atuam num mecanismo de *feedback* negativo na produção de FSH, impedindo o desenvolvimento dos demais folículos, que acabam regredindo e tornando-se atrésicos (Ginther et al., 2003; Sartori et al., 2023).

## **2.2 Inseminação Artificial em tempo fixo – IATF**

A inseminação artificial proporciona que sêmen de touros geneticamente superiores sejam utilizados em um maior número de vacas, possibilitando um maior impacto no melhoramento genético dos rebanhos (Sá Filho, 2012). Os avanços sobre o conhecimento da fisiologia reprodutiva dos animais *Bos taurus* e *Bos indicus* permitiram o desenvolvimento de programas reprodutivos aprimorados,

tornando mais amplo o uso das tecnologias reprodutivas, contribuindo para o aumento produtividade e da rentabilidade da cadeia (Sartori et al., 2023).

Atualmente, os países que lideram o *ranking* mundial de publicações do uso da IATF são Brasil e Estados Unidos, seguidos pelo Canadá, Argentina, Uruguai e Austrália (Monteiro et al., 2023). O volume de publicações sobre o uso da IATF aumentou exponencialmente nos últimos 25 anos, estudos apontam que a utilização dos protocolos baseados em GnRH e prostaglandinas (associados ou não com progesterona) são mais utilizados em *Bos taurus*, enquanto que, protocolos baseados no uso de estradiol e progesterona (E2/P4), são mais utilizados em gados *Bos indicus* na América do Sul (Sartori et al., 2023; Bó et al., 2003). O Brasil é o país que mais insemina gado *B. indicus*, com predominância de fêmeas da raça Nelore (Monteiro et al., 2023).

Atualmente, o Brasil é o país que mais realiza IATF no mundo, 82 milhões de matrizes compõe o rebanho brasileiro, desse total, mais de 63 milhões são matrizes de corte. No ano de 2022, mais de 15 milhões de fêmeas de corte foram inseminadas (ASBIA, 2022). Somado a isso, Brasil e Estados Unidos são os países que mais publicam trabalhos sobre a IATF, demonstrando o quanto esses países contribuíram para o aprimoramento e disseminação das biotécnicas reprodutivas em todo o mundo.

Os princípios básicos para o controle da dinâmica ovariana para IATF baseiam-se em: 1) sincronização da emergência de uma nova onda folicular (indução à ovulação de um folículo dominante; ou indução a atresia folicular); 2) Controle das concentrações hormonais para o adequado crescimento folicular; e 3) Indução da ovulação sincronizada do folículo dominante ao final do tratamento (E2/P4 ou GnRH/PFG) com GnRH, hCG ou estrógenos (benzoato ou cipionato de estradiol) (Sartori et al., 2023; Monteiro et al., 2023; Sá Filho, 2012; Bó et al., 2003).

## **2.3 Fármacos utilizados nos protocolos de IATF**

### **2.3.1 Prostaglandinas**

As prostaglandinas foram os primeiros produtos do ácido araquidônico a serem descobertos. Todas prostaglandinas são, basicamente, variantes do ácido graxo básico insaturado, e estão presentes em sua estrutura básica o ácido

prostanóico e ácido araquidônico (Rathbone, 2001; Andrade, 2017). As prostaglandinas estão envolvidas em diversos outros processos fisiológicos. Após o pico de LH, ocorre um aumento da síntese das prostaglandinas no folículo, com consequente maturação e ovulação do oócito (Andrade, 2017; Moraes et al., 2021).

A PGF<sub>2</sub>α é uma prostaglandina primária com duas ligações duplas (5-6 e 13-14) e três grupos hidroxila (9, 11 e 15), e tornou-se conhecida no campo da reprodução por ser um agente luteolítico natural em muitas espécies. Desde que, estudos com PGF<sub>2</sub>α foram conduzidos em pequenos roedores e causaram à luteólise, muitos pesquisadores passaram a estudar os efeitos luteolíticos da PGF<sub>2</sub>α em bovinos (Rathbone, 2001).

Na década de 90, com a criação do protocolo Ovsynch®, que consistia na associação entre GnRH e PGF<sub>2</sub>α (Pursley et al., 1995), inúmeros protocolos foram desenvolvidos e aplicados, principalmente em vacas de leite (Mcart et al., 2010; Abdel-Aziz e Abdel-Wahab, 2017; Martins et al., 2023). Entretanto, os resultados obtidos dos protocolos à base de GnRH/PGF variavam muito de acordo com a raça e aptidão das vacas (corte vs leite), comprometendo as taxas de fertilidade.

Devido a isso, adaptações do protocolo Ovsynch como a associação com a progesterona e variações no tempo de duração do tratamento, foram realizadas para atender as demandas e particularidades de cada categoria (Rathbone, 2001).

Ainda, novas pesquisas vêm sendo realizadas para avaliar a eficácia das prostaglandinas como indutores de ovulação para serem empregadas nos protocolos de IATF, principalmente em países que proíbem o uso de ésteres de estradiol para a sincronização do ciclo estral (Andrade, 2017).

Estudos comparando o análogo da PGF<sub>2</sub>α como indutor de ovulação, com o benzoato ou cipionato de estradiol, em bovinos leiteiros, mostraram resultados semelhantes tanto para as taxas de prenhez, quanto a taxa de ovulação (Pfeifer et al., 2014; Pfeifer et al., 2016). No entanto, estudos comprovam que as prostaglandinas são consideradas mediadores, que envolvem uma resposta inflamatória que o ovário sofre em resposta ao estímulo ovulatório do pico de LH, e quando usadas isoladamente não possuem efeito central para induzir a ovulação (Duffy et al., 2019). Dessa forma, mais estudos precisam ser realizados para avaliar a efetividade destes protocolos, principalmente em termos de fertilidade.

Além disso, em outro estudo, quando administrada via intrafolicular, a PGF<sub>2</sub>α não foi capaz de antecipar a ovulação (Moraes et al., 2021), esses achados

corroboram com já descrito anteriormente, que as  $PGF2\alpha$  atua como mediador do processo ovulatório, mas não é capaz de induzir a ovulação isoladamente (Moraes et al., 2021).

A utilização de protocolos à base de GnRH e  $PGF2\alpha$  é considerada uma estratégia pouco eficaz para ser utilizada em animais de corte, principalmente porque a eficácia destes protocolos dependem da responsividade do folículo a primeira aplicação de GnRH (Rathbone et al., 2001). Dessa forma, a aplicação de uma dose de GnRH ao início do protocolo pode não induzir a ovulação e emergência de uma nova onda folicular, principalmente em vacas *Bos indicus*, que estão sujeitas a anestro pós-parto devido suas condições de criação em sistemas extensivos em que gramíneas forrageiras são a principal fonte de alimento (Bó et al., 2003; Sá Filho, 2012, Sartori et al., 2023; Monteiro et al., 2023).

### **2.3.2 Progestágenos**

A progesterona (P4) é um hormônio esteroide de cadeia de 21 carbonos, produzido por diversos tecidos como a placenta e glândulas adrenais. Em bovinos, é predominantemente secretada por uma glândula acessória transitória chamada corpo lúteo (Loguercio et al., 2005; Meireles et al., 2017). O corpo lúteo (CL) se forma a partir da reorganização das células da teca e da granulosa após a ovulação de um folículo dominante, essas células passam então por um processo de diferenciação e começam a sintetizar a P4 sob a ação do LH. A progesterona é o hormônio essencial para o estabelecimento e manutenção da prenhez (Loguercio et al., 2005).

Inicialmente, os análogos da P4 foram utilizados para o controle da fase luteínica com intuito de sincronizar o estro, pois, altas concentrações de P4 alteram a secreção de LH na hipófise, isto não permite o crescimento e dominância dos folículos e conseqüentemente inibe a ovulação, assim, após a remoção do tratamento de P4 exógena, uma nova onda folicular iniciaria (Rathbone et al., 2001; Monteiro et al., 2023). Entretanto, somente a utilização da progesterona para sincronização do estro não é tão eficaz quanto sua utilização associada a outros análogos de hormônios, como as prostaglandinas, ésteres de estradiol e GnRH.

O desenvolvimento de tratamentos à base de progesterona iniciaram com os hormônios de via oral (acetato de melengestrol), e implantes auriculares



(norgestomet), posteriormente, diversos dispositivos intravaginais (DIV) de liberação lenta foram desenvolvidos (Bó et al., 2003), a adoção do DIV tornou-se mais comum, pois, além de prático e fácil manuseio, a absorção lenta da P4 pela mucosa do canal vaginal mimetiza as flutuações das concentrações de P4 durante o ciclo estral natural em bovinos.

Dessa forma, a associação entre o DIV juntamente com a aplicação de uma dose de éster de estradiol (benzoato de estradiol), passou a ser amplamente utilizada nos sistemas de produção de carne na América do Sul, visto que, o E2 na presença da P4 causa a regressão dos folículos devido a supressão das gonadotrofinas, que por sua vez causa a supressão dos fatores de inibição do FSH, permitindo que ocorra uma elevação sérica de FSH devido a secreção constitutiva deste hormônio, ocasionando a emergência de uma nova onda folicular de forma sincronizada (Bó et al., 2003; Sartori et al., 2023). Ésteres de estradiol também são amplamente utilizados como indutores de ovulação ao final do tratamento com P4, pois permitem a sincronização da ovulação para a IATF (Bó et al., 2003; Rathbone et al., 2001).

### 2.3.3 Estrógenos

Os ésteres de estradiol são hormônios esteroides com 18 átomos de carbono, que tem como principais compostos o  $17\beta$  estradiol, a estrona e o estriol. São amplamente utilizados para a emergência da onda folicular e como indutores de ovulação em baixas concentrações de P4 (D'Ávila et al., 2019).

Os análogos dos ésteres de estradiol compõem uma ampla categoria de hormônios, sendo os mais utilizados na reprodução o benzoato de estradiol (BE), o cipionato de estradiol (CE), o valerato de estradiol (VE), e o  $17\beta$  estradiol ( $17\beta$ -E) propriamente dito.

Basicamente, as principais diferenças entre esses ésteres de estradiol estão em sua cadeia estrutural que modifica o seu tempo de meia-vida. O BE e o CE de estradiol são os principais análogos utilizados nos programas de sincronização devido seu baixo custo e são considerados indutores eficientes (Ayres et al., 2008). O BE tem uma meia-vida curta (3 dias), o VE tem uma meia-vida intermediária (7 - 8 dias), enquanto que o CE tem a meia-vida mais longa, de 10 a 12 dias (D'Ávila et al., 2019; Sales et al., 2024)

Os estéres de estradiol são utilizados como indutores de ovulação e são empregados em diferentes momentos dos protocolos de IATF. Usualmente, o BE é utilizado associado com a P4 ao início do protocolo para induzir e a regressão e emergência da onda folicular (Baruselli et al., 2018). Além disso, o BE também pode ser utilizado 24 horas depois do fim do tratamento com progesterona para induzir ovulação, e a IATF realizada até 56 horas depois. Entretanto, essa prática torna o manejo mais dispendioso, devido a necessidade de manejo a mais com as fêmeas (Bó et al., 2003).

