



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS  
CURSO DE DOUTORADO**



**FERTILIDADE DE VACAS DE CORTE EM  
PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO COM DIFERENTES  
INDUTORES DE OVULAÇÃO**

**NATHÁLIA ALBANEZE ANACHE**

Campo Grande – MS  
2023

**NATHÁLIA ALBANEZE ANACHE**

**FERTILIDADE DE VACAS DE CORTE EM  
PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO COM DIFERENTES  
INDUTORES DE OVULAÇÃO**

*Fertility of beef cows in synchronization protocols with different  
ovulation inducers*

**NATHALIA ALBANEZE ANACHE**

**Orientador: Ériklis Nogueira**

Monografia de Exame de Defesa  
apresentado ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Veterinárias da Universidade  
Federal de Mato Grosso do Sul, como  
requisito à obtenção do título de Doutor em  
Ciências Veterinárias.

Campo Grande – MS  
2023

## Sumário

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMO.....                                                                                                           | 7  |
| ABSTRACT.....                                                                                                         | 9  |
| CAPÍTULO 1: FERTILIDADE DE VACAS DE CORTE EM PROTOCOLOS DE<br>SINCRONIZAÇÃO COM DIFERENTES INDUTORES DE OVULAÇÃO..... | 11 |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL .....                                                                                             | 11 |
| 2. OBJETIVO GERAL.....                                                                                                | 13 |
| 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                                                      | 13 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA.....                                                                                         | 13 |
| 3.1. CICLO ESTRAL.....                                                                                                | 13 |
| 3.2. DETECÇÃO DO ESTRO.....                                                                                           | 14 |
| 3.3. DINÂMICA FOLICULAR.....                                                                                          | 15 |
| 3.4. INDUTORES DE OVULAÇÃO .....                                                                                      | 18 |
| 3.4.1. HORMÔNIO LIBERADOR DE GONADOTROFINAS (GNRH) .....                                                              | 18 |
| 3.4.2. GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA (HCG) .....                                                                     | 18 |
| 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                                                    | 20 |
| CAPÍTULO 2: DINÂMICA FOLICULAR E TEMPO DE OVULAÇÃO COM O USO DE<br>DIFERENTES DOSES DE HCG NO MOMENTO DA IATF. ....   | 26 |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                                    | 27 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS .....                                                                                          | 29 |
| ANIMAIS.....                                                                                                          | 29 |
| DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....                                                                                       | 29 |
| ANÁLISE ESTATÍSTICA .....                                                                                             | 31 |
| 3. RESULTADOS .....                                                                                                   | 31 |
| 4. DISCUSSÃO.....                                                                                                     | 33 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                                                    | 38 |

|                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| CAPÍTULO 3: USO DE DIFERENTES INDUTORES DE OVULAÇÃO COM AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CIO (ESCT) EM PROTOCOLOS DE IATF. .... | 44 |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                                       | 45 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                              | 46 |
| ANIMAIS.....                                                                                                             | 46 |
| DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....                                                                                          | 47 |
| ANÁLISE ESTATÍSTICA .....                                                                                                | 48 |
| 3. RESULTADOS .....                                                                                                      | 48 |
| 4. DISCUSSÃO.....                                                                                                        | 50 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA .....                                                                                       | 57 |
| CAPÍTULO 4.....                                                                                                          | 63 |
| 1. CRONOGRAMA .....                                                                                                      | 63 |
| 2. JUSTIFICATIVAS .....                                                                                                  | 64 |
| ANEXOS.....                                                                                                              | 65 |
| 1. CÓPIA DO PROJETO APROVADO .....                                                                                       | 65 |
| 2. NORMAS DA REVISTA .....                                                                                               | 71 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura1. Delineamento experimental.....                                                                                                                                    | 31 |
| Figura 2. Taxa de ovulação e taxa de prenhez (%), com uso de diferentes doses de hCG no momento da IATF e diferentes ESCT.....                                             | 33 |
| Figura 3. Diâmetro do corpo lúteo (cm <sup>3</sup> ) 7 dias após a inseminação e aplicação de diferentes doses de hCG no momento da IATF e em diferentes ESCT.....         | 33 |
| Figura 4. Delineamento experimental.....                                                                                                                                   | 48 |
| Figura 5. Taxa de prenhez (%) de acordo com o uso de diferentes indutores adicionais de ovulação no momento da IATF e diferentes ESCT.....                                 | 49 |
| Figura 6. Distribuição dos animais por grupo experimental (%) de acordo com o uso de diferentes indutores adicionais de ovulação no momento da IATF e diferentes ESCT..... | 50 |