Em um estudo recente, com vacas *Bos indicus*, comparando a utilização do BE ou VE, associados com P4 ao início do protocolo, mostrou que a utilização de VE para sincronizar a emergência da onda folicular e ovulação, representa uma alternativa viável e com eficiência semelhante àquela alcançada com os protocolos que utilizam o BE (Sales et al., 2024).

Por outro lado, o CE normalmente administrado no momento da remoção da fonte de P4 para induzir a ovulação e a IATF é realizada 48 horas depois (Torres-Júnior et al., 2014). Diversos estudos foram conduzidos para avaliar a eficácia dos protocolos de IATF que utilizavam o BE ou CE como indutores de ovulação ao final do tratamento com progesterona, a fertilidade destes protocolos não foram diferentes. Sendo assim, tornou-se mais usual a utilização do CE como indutor de ovulação, pois reduz o manejo de curral sem afetar as taxas de prenhez (Torres-Júnior et al., 2014; Sales et al., 2012).

Além disso, a utilização de VE ao início do protocolo, com a administração do CE ao final do tratamento com a P4, também permite que a IATF seja realizada 48 horas depois, alcançando resultados reprodutivos satisfatórios (Sales et al., 2024).

#### **2.3.4 Gonadotrofina coriônica equina (eCG)**

A eCG é um hormônio glicoproteico (subunidade  $\alpha$  – composta 96 aminoácidos; e subunidade  $\beta$  – composta por 149 aminoácidos), que é produzida pelo cálices endometriais da égua entre 40 e 130 dias de gestação (Mello et al., 2014). A eCG tem propriedades químicas, como a presença de carboidratos e ácido siálico, que conferem maior tempo de meia-vida a essa molécula (46 h), e quando

administrada em bovinos, tem a capacidade de se ligar aos receptores de FSH e LH do folículo, aumentando seu diâmetro, e elevando as concentrações de estradiol antes da ovulação e de P4 após a ovulação (Mello et al., 2014; Nuñez-Oliveira et al., 2020; Sá Filho, 2012).

Uma das dificuldades em inserir fêmeas *Bos indicus* em programas de IATF após o parto, é a baixa condição corporal que esses animais normalmente se encontram nessa fase, o que influencia diretamente na secreção pulsátil de LH, comprometendo o desenvolvimento final e ovulação do folículo dominante (Sá Filho, 2012). Dessa forma, incorporação do eCG em protocolos de IATF a base de E2/P4 em vacas pós-parto, se dá por sua capacidade de aumentar o desenvolvimento final do folículo dominante e melhorar a resposta ovulatória e taxas de prenhez (Mello et al., 2014).

Os tratamentos mais comuns, que são utilizados rotineiramente dentro dos sistemas de produção de carne que fazem o uso da IATF, consistem na inserção de um DIV seguida da administração de uma dose de benzoato de estradiol. Após 7 ou 8 dias, a fonte de progesterona é removida, seguida da administração de PGF2 $\alpha$  (para garantir a luteólise), eCG e CE (para garantir o desenvolvimento final do folículo e sua ovulação), com a IATF realizada 48 horas após a remoção da fonte de P4 (Torres-Júnior et al., 2014; Sartori et al., 2023; Bó et al., 2003; Rathbone et al., 2001).

## **2.4 Hormônio liberador de gonadotrofinas e seus análogos**

Nos mamíferos, os principais neurônios secretores de GnRH estão localizados na região da área pré-óptica, na região do hipotálamo anterior e na área periventricular (Christian e Moenter, 2010; Ciechanowska et al., 2010). Os neurônios situados da área periventricular anteroventral (AVPV), são responsivos aos esteroides ovarianos e estão entre os neurônios que se comunicam diretamente com os neurônios que secretam GnRH (Christian e Moenter, 2010; Herbison, 2020).

Dentre os fatores que influenciam na comunicação entre AVPV e os neurônios GnRH, está a ação do ácido gama-aminobutírico (GABA). O GABA, é conhecido como o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC). Este, se liga aos receptores específicos, GABA<sub>A</sub> ou GABA<sub>B</sub>, de outros

neurônios, como os do GnRH, e podem estimular ou inibir a secreção de GnRH dependendo da espécie, estado fisiológico, sexo e condições experimentais (Ciechanowska et al., 2010; Sullivan e Moenter, 2005; Christian e Moenter, 2010).

Além do GABA, vários outros neurotransmissores podem interferir a atividade dos neurônios GnRH, exercendo atividade estimulatória (kisspeptina, noradrenalina, neuropeptídios-Y) ou inibitória (neuropeptídeos-Y, opioides endógenos) de acordo com a fase do ciclo estral e as concentrações dos hormônios esteroides (Dobson et al., 2003; Pereira, 2017; Ciechanowska et al., 2010; Christian e Moenter, 2010). Dessa forma, a secreção do GnRH é regulada pela atividade de neurotransmissores e neuro-hormônios que exercem ações de liberação e inibição no hipotálamo (Ciechanowska et al., 2010).

O GnRH é o hormônio decapeptídeo (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>) que regula o ciclo estral (Millar, 2005). O padrão de pulsátil do GnRH faz com que as gonadotrofinas sejam liberadas pela hipófise, conduzindo a emergência da onda folicular e ovulação (Sullivan e Moenter, 2005). Como o GnRH é um hormônio peptídeo sensível a ação de enzimas e possui uma meia-vida curta, de aproximadamente 3 a 7 minutos, pesquisas buscaram desenvolver análogos deste hormônio que aumentassem a sua resistência a ação de enzimas e seu tempo de ação (Pereira, 2017).

Atualmente, os principais análogos de GnRH disponíveis e utilizados na reprodução são a Gonadorelina, que se assemelha ao GnRH endógeno (decapeptídeo), e os análogos agonistas, Lecirelina e Buserelina (nonapeptídeos), que também estimulam os receptores de GnRH mas possuem substituições nas posições 6 e 10 dos aminoácidos, o que faz com que tenham maior afinidade com os receptores na hipófise, sejam mais resistentes a ação de enzimas, e mais estáveis, prolongando seu tempo de ação (Lavorato, 2012; Pereira, 2017).

Em um estudo, com vacas de leite em lactação, com o objetivo de avaliar o perfil do pico de LH induzido por diferentes análogos de GnRH (gonadorelina vs buserelina), mostrou que a gonadorelina pode aumentar as concentrações de LH mais rapidamente, atingindo concentração mais cedo (1 hora após a administração) e maior de LH circulante, do que a buserelina (Armengol-Gelonch et al., 2017).

Por outro lado, um estudo com novilhas e vacas de corte, avaliando a influencia dos análogos de GnRH (gonadorelina vs. Buserelina), e dose (única ou dupla), nos perfis de liberação de LH e resposta ovulatória, mostrou que a

buserelina induziu maior liberação de LH e resposta ovulatória do que a gonadorelina em novilhas e vacas com altas concentrações de P4 (Silva et al., 2024).

O GnRH se liga aos GnRH-R da hipófise, provocando uma sequência de eventos que incluem a micro agregação desses receptores, a internalização e ativação das vias de transdução de sinais de segundo mensageiro, resultando na síntese e liberação de LH e FSH, onde após a produção do LH, este fica armazenado nos gonadotrófos hipofisários e cada pulso de GnRH estimula a liberação de LH, enquanto que o FSH é produzido e secretado constitutivamente (Millar, 2005; Pereira, 2017).

O processo da ovulação ocorre a partir do aumento das concentrações circulantes de E2, iniciando assim o pico pré-ovulatório de LH, que causa alterações no folículo dominante como hiperemia, degradação tecidual da parede do folículo através do aumento de colagenase e plasmina (causam a degradação das fibras de colágeno), e aumento da síntese de prostaglandinas, todos esses eventos juntos causam a ruptura da matriz extracelular dentro de cada camada celular, bem como a quebra da lâmina basal que separa os compartimentos das células da granulosa e da teca, e a lâmina basal no epitélio superficial, enfraquecendo a parede do folículo e, eventualmente, causando o seu rompimento e a liberação do oócito (Duffy et al., 2019; Andrade, 2017).

Paralelamente, eventos importantes acontecem no oócito promovendo sua maturação final. Estes incluem a expansão das células do *cummulus*, ausência de contato entre as células da corona radiata e membrana do oócito e formação do espaço perivitelinico, alinhamento dos grânulos corticais próximos a membrana do oócito e, também progressão dos estágios finais da meiose I até o estágio de metáfase da meiose II (Costa et al., 2023; Fair, 2003).

Em humanos, a utilização de análogos de GnRH foi amplamente estudada e aplicada para superar os problemas de infertilidade em homens e mulheres, como hipogonadismo e problemas com puberdade tardia (Millar, 2005), bem como estudos com os análogos e antagonistas de GnRH foram conduzidos para melhorar a eficácia dos protocolos de fertilização *in vitro* em mulheres (Lavorato, 2012).

Na reprodução animal, os análogos de GnRH são amplamente utilizados desde a década de 90, com a criação dos protocolos a base de GnRH/PGF. Dessa forma, os análogos de GnRH são empregados nos protocolos de IATF como

indutores de ovulação (Pursley et al., 1995), podem ser utilizados para tratamento de cistos ovarianos e também no controle da ciclicidade (D'Occhio et al., 2000

Em um estudo, com vacas de leite lactantes, realizado para avaliar o efeito da administração de duas diferentes doses de GnRH (Gonadorelina; 100 $\mu$  vs. 200 $\mu$ ), em ambiente com baixa ou alta progesterona, mostrou que a concentração de P4 afeta o pico de LH induzido por GnRH, e que a administração de uma dose dupla de GnRH (200 $\mu$ ) pode aumentar a secreção de LH mesmo em ambiente com baixa ou alta P4 (Giordano et al., 2012).

Por outro lado, a utilização de análogo de GnRH ao início do protocolo de IATF para substituir o BE, parece surtir efeito mais significativo na fertilidade de vacas de leite em lactação (Sartori et al., 2023). Estudos com vacas de leite lactantes, mostram que a sincronização da onda folicular com a administração de GnRH induzindo a ovulação de um folículo e subsequente formação de um CL, aumenta as concentrações circulantes de P4 durante o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório, a alta concentração de P4 durante o desenvolvimento folicular afeta positivamente a qualidade do oócito e do embrião, melhorando a fertilidade (Rivera et al., 2011; Wiltbank et al., 2012).

Em estudos recentes, os análogos de GnRH passaram a ser empregados em diferentes horários dentro do protocolo de IATF, levando em consideração que após sua administração ocorre o pico de LH em até 2 horas, e a ovulação cerca de 30 horas depois, Barbosa et al (2022), trataram vacas lactantes Nelore com acetato de buserelina 34 horas após a remoção do dispositivo de progesterona, as vacas tratadas com GnRH ovularam de maneira mais síncrona e apresentaram maior prenhez por IA do que vacas tratadas apenas com cipionato de estradiol (63,0% vs 50,4%, respectivamente).

Vacas de corte que não expressaram estro em até 48 horas e foram tratadas com gonadorelina e inseminadas 8 horas depois, tiveram aumento na prenhez (Cedeño et al., 2021). Em outro estudo, vacas de corte que não expressaram estro e foram tratadas com gonadorelina no momento da IATF, também apresentaram maior taxa de prenhez do que àquelas que não receberam o tratamento (Nogueira et al., 2019). Todos esses resultados mostram que a utilização de GnRH, dentro dos protocolos de IATF pode afetar positivamente a fertilidade de fêmeas bovinas de corte e leite.

## 2.5 Papel do estradiol no pico pré-ovulatório de GnRH/LH

Como já mencionado, os hormônios esteroides atuam como os principais moduladores na síntese e secreção de GnRH durante o ciclo estral em todas as espécies. O E2, é o hormônio principal que altera o padrão de secreção de GnRH, atuando em regiões específicas do hipotálamo, causando o *feedback* positivo, que basicamente, se resume em aumentar a síntese e liberação de GnRH na região porta-hipofisária dando início ao pico pré-ovulatório de LH (Herbison, 2020; Christian e Moenter 2010).

Em muitos mamíferos a principal região do hipotálamo que tem a presença dos receptores de E2 é a região AVPV (Herbison, 2020). Em estudos com camundongos, geneticamente modificados que expressam marcadores genéticos, como a proteína verde fluorescente ou  $\beta$ -galactosidase, foi possível avaliar a atividade eletrofisiológica dos neurônios secretores de GnRH na presença de E2 (Christian e Moenter, 2010).

As baixas concentrações de E2 diminuem a atividade de secreção das células, enquanto que, altas concentrações aumentam a atividade de secreção dos neurônios GnRH principalmente na região AVPV e núcleo arqueado. Além disso, em roedores o efeito do ciclo circadiano parece desempenhar papel fundamental no pico pré-ovulatório de GnRH/LH (Christian e Moenter, 2010; Herbison, 2020). Em ovelhas, as regiões do hipotálamo que apresentam receptores para E2 e exercem influência na secreção de GnRH são as regiões do hipotálamo ventromedial, área pré-óptica e núcleo arqueado (Doobson et al., 2003).

Na fase folicular inicial, o E2 aumenta a atividade do GABA na área pré-óptica através da ação das células noradrenérgicas, essa atividade aumentada de GABA é mantida e suprime a liberação de GnRH/LH (Ciechanowska et al., 2010). Já na fase folicular tardia, em que as concentrações de E2 estão altas e constantes, a atividade da células noradrenérgicas é aumentada na área pré-óptica, e concomitante a isso, ocorre o desacoplamento da ação das células noradrenérgicas do núcleo arqueado sobre a atividade do GABA e opioides endógenos, o que resulta na diminuição da atividade inibitória do GABA e induz ao aumento da síntese e liberação de GnRH e conseqüentemente, aumento da liberação de LH, dando início ao pico-préovulatório (Ciechanowska et al., 2010; Doobson et al., 2003).

Weesner et al (1993), estudando os efeitos da expressão gênica do GnRH, antes chamado de hormônio liberador do hormônio luteinizante - LHRH, no cérebro bovino (*in vitro*), mostrou que na fase luteal, marcada por maior concentração de progesterona, há menor expressão do gene do LHRH. Sendo que, na fase lútea, as concentrações circulantes de progesterona aumentam a atividade do GABA, que mantém os pulsos de GnRH em uma frequência muito baixa, o que conseqüentemente, influencia na secreção de LH.

Vacas de corte, tratadas com de BE 24 h após a remoção do DIV o pico de estradiol ocorreu em até 42 h, seguido do pico de LH em até 44 h, com intervalo de 37 h, desde pico de LH até a ovulação, esta ocorreu cerca de 80 h após o tratamento (Martínez et al., 2007). Em outro estudo, com vacas Nelore, comparando o uso de BE (administrado 24 h após a remoção do DIV) ou CE (administrado no momento da remoção do DIV), no perfil de liberação de LH, ovulação e fertilidade, mostrou que os picos de LH ocorreram 19,6 e 50,5 horas após os tratamentos com CE e BE, respectivamente. Além disso, a magnitude do pico de LH foi maior para o tratamento com BE do que para CE (20,5 e 9,4 ng/mL, respectivamente), entretanto, o tempo de duração do pico de LH foi menor para o tratamento com BE (8,6 h) do que para CE (16,5 h). Apesar das diferenças farmacológicas entre os ésteres de estradiol, ambos foram eficazes para induzir o pico de LH e ovulação, e as taxas de prenhez não foram diferentes (Sales et al., 2012).

Devido a esse efeito do E2 sobre a rede de neurônios de GnRH que acarreta do pico pré-ovulatório de LH, atualmente, os análogos de estradiol são amplamente utilizados como indutores de ovulação. Apesar disso, alguns estudos apontam que a utilização do CE pode induzir a ovulações dispersas (Uslenghi et al., 2014; Torres-Júnior et al., 2014), o que pode influenciar negativamente na fertilidade de vacas tratadas com estes análogos.

Quando utilizado, o GnRH, induz a ovulação de forma mais síncrona e pode proporcionar um melhor intervalo entre a IA e ovulação (Barbosa et al., 2022; Sartori et al., 2023) garantindo que melhores taxas de prenhez possam ser alcançadas. Além disso, o GnRH pode ser utilizado estrategicamente para prolongar o proestro, pois sabe-se que um proestro mais longo acarreta um maior tempo de exposição as concentrações circulantes de estradiol otimizando o ambiente uterino (Nuñez-



Oliveira et al., 2020) que desempenha papel fundamental na manutenção da gestação (Davoodi et al., 2016).

Diante do exposto, a hipótese desse trabalho é que a aplicação de GnRH 34 horas após a remoção da progesterona, melhore a sincronia de ovulação e, por consequência, os índices de prenhez por IA. O objetivo geral dessa dissertação é determinar o efeito do GnRH no *status* ovariano e na fertilidade de vacas que receberam ou não o CE como indutor de ovulação. Dentro desse objetivo geral estão os seguintes objetivos específicos: (1) Comparar o efeito do GnRH administrado 34 h após a progesterona isoladamente (GnRH34); e associado com cipionato de estradiol (CE-GnRH34) no momento da ovulação, na produção de progesterona e vascularização do corpo lúteo; (2) Avaliar a eficácia dos protocolos GnRH34 e CE-GnRH34 com o protocolo CE-GnRH48 na taxa de prenhez e manifestação de estro; (3) Estabelecer a relação entre resposta ovariana aos protocolos de IATF e expressão de estro e fertilidade de vacas pós-parto.

### **3 Artigo**

#### **GnRH34 with or without estradiol cypionate in timed AI in *Bos indicus* beef cows**

Samira A. Silva; Rafael G. Mondadori; Gabrielly S. Noletto; Ingrid P. Barbosa;  
Reuel L. Gonçalves; Bernardo G. Gasperin; Monique T. Rovani; Eanes F. Paz;  
Leonardo S. Gomes; Luiz F.M. Pfeifer.

Publicado na revista Theriogenology

***GnRH34 with or without estradiol cypionate in timed AI in Bos indicus beef cows***

*Samira A. Silva<sup>a</sup>, Rafael G. Mondador<sup>a</sup>, Gabrielly S. Noletto<sup>b</sup>, Ingrid P. Barbosa<sup>c</sup>, Reuel L. Gonçalves<sup>d</sup>, Bernardo G. Gasperin<sup>a</sup>, Monique T. Rovani<sup>e</sup>, Eanes F. Paz<sup>f</sup>, Luiz F. M. Pfeifer<sup>g\*</sup>*

<sup>a</sup>Universidade Federal de Pelotas - UFPEL, PPG em Veterinária, Pelotas, RS, Brazil.

<sup>b</sup>Universidade Federal de Rondonia – UNIR, PPG em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Porto Velho, RO, Brazil

<sup>c</sup>Universidade Federal do Acre, UFAC, PPGESPA; Rio Branco, Acre, Brazil

<sup>d</sup>Biogênese Bagó Saúde Animal; Curitiba, PR, Brazil

<sup>e</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, PPG em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>f</sup>Autonomous professional, Machadinho do Oeste, RO, Brazil

<sup>g</sup>Embrapa Rondonia, Brazilian Agricultural Research Corporation, Porto Velho, RO, Brazil

\*Corresponding Author: Luiz Francisco Machado Pfeifer; Embrapa Rondônia, BR 364 - Km 5,5 - Zona Rural, Caixa postal: 127 CEP: 76815-800, Porto Velho - Rondônia – Brazil; Business phone: +55 69 3901-2510; E-mail: [luiz.pfeifer@embrapa.br](mailto:luiz.pfeifer@embrapa.br)

## Abstract

Two experiments were performed to evaluate the effects of GnRH treatment on the fertility of suckled Nelore beef cows treated with an estradiol/progesterone (E2/P4) based protocol for timed artificial insemination (TAI). Experiment 1 focused on determining the effects of estradiol cypionate (EC) on ovulation in TAI cows treated with GnRH 34 h after removal of the intravaginal P4 device (IPD). Suckled cows ( $n = 26$ ) were treated with 2 mg estradiol benzoate (EB) and IPD containing 1 g P4. After 8 days, IPDs were removed, and all cows were treated with 150 mg of d-cloprostenol (prostaglandin F2 alpha analog) and 300 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG), then separated into two treatment groups consisting of cows who received 1) saline 0.9% i.m. (GnRH34 group) or 2) 0.6 mg i.m. of EC (EC-GnRH34 group). On day 9 (05:00 p.m.), all cows were given GnRH (10.5 mg of buserelin acetate) i.m. No differences were observed between the groups ( $P > 0.05$ ) in the time of ovulation after IPD removal or in the proportion of cows ovulating. Experiment 2 focused on determining the effects of GnRH34 along with or in the absence of EC on day 8 on pregnancy per AI (P/AI) in postpartum beef cows. Cows ( $n = 981$ ) were treated similarly to those in Experiment 1, but an additional group, the EC-GnRH48 group, was included, in which cows received EC on day 8 whereas those that did not show estrus received GnRH at TAI. Thus, in this experiment, groups consisted of GnRH34 ( $n = 322$ ), EC-GnRH34 ( $n = 335$ ), and EC-GnRH48 ( $n = 324$ ). A higher rate of estrus expression was observed in cows treated with EC following IPD removal (EC-GnRH34: 69%, EC-GnRH48: 64.8%) than in cows in the GnRH34 group (45.6%). No difference in P/AI was observed between the treatment groups ( $P = 0.45$ ), but P/AI in cows in the EC-GnRH34 group (64.2%) tended to be greater ( $P = 0.1$ ) than in cows in the GnRH34 group (58%). In summary, although ovulation synchrony did not differ among the groups, P/AI in cows treated with EC and GnRH 34 h after IPD removal tended to be greater than in cows treated solely with GnRH; this was most likely due to a shorter proestrus/estrus period, considering the lower proportion of cows that displayed estrus in the GnRH34 group. Finally, given that P/AI did not differ between the EC-GnRH34 and EC-GnRH48 groups, our results suggest that, for cows not displaying estrus, administration of EC at the time of IPD removal followed by treatment with GnRH 48 h afterward represents the most cost-efficient TAI strategy for South American Zebu-based beef operations.