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tempo médio de ovulação, taxa de ovulação (%), diâmetro do CL ( $\text{cm}^3$ ) e taxa de prenhez (%), com uso de diferentes doses de hCG no momento da IATF e diferentes ESCT..... 32

Tabela 2. Taxa de prenhez (%) de acordo com uso de diferentes indutores adicionais de ovulação momento da IATF e diferentes ESCT.....49

## RESUMO

ANACHE, N.A. **Fertilidade de vacas de corte em protocolos de sincronização com diferentes indutores de ovulação.** 2023. Doutorado em ciências veterinárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.

Apesar dos evidentes avanços na produção de gado de corte, conferidos pelo desenvolvimento comercial da IATF, há diversos fatores intrínsecos ou extrínsecos ao animal que interferem nos resultados de prenhez, destacando-se aqueles inerentes à fêmea, como o anestro pós-parto e a condição corporal durante a estação de monta. Sabe-se que vacas que não apresentam cio durante o protocolo tendem a ter menor taxa de ovulação e, conseqüentemente, menor probabilidade de engravidar. Assim, esse trabalho avaliou estratégias para melhorar nas taxas de prenhez de vacas de corte, submetidas a protocolos de IATF com avaliações simples de cio (ESCT), dinâmica folicular e aplicação de dois diferentes indutores adicionais de ovulação (GnRH e hCG). Primeiramente foram testadas diferentes doses de hCG para verificar qual teria maior eficácia. Foram avaliadas 45 fêmeas da raça Nelore, submetidas ao protocolo de IATF. Os animais que apresentaram pouco ou nenhum cio (ESCT 2 e 1, respectivamente) foram divididos em três grupos, no dia da inseminação: controle (n=11): 1 ml de, I.M., de solução fisiológica, grupo 500 UI (n=12): aplicação de 500 UI, I.M. de hCG e grupo 1000 UI (n=12): aplicação de 1000 UI, I.M. de hCG. As vacas que apresentaram ESCT 3 (n=10) foram inseminadas no mesmo momento, sem aplicação de tratamento adicional. Após 7 dias da IATF foi avaliada a atividade ovariana por ultrassonografia transretal para avaliar o momento da ovulação (tempo médio e taxa de ovulação) e área de CL (cm<sup>3</sup>). O diagnóstico de gestação foi em torno de 30 dias após a IATF. Não houve diferença estatística entre os grupos, exceto para o tempo médio de ovulação, menor no grupo ESCT 3. Posteriormente, foram avaliadas 2.315 fêmeas zebuínas lactantes e da mesma forma, os animais ESCT 2 e 1 foram divididos em três grupos, no dia da inseminação: controle (n=301): não receberam nenhum

tratamento, GnRH (n=265): aplicação de 0,1 mg, I.M. de análogo agonista de GnRH (Gonadorelina) e hCG (n=267): aplicação de 1000 UI, I.M. de hCG. As vacas ESCT 3 (n= 1483) foram inseminadas no mesmo momento, sem aplicação de tratamento adicional. Foi realizado diagnóstico de gestação em torno de 35 dias após a IATF. Não houve diferença estatística ( $P < 0,001$ ) entre os grupos GnRH (48,3%) e hCG (53,05%), sendo ambos eficazes na indução da ovulação em animais ESCT 1 e 2, aumentando as taxas de prenhez.

**Palavras-chave:** Bastão marcador, dinâmica folicular, GnRH, hCG.



## ABSTRACT

ANACHE, N.A. **Fertility of beef cows in synchronization protocols with different ovulation inducers**. 2023. Doctorate in veterinary sciences. Graduate Program in Veterinary Sciences. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.