Keywords: Beef Cattle, Fertility, Pregnancy, Ovulation.

## 1. Introduction

Controlling the estrous cycle of suckled beef cows with exogenous hormones based on estradiol/progesterone (E2/P4) treatment facilitates the use of artificial insemination (AI) in South American beef production systems. In addition, the development and growing adoption of timed AI (TAI) programs have significantly increased the use of AI in Brazil over the past 20 years; at present, it is estimated that ~25% of beef cows in the country are now enrolled in TAI programs each year [1].

Ovulation is typically induced via administration of a low dose of estradiol ester following intravaginal P4 device (IPD) removal (usually within 24 h) in TAI protocols [2], depending on the type of estradiol ester used. Estradiol cypionate (EC) is often administered at the time of IPD removal to reduce animal handling [3,4]. Suckled *Bos indicus* beef cows treated with 0.5 mg or 1 mg EC at the time of IPD removal ovulated approximately 78 h and 71 h after administration, respectively [5]. Although EC is widely used to induce ovulation in TAI cows in South American beef operations, the results of a recent study of suckled *B. indicus* beef cows indicated that injection of EC at the time of IPD removal followed by GnRH administration 34 h later (i.e., EC-GnRH34) increased ovulation synchrony and pregnancy per AI (P/AI) relative to EC treatment alone [6]. Furthermore, the authors noted that administration of GnRH 14 h before TAI increased P/AI in cows regardless of estrus expression between IPD removal and TAI, suggesting that cows treated with the EC-GnRH34 protocol had a high P/AI because of optimal synchrony between the time of ovulation and TAI, considering that AIs were performed 14 h after GnRH.

Administration of GnRH induces a preovulatory luteinizing hormone (LH) peak within 2 h and ovulation within 28-30 [8]. Cedeno et al. [9] demonstrated that GnRH administered 8 h before TAI improved P/AI in suckled *B. taurus* beef cows that did not show estrus. Similarly, GnRH injected at TAI was also shown to increase P/AI in suckled *B. indicus* beef cows that failed to show estrus [10]. However, concurrent treatment with GnRH and AI did not enhance P/AI in beef cows that showed estrus [11-14]. Therefore, the use of GnRH

concurrently with TAI (i.e., EC-GnRH48) has become a commonly used approach by veterinarians in South America for treating *B. indicus* cows that do not display estrus. Although previous studies have examined the effects of GnRH after (34 h or 48 h) IPD removal in tropical beef cows [6,10,11,15], how GnRH influences E2/P4-based protocols when administered alone 34 h after IPD removal has not been tested. In light of the current trend towards reducing the use of estradiol in livestock, and considering that GnRH treatment alone decreases exposure to estradiol during proestrus/estrus [16,17], the impacts of EC and GnRH treatment on ovulation induction and fertility after TAI require further investigation.

Here, we hypothesized that ovulation synchrony in cows treated with GnRH 34 h after IPD would be similar to that of cows treated with the EC-GnRH34 protocol (Experiment 1), and have a similar P/ AI to cows treated with the EC-GnRH34 and EC-GnRH48h protocols (Experiment 2). Thus, the primary objectives of this study were to compare ovulation synchrony in cows undergoing GnRH34 treatment with EC and in cows undergoing GnRH34 treatment without EC, and to compare the fertility of cows treated with these protocols with the fertility of cows administered with EC-GnRH48, the most common approach used by veterinarians under TAI conditions.

## **2. Material and methods**

The Committee for Ethics in Animal Experimentation of the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) approved all procedures performed in the experiments described in this manuscript (Protocol 02/2022).

### **2.1. Experiment 1**

Experiment 1 compared ovulation synchrony between Nelore beef cows treated with GnRH34 associated or not with EC treatment.

This study was conducted at the experimental research farm of Embrapa Rondônia (Brazilian Agricultural Research Corporation, Rondônia, Brazil; 08048'12"S, 63050'56"W). The predominant climate in this region is Am (Köppen Classification). The mean annual air temperature is 26 °C and the mean annual rainfall is 2,095 mm.

Twenty-six suckled multiparous Nelore (*B. indicus*) cows, 45–70 days postpartum (DPP), 4–7 years old (y), weighing 450–600 kg, with a 2.75–3.5 of body condition score (BCS; range 1–5, where 1 = emaciated and 5 = obese) were used. Cows were housed in an outdoor grazing system (*Brachiaria brizantha* pasture) with ad libitum access to trace mineral salts and water.

The cows received an IPD (1 g progesterone, Primer®, Agener União, Embu-Guaçu, Brazil) and 2 mg intramuscular (i.m.) of estradiol benzoate (EB; RicBE®, Agener União, Embu-Guaçu, Brazil) at the beginning of the protocol (day 0). The IPDs were removed on Day 8, and all cows received 0.39 mg i.m. of cloprostenol sodium (PGF-analog; Estron®, Agener União, Embu-Guaçu, Brazil), and 300 IU i.m. of equine chorionic gonadotropin (eCG; ECGON®, Biogenesis Bagó, Curitiba, Brazil). On Day 8, cows were homogeneously assigned, according to DPP, age, and BCS (mean  $\pm$  SD), to one of two treatments: 1) 0.5 mL of Saline 0.9% (GnRH34 group, n = 13, 51.2  $\pm$  10.5 DPP, 5.6  $\pm$  1 y old, and 3.0  $\pm$  0.26 BCS), or 2) 0.6 mg i.m. of estradiol cypionate (EC-GnRH34 group, n = 13; Cipiotec®, Agener União, Embu-Guaçu, Brazil, 49.3  $\pm$  7.7 DPP, 5.9  $\pm$  0.9 y old, and 3.1  $\pm$  0.26 BCS). On Day 9, all cows received 10.5  $\mu$ g i.m. of buserelin acetate (GnRH; Gonaxal®, Biogenesis Bagó, Buenos Aires, Argentina) 34 h after IPD removal.

The status of the ovulatory follicle was followed by transrectal ultrasonography (Mindray® M5 VET® equipped with 5 MHz linear probe) at 12 h intervals from IPD removal to ovulation. Ovulation was defined as the disappearance (from one scanning session to the next) of a previously identified follicle greater than or equal to 8 mm in diameter. Once the disappearance of the preovulatory follicle (POF) was detected, the time of ovulation was considered the midpoint between the last two ultrasonic scanning sections. Cows that did not ovulate 120 h after IPD removal were considered non-responders to the synchronization treatment.

Nine days after IPD removal, both ovaries were scanned and the location of the corpus luteum (CL) was recorded for each animal. Subsequently, short color-flow mode

(CFM) videoclips (7 s duration) were recorded. The luteal tissue area (LTA), CL blood flow (CLBF), and adjusted CLBF (CLBF: LTA ratio) were calculated as shown elsewhere [6].

Blood samples were collected, nine days after IPD removal by caudal venipuncture into 10 mL tubes containing EDTA (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ, USA). Blood samples were centrifuged (1500×g for 15 min), and plasma was harvested and stored at -20 °C. Plasma progesterone concentrations were determined using a chemiluminescence assay (ADVIA Centaur Systems Progesterone Kit; Siemens, Ref. 01586287; sensitivity of 0.21 ng/mL), with an intra- and inter-assay coefficients of variation below to 12%.

## 2.2. *Experiment 2*

Experiment 2 was designed to compare the P/AI between the GnRH34, EC-GnRH34, and EC-GnRH48 protocols in postpartum Nelore beef cows. The EC-GnRH48 protocol was included as a third group to compare the GnRH34 and EC-GnRH34 treatments with a conventional protocol that uses GnRH at TAI 48 h after IPD removal but only in cows that did not display estrus from IPD removal to TAI (Sa Filho, 2014).

This study was conducted on two commercial farms in the Amazon biome. The animals were maintained in a grazing system (*Brachiaria brizantha*) with ad libitum access to trace mineral salts and water. This study used 981 suckled Nelore cows (214 primiparous and 767 multiparous) with BCS ranging from 2.5 to 4. The TAI protocol (similar to Experiment 1) was initiated between 30 and 120 days postpartum. The BCS of the cows was also evaluated using the VetScore device, which classifies the BCS of cows included in TAI programs as low (L), adequate (A), or excessive (E) [18]. In addition to the groups in Experiment 1, the EC-GnRH48 group was included in Experiment 2. For this group, cows received 0.6 mg i.m. of EC on Day 8 and cows that did not display estrus between IPD removal and TAI, on Day 10, received a dosis of GnRH (10.5 µg i.m. of buserelin acetate, Gonaxal®, Biogenesis Bagó, Buenos Aires, Argentina) at that time. The groups used in this study were the GnRH34 (n = 322), EC-GnRH34 (n = 335), and EC-GnRH48 (n = 324)



groups. The distribution of cows according to category, BCS, and calving–TAI interval is shown in Table 1.

On Day 8, all cows were painted with a chalk marker on the sacrocaudal region to identify animals that displayed estrus. At TAI, estrus was evaluated, and deemed to have occurred in cows without a tail-head chalk mark (>75% paint loss). All cows were inseminated 48 h after IPD removal. Frozen/thawed semen from six sires was used for TAI and equally distributed between treatments. The cows included in this study were not exposed to sires after TAI. The pregnancy status was assessed by ultrasonic examination 30 days after TAI. Pregnancy was determined by visualizing embryonic vesicles and embryos.

### 2.3. *Statistical analyses*

All statistical analyses were performed using SAS software (SAS Institute, Cary, NC, USA). In Experiment 1, single-point outcome variables (e.g., time of ovulation, follicle growth, diameter of the POF, LTA, CLBF, adjusted CLBF, and plasma progesterone concentration) were analyzed using ANOVA (PROC GLIMMIX; SAS Inst. Inc., Cary, NC). The ovulation rate was analyzed using the Chi-square test.

In Experiment 2, the occurrence of estrus and P/AI was analyzed using logistic regression. The variables initially included in the model were treatment, farm, sire, BCS (LAE scale), category (primiparous or multiparous), and calving-TAI interval (early, <40 d; middle, 41–60 d; late, > 60 d). These variables were considered fixed effects. The variables farm, sire, BCS, and calving-TAI interval had no significant effect on the occurrence of estrus and P/AI, and were therefore excluded from the model. Logistic regression was used to analyze the effects of treatment, category, and their interactions on the occurrence of estrus and P/AI. Another round of analyses was performed to evaluate the effect of treatment on P/AI according to the occurrence of estrus (yes/no). Therefore, the effect of treatment on P/AI was evaluated using the chi-square test for each estrus status (yes/no).

Results are expressed as means  $\pm$  SEM or as percentages. In all analyses, differences were considered significant when  $P \leq 0.05$ , and a probability between 0.051 and 0.1 was considered a trend.

### 3. Results

#### 3.1 *Experiment 1*

The ovarian responses observed in Experiment 1 are summarized in Table 2. No differences in the time of ovulation, proportion of cows ovulating, or POF diameter were detected between the groups ( $P > 0.05$ ). However, cows in the EC-GnRH34 group had a higher follicle growth rate than cows in the GnRH34 group ( $P = 0.04$ ). The distribution and percentage of cows that ovulated after IPD removal in the GnRH34 and EC-GnRH34 groups are shown in Fig. 1. In both groups, most animals ovulated 60–72 h after IPD removal.

The CL characteristics such as LTA, CLBF, adjusted CLBF, and plasma progesterone concentration also did not differ ( $P > 0.05$ ) between treatments (Fig. 2).

#### 3.2 *Experiment 2*

There were no significant effects of farm ( $P = 0.36$ ), sire semen used for TAI ( $P = 0.26$ ), BCS (based on VetScore;  $P = 0.73$ ), or calving-TAI interval ( $P = 0.49$ ) on P/AI (Table 3). Proportions of cows detected in estrus at TAI and P/AI according to treatment and animal category are presented in Table 4. The P/AI did not differ among the groups ( $P = 0.45$ ) or between categories ( $P = 0.12$ ). In addition, no treatment  $\times$  category interaction ( $P = 0.5$ ) on P/AI was observed. Conversely, the P/AI in the group EC-GnRH34 tended to be greater than that in the GnRH34 group ( $P = 0.1$ ). The proportion of cows detected in estrus was greater ( $P < 0.0001$ ) among cows treated with EC (EC-GnRH34 and EC-GnRH48) than among cows in the GnRH34 group. Moreover, the proportion of multiparous cows in estrus was greater ( $P < 0.0001$ ) than for primiparous cows, and no interaction effect of treatment  $\times$  category ( $P = 0.63$ ) on the proportion of cows in estrus was observed.

The P/AI according to estrus detection is shown in Fig. 3. Considering only cows that did not display estrus in Experiment 2, those treated solely with GnRH 34 h after IPD removal had a greater ( $P < 0.05$ ) P/AI than did cows in the EC-GnRH48 group. In contrast,

considering only cows that displayed estrus, those in the GnRH34 group had a lower ( $P < 0.05$ ) P/AI than did cows in the EC-GnRH34 and EC-GnRH48 groups (Fig. 3).

#### 4. Discussion

We compared ovulation synchrony and fertility in suckled *B. indicus* beef cows subjected to different treatment protocols that involve use of GnRH along with EC or in the absence of EC. The results of our experiments provided partial evidential support for our hypotheses; although the time of ovulation and ovulation synchrony in cows treated with the GnRH34 protocol were similar to those in cows treated with EC-GnRH34, P/AI was generally greater for cows treated with EC-GnRH34 than for those treated with GnRH34, and was similar to those treated with EC-GnRH48.

Although no differences were observed in POF diameter between the groups in Experiment 1, follicle growth rate was higher among cows treated with EC than in cows that were not given EC. Previous study has shown that when injected at the end of the E2/P4-based protocol, EC promotes ovulation by inducing an LH peak in *B. indicus* [19] and *B. taurus* cows [20]. Estrogens has been implicated in synergizing action with FSH for granulosa cell differentiation including CYP19A1 (aromatase) and LHCGR (LH receptor) upregulation [21,22]. This suggests that the higher follicle growth rate observed in cows treated with EC might be due to increased LH receptor abundance, which is maximal in granulosa cells from preovulatory follicles immediately before ovulation induction [23].

In the E2/P4-based protocols, in which ovulation was induced with 0.5 mg or 1 mg EC at the time of IPD removal, an increase in serum estradiol concentration was observed 24 h after treatment [24]. Application of EC increases circulating E2 in the preovulatory period, and such an increase, along with additional E2 released from the follicle, may be required to trigger estrus, and has also been associated with postovulatory uterine function [[24], [25], [26], [27]]. These changes appear to play critical roles in the programming of uterine function during early pregnancy. For instance, serum E2 concentrations at the time of GnRH treatment is considered to be among the most important factors determining pregnancy outcomes after embryo transfer in recipient cows [28]. Increased P/AI in cows

treated with EC-GnRH34 indicates that EC injection, as performed in Experiment 2, may contribute to greater pregnancy rates in TAI beef cows. Therefore, although GnRH34 provided optimal ovulation synchronization (with ~85% of the cows ovulating between 60 and 72 h), our results suggest that EC injection may be necessary to achieve satisfactory fertility outcomes in GnRH34 cows.

Intramuscular injection of GnRH induces ovulation within 26–30 h [8,[29], [30], [31]]. Previous studies have shown that cows treated with EC-GnRH34 ovulated at  $66.0 \pm 0.0$  h, whereas cows treated only with EC, as an ovulation inducer, ovulated ~11 h later [6]. In the present study, cows subjected to the GnRH34 and EC-GnRH34 protocols ovulated at  $61.6 \pm 2.7$  h and  $68 \pm 2.6$  h after IPD removal, respectively. Therefore, for these groups, we estimated that the mean intervals from TAI to ovulation were approximately 14 h and 20 h, respectively. The timing of AI in relation to ovulation is important for attaining a successful pregnancy rate [32]. Previously, we found that fertility was improved when synchrony between the time of ovulation and TAI was increased [33]. A second reproductive characteristic closely associated with fertility in cows subjected to E2/P4-based TAI programs is the capacity of cows to display estrus before TAI. Previous work has shown that cows that have undergone TAI in estrus were more likely to become pregnant than were cows that did not display estrus [11,34,35], inspiring researchers to explore the strategic use of GnRH in cows that do not enter into estrus during TAI [14,36,37]. Programs of TAI, in which cows that were not in estrus until 48 h after IPD removal received GnRH and were inseminated 8 h later have generated intriguing results [9], suggesting that TAI performed 8 h [9] or 14 h [6] after GnRH administration are nearer to the time of ovulation. Thus, cows that did not display estrus and were conventionally treated with GnRH concurrently with AI would have a longer interval between TAI and ovulation, consequently resulting in ovulation more likely to occur in the absence or reduced number of viable sperm cells in the female oviducts [38]. Moreover, it was also reported that treatment with EC at the time of IPD removal may induce estrus independent of the presence of a preovulatory follicle in the ovary – that is, pharmacological estrus with no endogenous E2 production

[39]. In light of the fact that some EC-treated cows in the EC-GnRH48 group displayed pharmacological estrus and that the TAI-ovulation interval of these cows may not be optimal for fertility, we were optimistic that P/AI would be greater among EC-GnRH34-treated cows than it would be in cows in the EC-GnRH48 protocol. However, although P/AI was 7.2% higher in cows treated with EC-GnRH34 than those treated with EC-GnRH48, fertility did not significantly differ between the two groups.

Notably, the GnRH34 protocol achieved the highest P/AI in cows that did not exhibit estrus. It has been shown that cows in estrus ovulate earlier than those that did not show estrus at TAI [20,40], and cows with longer AI-ovulation intervals had a lower likelihood of pregnancy [33]. As such, we inferred that the greater rate of P/AI in cows that did not display estrus at the time of TAI was most likely due to the shortened AI-ovulation interval in cows treated with GnRH 34 h after IPD removal, disregarding estrus status, as was observed in the GnRH34 and EC-GnRH34 groups. However, it is important to note that the GnRH34 group had a greater proportion of cows that did not display estrus.

To evaluate the effects of GnRH34 and EC-GnRH34 on CL function in Experiment 1, we examined luteal tissue area (LTA), blood flow to the CL (CLBF), the CLBF:LTA ratio, and plasma P4 concentration, but none of these variables differed among the experimental treatments. Likewise, Barbosa et al. [6] also did not observe differences in CL function between cows treated with EC-GnRH34 and cows treated solely with EC at the time of IPD removal. We therefore concluded that the enhanced P/AI we observed following EC-GnRH34 treatment was not associated with increased ovulation synchrony or improved luteal function. However, the effect EC has on the endometrium might account for this result, as reported previously [24].

## **5. Conclusion**

Although ovulation synchronization did not differ between the groups, cows treated with the EC-GnRH34 protocol tended to have improved P/AI relative to cows treated solely with GnRH34. Moreover, no differences in P/AI were observed between cows in the EC-GnRH34 and EC-GnRH48 groups, which represent the conventional protocols used in

South American beef production operations. As such, considering the extent of direct handling required to treat cows with GnRH 34 h after P4 removal, we suggest that administration of GnRH at TAI for cows that fail to show signs of estrus up to 48 h after IPD removal is the most cost-effective and efficient approach to TAI, as this strategy results in a P/AI similar to that observed in cows treated with the EC-GnRH34 protocol.

#### **Declaration of competing interest**

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported. **CRedit authorship contribution statement**

**Samira A. Silva:** Data curation, Writing e original draft, Perform the experiment, writing the MS. **Rafael G. Mondadori:** Data curation, Formal analysis, Writing e original draft, Formal analysis, writing the MS. **Gabrielly S. Noletto:** Perform the experiment. **Ingrid P. Barbosa:** Perform the experiment. **Reuel L. Gonçalves:** Formal analysis, writing the MS. **Bernardo G. Gasperin:** Data curation, Formal analysis, Writing e original draft, Formal analysis, writing the MS. **Monique T. Rovani:** Data curation, Formal analysis, Writing e original draft, Formal analysis, writing the MS. **Eanes F. Paz:** Perform the experiment. **Leonardo S. Gomes:** Perform the experiment. **Luiz F.M. Pfeifer:** Formal analysis, Writing e original draft, Perform the experiment, Formal analysis, Data curation, writing the MS.

#### **Acknowledgments**

Financial support for this study was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; 303544/2022-88), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Rondônia (FAPERRO, Universal Project 0012.366568/2021-94), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS; 06/2021 – RITEs-RS, 22/2551–0000391–5). Sponsors did not participate in data collection or preparation of the manuscript, nor in the decision to submit the paper for publication.

## References

- [1] ASBIA. Index Associação brasileira de inseminação artificial (Brazilian Society of Artificial Insemination). 2022.
- [2] Bo GA, Baruselli PS, Martinez MF. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci* 2003;78:307–26. <https://doi.org/S0378432003000976> [pii].
- [3] Ayres H, Martins CM, Ferreira RM, Mello JE, Dominguez JH, Souza AH, et al. Effect of timing of estradiol benzoate administration upon synchronization of ovulation in suckling Nelore cows (*Bos indicus*) treated with a progesterone-releasing intravaginal device. *Anim Reprod Sci* 2008;109:77–87. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.12.001>.
- [4] Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. *Theriogenology* 2003;60:855–65.
- [5] Torres Jr. JR, Penteado L, Sales JN, Sa Filho MF, Ayres H, Baruselli PS. A comparison of two different esters of estradiol for the induction of ovulation in an estradiol plus progestin-based timed artificial insemination protocol for suckled *Bos indicus* beef cows. *Anim Reprod Sci* 2014;151:9–14. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.09.019>.
- [6] Barbosa IP, Cestaro JP, Silva SA, Noleto GS, Gonçalves RL, Silva GM, et al. GnRH34: An alternative for increasing pregnancy in timed AI beef cows. *Theriogenology* 2022;179:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.11.014>.
- [7] Pulley SL, Keisler DH, Stevenson JS. Concentrations of luteinizing hormone and ovulatory responses in dairy cows before timed artificial insemination. *J Dairy Sci* 2015;98:6188–201. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9473>.
- [8] Liu TC, Ho CT, Li KP, Chang CC, Chan JPW. Human chorionic gonadotropin (hCG)-induced ovulation occurs later but with equal occurrence in lactating dairy cows: Comparing hCG and gonadotropin-releasing hormone protocols. *J Reprod Dev* 2019;65:507–14. <https://doi.org/10.1262/jrd.2019-037>.
- [9] Cedeño A V., Cuervo R, Tríbulo A, Tríbulo R, Andrada S, Mapletoft R, 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* 2021;161:294–300. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.12.014>.