Despite the evident advances in the production of beef cattle, conferred by the commercial development of the IATF, the expected average pregnancy rate is estimated between 40 and 50%, and several factors may be related to these indices, highlighting those inherent to the female, such as postpartum anestrus and body condition. Brazilian producers generally inseminate all cows, regardless of whether the cow expresses estrus, even with studies indicating that estrus expression near FTAI is associated with greater fertility. Thus, this work evaluated strategies for improving pregnancy rates of beef cows, submitted to FTAI protocols with simple estrus evaluations (ESCT), follicular dynamics and application of two different additional ovulation inducers (GnRH and hCG). First, different doses of hCG were tested to see which would be more effective. Nellore females (n=45) were submitted to the FTAI protocol. The animals that showed little or no heat (ESCT 2 and 1, respectively) were divided into three groups on the day of insemination: control (n=11): 1 ml of, I.M., regulatory solution, group 500 IU (n= 12): application of 500 IU, I.M. of hCG and 1000 IU group (n=12): application of 1000 IU, I.M. of hCG. Cows that showed ESCT 3 (n=10) were inseminated at the same time, without the application of additional treatment. After 07 days of FTAI, follicular dynamics was evaluated by transrectal ultrasonography to assess the time of ovulation (mean time and ovulation rate) and CL area (cm<sup>3</sup>). The pregnancy diagnosis was around 30 days after FTAI. There was no statistical difference between the groups, except for the mean ovulation time, which was lower in the ESCT 3 group. After, 2.315 Nellore females were evaluated and, in the same way, ESCT 2 and 1 animals were divided into three groups, on the day of insemination: control (n=301): did not receive any treatment, GnRH (n=265): application of 0.1 mg, I.M. of Gonadorelin and hCG (n=267): application of 1000 IU, I.M. of hCG. ESCT 3 cows (n= 1483) were

inseminated at the same time, without application of additional treatment. A pregnancy diagnosis was made approximately 35 days after FTAI (with mode B ultrasound). Animal pregnancy rates were evaluated to compare the effects of ovulation inducers and there was no statistical difference ( $P < 0.001$ ) between the GnRH (48.3%) and hCG (53.05%) groups, both of which were effective in the induction of ovulation in animals that gave little or no heat (ESCT 1 and 2), increasing pregnancy rates when compared to the control group.

**Keywords:** Follicular dynamics, GnRH, hCG, marker stick.

## **CAPÍTULO 1: FERTILIDADE DE VACAS DE CORTE EM PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO COM DIFERENTES INDUTORES DE OVULAÇÃO.**

### **1. INTRODUÇÃO GERAL**

A produção de carne das regiões tropicais tem sido amplamente baseada no gado zebu (*Bos indicus*), principalmente por sua maior adaptação climática e ao sistema de manejo em pastejo extensivo (BARUSELLI et al., 2004). Almejando alcançar máximo potencial genético da espécie e aumentar a rentabilidade dos rebanhos, vem-se utilizando cada vez mais programas reprodutivos como a Inseminação artificial (IA), e a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), que permitem maior ganho genético e econômico (BARUSELLI et al., 2018).

Atualmente, os protocolos de IATF em bovinos de corte e leite estão bem estabelecidos, com taxas de prenhez entre 30 e 65%, sendo a média brasileira em torno de 50% (BARUSELLI et al., 2012; WILTBANK et al., 2014; BARUSELLI et al., 2017). Entretanto, aproximadamente 80% das vacas respondem ao tratamento, com a ovulação do folículo dominante, em protocolos com base em estrogênio e progesterona (P4) (SALES et al., 2012) e cerca de 85% em protocolos baseados em hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e prostaglandina (PGF2 $\alpha$ ) (SOUZA et al., 2007; SILVA et al., 2018).

A falta de resposta ao protocolo pode se dar devida a redução drástica na pulsatilidade de hormônio luteinizante (LH), observada principalmente em vacas primíparas e em vacas com baixo escore de condição corporal (ECC) (DISKIN et al., 2003; SALES et al., 2016). Para que a ovulação aconteça é necessário estimular o hipotálamo a produzir GnRH, para aumentar pulsatilidade de LH e permitir o crescimento final do folículo dominante.