- [10] Madureira G, Consentini CEC, Motta JCL, Drum JN, Prata AB, Monteiro PLJ, 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* 2020;145:86–93. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.033>.
- [11] M.F. Sa Filho, J.E. Santos, R.M. Ferreira, J.N. Sales, P.S. Baruselli. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. *Theriogenology*, 76 (2011), pp. 455-463. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.022>
- [12] G.A. Perry, B.L. Perry GnRH treatment at artificial insemination in beef cattle fails to increase plasma progesterone concentrations or pregnancy rates. *Theriogenology*, 71 (2009), pp. 775-779. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.050>
- [13] Hill SL, Grieger DM, Olson KC, Jaeger JR, Dahlen CR, Crosswhite MR, 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. *J Anim Sci* 2016;94:3722–8. <https://doi.org/10.2527/jas.2016-0582>.
- [14] Bishop BE, Thomas JM, Abel JM, Poock SE, Ellersieck MR, Smith MF, et al. Split-time artificial insemination in beef cattle: II. Comparing pregnancy rates among nonestrous heifers based on administration of GnRH at AI. *Theriogenology* 2017;87:229–34. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.029>.
- [15] Rodrigues WB, Silva AS, Silva JCB, Anache NA, Silva KC, Cardoso CJT, et al. Timed artificial insemination plus heat II: gonadorelin injection in cows with low estrus expression scores increased pregnancy in progesterone/estradiol-based protocol. *Animal* 2019:1–6. <https://doi.org/10.1017/S1751731119000454>.
- [16] Christian CA, Moenter SM. The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocr Rev* 2010;31:544–77.



<https://doi.org/10.1210/er.2009-0023>.

- [17] Kaim M, Bloch A, Wolfenson D, Braw-Tal R, Rosenberg M, Voet H, et al. Effects of GnRH administered to cows at the onset of estrus on timing of ovulation, endocrine responses, and conception. *J Dairy Sci* 2003;86:2012–21. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73790-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73790-4).
- [18] Pfeifer LFM, Castro NA, Neves PMA, Cestaro JP, Siqueira LGB. Development and validation of an objective method for the assessment of body condition scores and selection of beef cows for timed artificial insemination. *Livest Sci* 2017;197. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.01.011>.
- [19] Sales JN, Carvalho JB, Crepaldi GA, Cipriano RS, Jacomini JO, Maio JR, et al. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* 2012;78:510–6. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.031>.
- [20] Souza AH, Viechnieski S, Lima FA, Silva FF, Araujo R, Bo GA, et al. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology* 2009;72:10–21. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.12.025>.
- [21] Adashi EY, Hsueh AJW. Estrogens augment the stimulation of ovarian aromatase activity by follicle-stimulating hormone in cultured rat granulosa cells. *J Biol Chem* 1982;257:6077–83. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(20\)65107-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(20)65107-9).
- [22] Ikeda S, Nakamura K, Kogure K, Omori Y, Yamashita S, Kubota K, et al. Effect of estrogen on the expression of luteinizing hormone-human chorionic gonadotropin receptor messenger ribonucleic acid in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 2008;149:1524–33. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1163>.
- [23] Jeppesen JV, Kristensen SG, Nielsen ME, Humaidan P, Dal Canto M, Fadini R, et al. LH-receptor gene expression in human granulosa and cumulus cells from antral and preovulatory follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:22659248. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-1427>.

- [24] Bosolasco D, Nuñez-Olivera R, de Brun V, Meikle A, Menchaca A. Estradiol cypionate administered at the end of a progesterone-based protocol for FTAI induces ovulation and improves postovulatory luteal function and uterine environment in anestrous beef cows. *Theriogenology* 2021;162:74–83. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.01.003>.
- [25] Vasconcelos JLM, Pereira MHC, Meneghetti M, Dias CC, Filho OGS, Peres RFG. Relationships between growth of the preovulatory follicle and gestation success in lactating dairy cows. *Anim Reprod* 2013:206–14.
- [26] Bridges GA, Day ML, Geary TW, Cruppe LH. <Bridges-2013-Triennial Reproduction Symposium\_.pdf> 2013:3002–13. <https://doi.org/10.2527/jas2013-5882>.
- [27] Binelli M, Pugliesi G, Hoeck V V., Sponchiado M, Ramos RS, Oliveira ML, et al. The role of proestrus on fertility and postovulatory uterine function in the cow. *Anim Reprod* 2014;11:246–53.
- [28] Atkins JA, Smith MF, Macneil MD, Jinks EM, Abreu FM, Alexander LJ, et al. Pregnancy establishment and maintenance in cattle. *J Anim Sci* 2013;91:722–33. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5368>.
- [29] Twagiramungu H, Guilbault LA, Proulx J, Dufour JJ. Synchronization of estrus and fertility in beef cattle with two injections of buserelin and prostaglandin. *Theriogenology* 1992;38:1131–44. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90126-C](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90126-C).
- [30] Twagiramungu H, Guilbault LA, Proulx JG, Dufour JJ. Buserelin alters the development of the corpora lutea in cyclic and early postpartum cows. *J Anim Sci* 1995;73:805–11. <https://doi.org/10.2527/1995.733805x>.
- [31] Schmitt EJP, Drost M, Diaz T, Roomes C, Thatcher WW. Effect of a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist on Follicle Recruitment and Pregnancy Rate in Cattle. *J Anim Sci* 1996;74:154–61. <https://doi.org/10.2527/1996.741154x>.
- [32] Saacke RG. Insemination factors related to timed AI in cattle. *Theriogenology* 2008;70:479–84. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.015>.
- [33] Pfeifer LFM, Castro NA, Melo VTO, Neves PMA, Cestaro JP, Schneider A. Timed artificial insemination in blocks: A new alternative to improve fertility in lactating beef cows. *Anim*

Reprod Sci 2015;163. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.10.002>.

- [34] Nogueira E, Silva MR, Silva JCB, Abreu UPG, Anache NA, Silva KC, et al. Timed artificial insemination plus heat I: effect of estrus expression scores on pregnancy of cows subjected to progesterone-estradiol-based protocols. *Animal* 2019;1–8. <https://doi.org/10.1017/S1751731119000442>.
- [35] Pfeifer LFM, Moreira EM, Silva GM, de Souza VL, Nunes VR., Andrade JS, et al. Effect of estradiol cypionate on estrus expression and pregnancy in timed artificially inseminated beef cows. *Livest Sci* 2020;231:103886. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.103886>.
- [36] Thomas JM, Poock SE, Ellersieck MR, Smith MF, Patterson DJ. Delayed insemination of non-estrous heifers and cows when using conventional semen in timed artificial insemination. *J Anim Sci* 2014;92:4189–97. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-7827>.
- [37] Bishop BE, Thomas JM, Abel JM, Poock SE, Ellersieck MR, Smith MF, et al. Split-time artificial insemination in beef cattle: I—Using estrous response to determine the optimal time(s) at which to administer GnRH in beef heifers and postpartum cows. *Theriogenology* 2016;86:1102–10. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.043>.
- [38] Dalton JC, Nadir S, Bame JH, Noftsinger M, Nebel RL, Saacke RG. Effect of time of insemination on number of accessory sperm, fertilization rate, and embryo quality in nonlactating dairy cattle. *J Dairy Sci* 2001;84:2413–8. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74690-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74690-5).
- [39] Pfeifer LFM, Moreira EM, da Silva GM, de Souza VL, Nunes VRR, Andrade JDS, et al. Effect of estradiol cypionate on estrus expression and pregnancy in timed artificially inseminated beef cows. *Livest Sci* 2020;231. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.103886>.
- [40] Oliveira Junior JS, Moreira G, Rachele V, Nunes R, Andrade ER, Seneda MM. Anticipation of estrus and ovulation in Nelore heifers with low antral follicle count 2022;2022:1–8.

**Table 1.** Number of cows in each category, BCS, and average of calving-TAI interval according to groups in Experiment 2.

	GnRH34	EC-GnRH34	EC-GnRH48
<b>Category</b>			
Primiparous	69	72	73
Multiparous	253	263	251
<b>BCS by Vetscore<sup>a</sup></b>			
Red	31	34	40
Green	278	290	269
Yellow	13	11	15
<b>Farm</b>			
1	238	244	242
2	84	91	82
Calving – TAI interval	71,88 ± 6,55	72,51 ± 6,60	73,61 ± 6,74

<sup>a</sup>Devices used to classify the BCS of cows subjected to TAI protocols into red (low), green (adequate), and yellow (excessive).

**Table 2.** Ovarian responses in Nelore suckled cows treated with GnRH34 or EC-GnRH34 for ovulation induction in the Experiment 1. All cows were treated with GnRH 34 h after IPD removal. However, only cows from EC-GnRH34 group were treated with 0.6 mg of EC at IPD removal.

	GnRH34	EC-GnRH34	P-value
Time of ovulation (h) <sup>a</sup> (95% confidence intervals)	61.6 ± 2.7 (55.9 – 67.4)	68.0 ± 2.6 (62.5 – 73.5)	0.11
Proportion of cows ovulating by 120 h after IPD removal	84.6% (11/13)	92.3% (12/13)	0.53
Diameter of POF (mm) <sup>b</sup>	13.2 ± 0.69	12.8 ± 0.68	0.68
Follicle growth rate <sup>c</sup> , mm/d	0.9 ± 0.17	1.4 ± 0.16	0.04

<sup>a</sup>after intravaginal P4 insert removal

<sup>b</sup>POF, preovulatory follicle

<sup>c</sup>Difference calculated from the maximal diameter of POF minus the diameter of POF on day 9 divided by days.

**Table 3.** Pregnancy per artificial insemination (AI) according to farm, sire semen used for timed AI, body condition score (BCS) evaluated by the Vetscore's device, and calving-TAI interval in the Experiment.

		Pregnancy per AI, %	P-value
Farm	1	61.6 (446/724)	0.36
	2	58.4 (150/257)	
Sire semen	1	55.6 (75/135)	0.26
	2	68.1 (64/94)	
	3	59.5 (179/301)	
	4	66.9 (109/163)	
	5	62.9 (56/89)	
	6	56.8 (113/199)	
BCS by Vetscore <sup>a</sup>	Red	61.9 (65/105)	0.73
	Green	60.8 (509/837)	
	Yellow	56.4 (22/39)	
Calving-TAI interval	Early	59.3 (182/307)	0.49
	Middle	59.7 (221/370)	
	Late	63.5 (193/304)	

<sup>a</sup> Devices used classify the BCS of cows subjected to TAI protocols into red (low), green (adequate), an yellow (excessive).

**Table 4.** Estrus expression rate at timed AI, and pregnancy per AI according to treatment (GnRH34, EC-GnRH34, and EC-GnRH48), and to animal category (primiparous and multiparous). Cows from GnRH34 group were not treated with EC at IPD removal and were treated with GnRH 34h later. Only cows from EC-GnRH34 and EC-GnRH48 groups were treated with EC at IPD removal; however, EC-GnRH34 cows were treated with GnRH 34h later. In EC-GnRH48 group, only cows that did not display estrus received GnRH at TAI.

	Group			Category		P-value		
	GnRH34	EC-GnRH34	EC-GnRH48	Primiparous	Multiparous	Group	Category	Group*Category
Estrus expression rate, % (n/total)	45.6 <sup>A</sup> (147/322)	69.0 <sup>B</sup> (231/335)	64.8 <sup>B</sup> (210/324)	37.8 (81/214)	66.1 (507/767)	<0.0001	<0.0001	0.63
Pregnancy per AI, % (n/total)	58.0 <sup>a</sup> (187/322)	64.2 <sup>b</sup> (215/335)	59.9 <sup>ab</sup> (194/324)	54.7 (117/214)	62.4 (479/767)	0.45	0.12	0.5

<sup>A</sup><sup>B</sup>Different letters indicate difference between treatments ( $P < 0.05$ ).

<sup>a</sup><sup>b</sup>Different letters indicate tendency between treatment ( $P \leq 0.1$ ).

Figures.

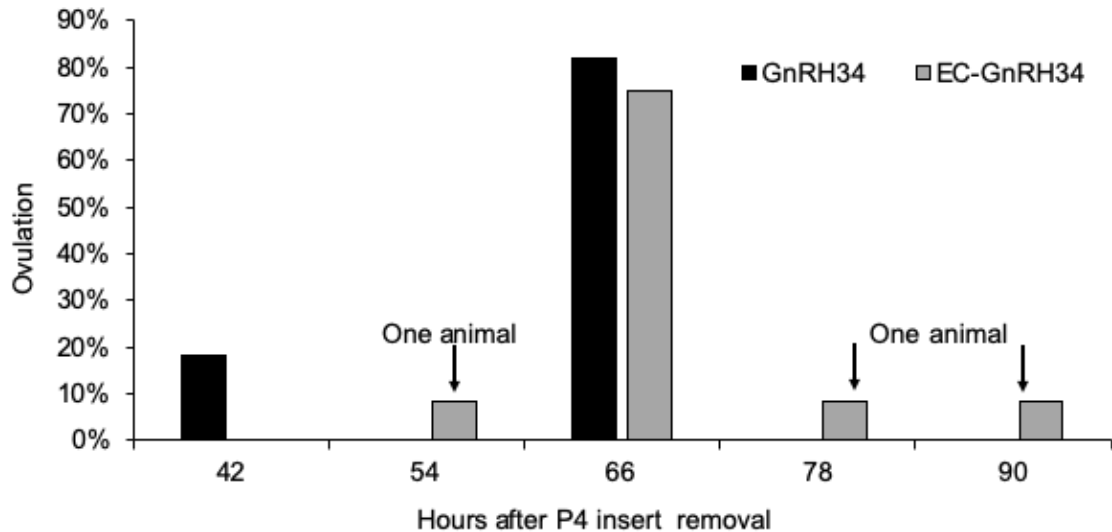


Figure 1. Distribution and percentage of cows ovulating after IPD removal in Nelore suckled cows treated with GnRH34 or EC-GnRH34 for ovulation induction (Experiment 1). All cows were treated with GnRH 34 h after IPD removal. However, only cows from EC-GnRH34 group were treated with 0.6 mg of EC at IPD removal.

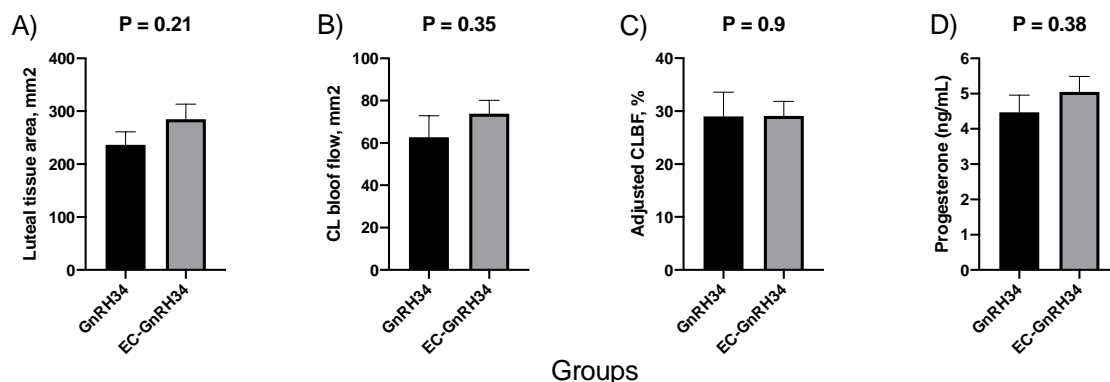


Figure 2. Features of the corpus luteum (CL) and plasma progesterone concentration in Nelore suckled cows treated with GnRH34 or EC-GnRH34 for ovulation induction (Experiment 1). All cows were treated with GnRH 34 h after IPD removal. However, only cows from EC-GnRH34 group were treated with 0.6 mg of EC at IPD removal. Data are mean  $\pm$  SEM. (A) Luteal tissue area (LTA); (B) amount of blood flow to the CL (CLBF); (C) CLBF:LTA ratio (adjusted CLBF in %), and (D) plasma progesterone concentration.



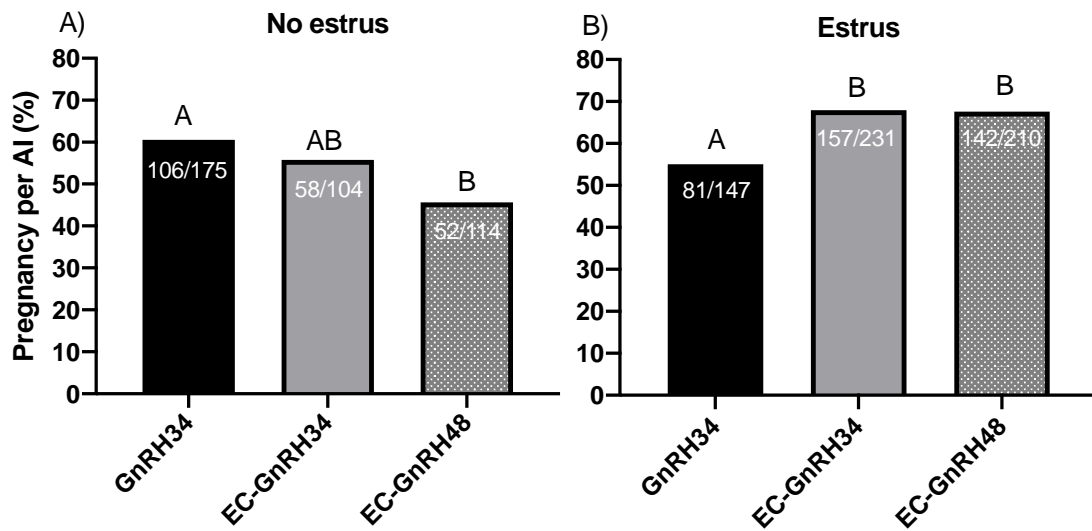


Figure 3. Pregnancy per AI in suckled Nelore beef cows according to treatment (GnRH34, EC-GnRH34, and EC-GnRH48), and estrus detection at TAI (Experiment 2). Cows from GnRH34 group were not treated with EC at IPD removal and were treated with GnRH 34h later. Only cows from EC-GnRH34 and EC-GnRH48 groups were treated with EC at IPD removal; however, EC-GnRH34 group was treated with GnRH 34h later. Cows from EC-GnRH48 received GnRH at TAI only in cows that did not display estrus. Different letters indicate the effect between treatments ( $P < 0.05$ ). The number of pregnant cows and the total number of cows per treatment are represented on each bar.

#### **4 Considerações Finais**

Embora a sincronização da ovulação não tenha diferido entre os grupos, as vacas tratadas com o protocolo CE-GnRH34 tenderam a ter melhor P/AI em relação às vacas tratadas apenas com GnRH34. Além disso, não foram observadas diferenças na P/AI entre vacas dos grupos CE-GnRH34 e CE-GnRH48, sendo que esse (CE-GnRH48) representa o protocolo convencional utilizado nos programas de IATF na América do Sul.

Assim, considerando a extensão do manejo direto necessário para tratar vacas com GnRH 34 h após a remoção de P4, a adoção da administração de GnRH na IATF para vacas que não apresentam sinais de estro até 48 h após a remoção da DIV é a abordagem de melhor custo-benefício para IATF, pois essa estratégia resulta em uma P/AI semelhante à observada em vacas tratadas com o protocolo CE-GnRH34.

Os dados apresentados neste estudo evidenciam que a utilização do GnRH de forma alternativa contribui para a melhora da eficiência reprodutiva de fêmeas que são submetidas a tratamentos hormonais para o controle do ciclo estral. Sendo que, a condução de mais estudos para avaliar de forma mais abrangente os efeitos do GnRH nível molecular no desenvolvimento folicular e ovulação, contribuirão para elucidar melhor os mecanismos que envolvem estes processos.

## Referências

**ABIEC.** Associação Brasileira de Indústrias Exportadoras de Carnes. 2023.

Disponível em: <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2023-capitulo-01/>

Acesso em: 29 de set. de 2023.15:50

ANDRADE, J. DE S. **Prostaglandina E2 na ovulação de camundongas pré-pubescentes.** 2017. 50f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2017.

**ASBIA.** Associação Brasileira de Inseminação Artificial. 2022. Disponível em:

<https://asbia.org.br/index-asbia/> Acesso em: 13 de dez. de 2023.16:06

AYRES, H. **Validação do escore de condição corporal e seu impacto na eficiência reprodutiva de vacas Nelore (Bos indicus) inseminadas em tempo fixo.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

ARMENGOL-GELONCH, R., MALLO, J. M., PONTÉ, D., JIMENEZ, A., VALENZA, A., SOUZA, A. H. Impact of phase of the estrous cycle and season on LH surge profile and fertility in dairy cows treated with different GnRH analogs (gonadorelin vs. buserelin). **Theriogenology**, v. 91, p. 121-126, 2017.