Os efeitos positivos dos protocolos de sincronização da ovulação em vacas em anestro são, principalmente, devido à estimulação de P4 exógena na pulsatilidade de GnRH e LH, permitindo a ovulação de um folículo pré-ovulatório no período recente pós-parto (BARUSELLI et al., 2017), onde normalmente, nesse

período, a progesterona reduz a expressão de receptores de estradiol no hipotálamo interferindo na secreção de LH (IRELAND E ROCHE, 1982).

Para contornar esses desafios, tem sido utilizados indutores da ovulação em fêmeas classificadas segundo o escore de remoção de tinta na cauda, sendo aplicados naquelas com baixa ou nenhuma expressão de cio (ESCT 1 e 2) no momento da inseminação, para aumentar a porcentagem de fêmeas responsivas ao tratamento da IATF (NOGUEIRA et al., 2016).

O GnRH, usado como indutor da ovulação, induz uma onda de LH semelhante a pré-ovulatória em 2 horas e a ovulação entre 26 e 30 horas, respectivamente, e sua utilização na IATF, em fêmeas com baixa ou sem expressão de cio, melhora a sincronização da ovulação e taxas de prenhez (SÁ FILHO et al., 2010; RODRIGUES et al., 2019).

A gonadotrofina coriônica humana (hCG) é usada para induzir a ovulação em protocolos de IATF ou para formar o corpo lúteo (CL) acessório após inseminação (FRICKE et al., 1993; NASCIMENTO et al., 2013), porém nunca havia sido utilizada no dia da inseminação como alternativa para melhorar a resposta ovulatório e assim, melhora dos resultados de prenhez.

Alguns trabalhos que testaram a utilização do hCG como indutor de ovulação no início do protocolo de IATF, obtiveram efeitos semelhantes ao GnRH (BURNS et al., 2008; BUTTREY et al., 2010; LIU et al., 2019), além de terem efeito no aumento dos níveis de progesterona plasmática, redução das perdas embrionárias iniciais e assim, melhora da fertilidade (DE RENSIS et al., 2008; WALLACE et al., 2011).

Outro ponto chave para obter bons resultados na IATF e melhorar a taxa de prenhez é a qualidade do sêmen que será utilizado no protocolo (NOGUEIRA et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2014), fato que acaba limitando alguns resultados pela falta de preditores precisos de fertilidade em touros (BERRY et al., 2014). No Brasil, atualmente a maioria das metodologias de avaliação de sêmen de touros, baseadas em microscopia, classifica somente características exteriores nos espermatozoides, que garantem o alcance de padrões mínimos de qualidade reprodutiva (MANUAL CBRA, 2013).

## **2. OBJETIVO GERAL**

Alternativas farmacológicas para incremento das taxas de prenhez em vacas de corte submetidas a IATF.

### **2.1. Objetivos específicos**

1. Avaliar a eficácia da utilização de diferentes concentrações de hCG no momento da IATF em vacas que não expressaram cio.
2. Analisar a estratégia da utilização da avaliação de expressão de cio (ESCT), com diferentes indutores de ovulação para aumento de prenhez de IATF;
3. Determinar a influência da aplicação de análogo de GnRH e hCG sobre a taxa de prenhez em vacas zebuínas lactantes que não expressaram cio quando submetidas a IATF.

## **3. REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1. Ciclo Estral**

O ciclo estral dos bovinos dura, em média, 21 dias e divide-se em uma fase folicular (proestro e estro) e outra luteínica (metaestro e diestro), apresentando, em média, duas a três ondas de crescimento folicular (GINTHER et al., 1989; KANITZ, 2003).

O período de proestro, com duração de dois a três dias, é caracterizado pelo declínio nos níveis de progesterona, pelo desenvolvimento folicular e pelo aumento dos níveis de estradiol no sangue. Nessa fase, a liberação do GnRH pelo hipotálamo estimula a secreção de FSH e LH pela hipófise anterior. Os elevados níveis de FSH no sangue induzem o desenvolvimento dos folículos e, em sinergismo com o LH, estimulam a sua maturação.