AZIZ, RL Abdel; ABDEL-WAHAB, A. Reproductive responses of primiparous and multiparous Holstein cows submitted to presynch-ovsynch protocol. **Beni-Suef University journal of basic and applied sciences**, v. 6, n. 2, p. 149-153, 2017.

BARUSELLI, Pietro Sampaio et al. Timed artificial insemination: current challenges and recent advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. **Animal Reproduction (AR)**, v. 14, n. 3, p. 558-571, 2018.

BARBOSA, I. P. et al., 2022. GnRH34: An alternative for increasing pregnancy in timed AI beef cows. **Theriogenology**, v.179, p.1-6, 2022.

BARNETT, K. R. et al. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 5, p. 537-555, 2006.

BIANCHINI, E. et al. Características corporais associadas com a adaptação ao calor em bovinos naturalizados brasileiros. **Pesquisa agropecuária Brasileira**. Brasília, v.41, n.9, p.1443-1448, 2006.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTÍNEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal reproduction science**, v. 78, n. 3-4, p. 307-326, 2003.

CARVALHO, G. M. C., Aspectos técnicos e científicos para a produção de bovinos compostos, tropicalmente adaptados, com o uso de recursos genéticos brasileiros. **Comunicado técnico** 253, EMBRAPA Meio-Norte, Teresina, 2019.

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.

CHRISTIAN, C. A.; MOENTER, S. M. The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. **Endocrine reviews**, v. 31, n. 4, p. 544-577, 2010.

CIECHANOWSKA, Magdalena et al. Neuroendocrine regulation of GnRH release and expression of GnRH and GnRH receptor genes in the hypothalamus-pituitary unit in different physiological states. **Reproductive biology**, v. 10, n. 2, p. 85-124, 2010.

COSTA, C. B.; FAIR, T.; SENEDA, M. M. Environment of the ovulatory follicle: modifications and use of biotechnologies to enhance oocyte competence and increase fertility in cattle. **Animal**, v. 17, p. 100866, 2023.

D'AVILA, C. A. et al. Hormônios utilizados na indução da ovulação em bovinos— Artigo de revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, n. 4, p. 797-802, 2019.

DAVOODI, S. et al. Expression of estrus modifies the gene expression profile in reproductive tissues on day 19 of gestation in beef cows. **Theriogenology**, v. 85, n. 4, p. 645-655, 2016.

DE MORAES, F. P. et al. Prostaglandin F<sub>2α</sub> regulation and function during ovulation and luteinization in cows. **Theriogenology**, v. 171, p. 30-37, 2021.

D'OCCHIO, M. J. et al. Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 433-442, 2000.

DOBSON, H. et al. A conceptual model of the influence of stress on female reproduction. **REPRODUCTION-CAMBRIDGE-**, v. 125, n. 2, p. 151-163, 2003.

DUFFY, D. M. et al. Ovulation: parallels with inflammatory processes. **Endocrine reviews**, v. 40, n. 2, p. 369-416, 2019.

FAIR, Trudee. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal reproduction science**, v. 78, n. 3-4, p. 203-216, 2003.

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

GIMENES, Lindsay Unno et al. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 852-858, 2008.

GINTHER, O. J. et al. Follicle selection in monovular species. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 3, p. 638-647, 2001.

HERBISON, A. E. A simple model of estrous cycle negative and positive feedback regulation of GnRH secretion. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 57, p. 100837, 2020

**IBGE**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html>. Acesso em: 17 de dez. de 2023.

LAVORATO, H. L. **Agonista versus antagonista do GnRH em ciclos de reprodução assistida: DNA fragmentação e apoptose das células da granulosa**. 2012. 67f. Dissertação (Mestrado em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia) - Universidade Estadual Paulista "Julio De Mesquita Filho" Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, 2012.

LOUGUERCIO, R. DA S. **Regulação de receptores esteroides e dinâmica folicular em um sistema de indução hormonal pós-parto em vacas de corte**. 2005. 80f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria Centro de Ciências Rurais, Santa Maria, 2005.

MADUREIRA, G., CONSENTINI, C. E., MOTTA, J. C., DRUM, J. N., PRATA, A. B., MONTEIRO JR, P. L., MELO, L. F., GONÇALVES, J. R. S., WILTBANK, M. C., SARTORI, R. 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.

MILLAR, R. P. GnRHs and GnRH receptors. **Animal reproduction science**, v. 88, n. 1-2, p. 5-28, 2005.

MARTINS, J. P. N., CUNHA, T. O., MARTINEZ, W., SCHMITT, J. S. et al. Presynchronization with prostaglandin F<sub>2α</sub> and gonadotropin-releasing hormone simultaneously improved first service pregnancy per artificial insemination in lactating Holstein cows compared with Presynch-14 when combined with detection of estrus. **Journal of Dairy Science**, v. 106, n.7, p. 5115-5126, 2023.

MARTÍNEZ, M. F. et al. Effects of estradiol on gonadotrophin release, estrus and ovulation in CIDR-treated beef cattle. **Domestic animal endocrinology**, v. 33, n. 1, p. 77-90, 2007.

MCART, J. A. A. et al. Ovsynch versus Ultrasynch: reproductive efficacy of a dairy cattle synchronization protocol incorporating corpus luteum function. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 6, p. 2525-2532, 2010.

MELLO, R. R. C. et al. Utilização da gonadotrofina coriônica equina (eCG) em protocolos de sincronização da ovulação para IATF em bovinos: revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 3, p. 129-134, 2014.

MEIRELLES, M. G. et al. Endocrinologia reprodutiva da égua gestante. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 1, n. 41, p. 316-325, 2017.

MONTEIRO, P. L. J. et al. Research on timed AI in beef cattle: Past, present and future, a 27-year perspective. **Theriogenology**, v.211, p. 161-171, 2023.

NOGUEIRA, E. et al. Timed artificial insemination plus heat I: effect of estrus expression scores on pregnancy of cows subjected to progesterone–estradiol-based protocols. **Animal**, v. 13, n. 10, p. 2305-2312, 2019.

NÚÑEZ-OLIVERA, R. et al. Effect of equine chorionic gonadotropin (eCG) administration and proestrus length on ovarian response, uterine functionality and pregnancy rate in beef heifers inseminated at a fixed-time. **Theriogenology**, v. 151, p. 16-27, 2020.

OLIVEIRA, J. H. F.; MAGNABOSCO, C. U.; BORGES, A. M. S. M. Nelore: Base Genética e Evolução Seletiva no Brasil. Documentos 49, **EMBRAPA Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados**. Planaltina, Distrito Federal, 2002.

PEREIRA, R. G. **Resposta a diferentes formas sintéticas de GnRH na espécie ovina**. 2017. 44f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Do Estado De Santa Catarina, Chapecó, 2017.

PFEIFER, Luiz F. M. et al. Development and validation of an objective method for the assessment of body condition scores and selection of beef cows for timed artificial insemination. **Livestock Science**, v. 197, p. 82-87, 2017.

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.

PFEIFER, L. F. M. et al. Prostaglandin F2 $\alpha$  or estradiol benzoate to induce ovulation in timed artificially inseminated dairy cows. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 51, p. 738-744, 2016.

POLIZEL, Fernando Franco. **Efeitos de diferentes doses e vias de administração de GnRH sobre a concentração sérica de LH, progesterona, taxas de ovulação e prenhez em vacas HPB**. 2019. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo, 2019.

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.

RATHBONE, M. J. et al. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. **Advanced drug delivery reviews**, v. 50, n. 3, p. 277-320, 2001.

RIVERA, F. A. et al. Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. **Reproduction**, v. 141, n. 3, p. 333, 2011.

RODRIGUES, W. B. et al. Timed artificial insemination plus heat II: gonadorelin injection in cows with low estrus expression scores increased pregnancy in progesterone/estradiol-based protocol. **Animal**, v. 13, n. 10, p. 2313-2318, 2019.

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.

SALES, J. N. DE S. et al. Is estradiol valerate an alternative to estradiol benzoate in promoting the synchronization of ovulation and timed artificial insemination in suckled *Bos indicus* beef cows? **Theriogenology**, v. 218, p. 56-61, 2024.

SÁ FILHO, M. F. de. **Importância da ocorrência de estro e do diâmetro follicular no momento da inseminação em protocolos de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em fêmeas zebuínas de corte**. 2012. 125f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) –Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2012.

SÁ FILHO, M. F. DE et al. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 455-463, 2011.

SAPER, C. B.; LOWELL, B. B. The hypothalamus. **Current Biology**, v. 24, n. 23, p. R1111-R1116, 2014.

SARTORI, R. et al. Manipulation of follicle development to improve fertility of cattle in timed-artificial insemination programs. **Animal**, v. 17, p. 100769, 2023.

E SILVA, L. O. et al. Effect of progesterone from corpus luteum, intravaginal implant, or both on luteinizing hormone release, ovulatory response, and subsequent luteal development after gonadotropin-releasing hormone treatment in cows. **Journal of Dairy Science**, v. 106, n. 6, p. 4413-4428, 2023.

E SILVA, L. O. et al. Influence of GnRH analog and dose on LH release and ovulatory response in *Bos indicus* heifers and cows on day seven of the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 214, p. 215-223, 2024.

SOUZA, A. H. et al. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. **Theriogenology**, v. 72, n. 1, p. 10-21, 2009.

SULLIVAN, S. D.; MOENTER, S. M. GABAergic integration of progesterone and androgen feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons. **Biology of reproduction**, v. 72, n. 1, p. 33-41, 2005.

TORRES-JÚNIOR, J. R. S. A comparison of two different esters of estradiol for the induction of ovulation in an estradiol plus progestin-based timed artificial insemination protocol for suckled *Bos indicus* beef cows. **Animal Reproduction Science**, v.151, p.9-14, 2014.

USLENGHI, G.; CHAVES, S. G.; CABODEVILA, J.; CALLEJAS, S. Effect of estradiol cypionate and amount of progesterone in the intravaginal device on synchronization of estrus, ovulation and on pregnancy rate in beef cows treated with FTAI based protocols. **Animal reproduction science**, v. 145, n. 1-2, p. 1-7, 2014.

VASCONCELOS, J. L. M. et al. Relationships between growth of the preovulatory follicle and gestation success in lactating dairy cows. **Animal Reproduction**, p. 206-214, 2013.

WEESNER, G. D. et al. Luteinizing hormone-releasing hormone gene expression in the bovine brain: anatomical localization and regulation by ovarian state. **Biology of reproduction**, v. 49, n. 2, p. 431-436, 1993.

WILTBANK, M. C. et al. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 1, p. 238-243, 2011.



## Anexos



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta identificada pelo **Protocolo CEUA Nº 02/2022**, intitulada **Efeito de indutores de ovulação na função luteal, ambiente uterino e fertilidade em vacas pós-parto** de responsabilidade do Pesquisador / Supervisor: Luiz Francisco Machado Pfeifer que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais bovinos, para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto Nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Rondônia, em reunião dia 04 de 08 de 2022.

Porto Velho 10 de Agosto de 2022.

  
Ricardo Gomes de Araujo Pereira  
Coordenador da CEUA Embrapa Rondonia