O FSH permite que os folículos mantenham seu crescimento e proliferação celular, aumentando gradualmente sua capacidade esteroidogênica (ADAMS et al.,

1992). Entretanto, somente um (ou dois) folículo dominante adquire capacidade ovulatória, enquanto os outros (subordinados) entram em um processo de atresia (SARTORI et al., 2001; KANITZ, 2003).

Conforme o folículo dominante se desenvolve, aumenta a sua produção de estradiol, até atingir um nível limiar, que estimula a manifestação do cio e a liberação massiva do LH, dando início à segunda fase (ALRICH, 1994; GINTHER et al., 2003). No período de estro, com duração média de 12 horas, elevados níveis de estradiol, além de induzirem a manifestação do cio, é também responsável pela dilatação da cérvix, síntese e secreção do muco vaginal e o transporte dos espermatozóides no trato reprodutivo feminino.

Também foi relatado que o pH uterino diminuiu sob a influência do estrógeno, na fase estrogênica do ciclo, o que levou a uma diminuição potencial na motilidade dos espermatozóides, assim, aumentando sua vida útil até o momento da ovulação (PERRY E PERRY, 2008).

Durante o período de manifestação do cio, a vaca ou novilha fica agitada, deixa-se montar por outras vacas, reduz o apetite, diminui a produção de leite, apresenta corrimento muco vaginal claro e viscoso ou, também, presença de muco seco grudado no períneo ou cauda. A vulva apresenta-se edemaciada e com mucosa hiperêmica devido à elevada irrigação sanguínea. É o período que antecede a ovulação, no qual a fêmea está receptiva ao macho ou, apta para ser inseminada (HAFEZ, 1982).

Estudos também relataram recentemente que as taxas de prenhez poderiam ser aumentadas se fosse diminuído o período de crescimento do folículo dominante ovulatório e prolongada a duração do proestro (PONTES et al., 2008, COLAZO e AMBROSE, 2011, BÓ et al., 2016).

### **3.2. Detecção do estro**

O estro é o no qual a fêmea apresenta modificações fisiológicas e comportamentais que precedem a ocorrência da ovulação, que ocorre na fase subsequente do ciclo estral, no metaestro. Portanto, sua detecção é um importante fator para o sucesso dos programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF)

ou monta controlada (DISKIN E SREENAN, 2000; RAO et al., 2013), pois sabe-se que vacas que apresentam baixa expressão de cio ou não o apresentam, possuem menor probabilidade de emprenhar (SILVA et al., 2016).

Vacas que não apresentam cio durante o protocolo tendem a ter menor taxa de ovulação e, conseqüentemente, menor probabilidade de emprenhar (SILVA et al., 2016). Ademais, estudos indicam uma diminuição na perda de gestação em vacas quem exibem estro durante protocolos de IATF, sugerindo que o ambiente hormonal que produz a falta de expressão de estro também produz alterações uterinas que diminuem a probabilidade de manutenção da gestação no período crítico entre o primeiro e o segundo mês (PEREIRA et al., 2016; RICHARDSON et al., 2016).

Uma das grandes vantagens em se verificar a expressão de cio está em poder identificar o melhor momento para a IA, em relação à ovulação, uma vez que a vida útil do oócito bovino é curta e esse intervalo é crucial para melhorar a fertilidade do rebanho. Conforme Roelofs et al. (2006), o intervalo de tempo no qual as vacas foram inseminadas está diretamente ligado as taxas de fertilização e qualidade embrionária. Assim, a falha na identificação do cio, ou ausência do mesmo, resulta em grandes perdas econômicas para o sistema de produção, reduzindo a taxa de serviço e rendimento do rebanho (RAO et al., 2013).

### **3.3. Dinâmica folicular**

A dinâmica folicular ovariana é controlada por hormônios hipotalâmicos e hipofisários, além dos hormônios produzidos nos ovários e no próprio útero. Em cada ciclo, os folículos antrais começam a crescer, até atingirem a ovulação ou entrarem em atresia e esse fenômeno é conhecido como “onda folicular” (GINTHER et al., 1989; GINTHER et al., 1996).

Cada ciclo estral em bovinos pode possuir uma, duas ou três ondas foliculares. A primeira onda tem seu início detectado como um grupo de folículos de, em média, 4mm, pouco antes do dia da ovulação. Nos próximos dias que se seguem um dos folículos se torna dominante e os outros se tornam subordinados. A segunda onda surge em média de 10 dias depois da ovulação e, quando o ciclo

possui três ondas, é seguida por mais uma onda folicular aos 16 dias (LUCY et al., 1992; CAMPBELL et al., 1995).

Cada onda folicular possui três fases: a primeira fase é o recrutamento, estimulado pelo hormônio FSH, fazendo os folículos começarem o período de crescimento. A segunda fase é a divergência, que consiste na ativação de receptores do hormônio LH em um dos folículos dentro o pool de crescimento que foi recrutado na primeira fase e, concomitantemente, os demais folículos (subordinados) entram em atresia.

A terceira fase é conhecida como dominância e nela o folículo selecionado começa a se destacar e crescer até o momento da ovulação ou atresia, o que dependerá das concentrações hormonais. Assim, o recrutamento de ondas foliculares e a seleção de um folículo dominante é baseado na resposta diferencial ao hormônio folículo-estimulante (FSH) e ao hormônio luteinizante (LH) (MIHM E BLEACH, 2003).

A duração do ciclo estral é de aproximadamente 20 dias em ciclos de 2 ondas e 23 dias em ciclos de 3 ondas (KASTELIC et al., 1990). O folículo ovulatório tem origem na onda final e alguns estudos mostraram relação entre taxa de concepção e o momento que o folículo ovulatório se origina, quando oriundo da terceira onda teve uma taxa de concepção maior do que quando se originou da segunda onda folicular do ciclo estral (TOWNSON et al., 2002). Todavia, outros estudos mostraram que o padrão da onda folicular não teve relação com fertilidade e taxa de prenhez tanto em bovinos de corte como de leite (COLAZO E MAPLETOFT, 2017).

O aparecimento de uma onda folicular é gerado quando há picos plasmáticos de FSH, que ocasiona o início do crescimento dos folículos e esses, produzem os hormônios Estradiol e Inibina que irão atuar na regulação do FSH, suprimindo sua secreção (ADAMS et al., 1992). Dessa forma, após aproximadamente 3 dias do surgimento da onda, os níveis de FSH diminuem gradativamente e se inicia a divergência e seleção entre os folículos, já que os folículos que ainda necessitam de FSH para continuar seu crescimento não encontram níveis adequados do



hormônio para isso e passam a se tornam subordinados e sofrem atresia (GINTHER et al., 1996).

Já dentre aqueles que conseguiram crescer, passam para o período de dominância e começam a desenvolver receptores do hormônio LH (ADAMS et al., 1993). O recrutamento folicular é inibido após a seleção de um folículo dominante e só é retomado quando a dominância é encerrada, seja por conta da ovulação ou por atresia (PERRY, 2017).

O crescimento do folículo dominante acontece por, em média, 6 dias, até que ele estaciona suas funções metabólicas, devido a diminuição nos níveis de LH, ocasionado pela secreção do hormônio progesterona pelo corpo lúteo estabelecido. Assim, os níveis de FSH, que estava suprimido, voltam a subir, porém sem afetar o folículo dominante estático, apenas resultando em uma nova onda folicular, repetindo o ciclo ovariano (ADAMS et al., 1992).

Quando o corpo lúteo regride, cessa a liberação de progesterona e faz com que os níveis de LH se elevem, aumentando sua pulsatilidade. O folículo dominante que possui receptores de LH começa então a aumentar o seu crescimento e, consequentemente, maior produção hormonal, secretando maiores concentrações de estradiol. O estradiol atua em feedback positivo com o eixo hipotalâmico-hipofisário gerando um pico de LH que resulta na ovulação.

Nas fêmeas bovinas os folículos adquirem capacidade ovulatória quando atingem diâmetro aproximado de 9-10mm e conforme crescem em tamanho, aumentam também a secreção de estradiol (MARTÍNEZ et al., 1999; SARTORI et al., 2001). Estudos compararam taxas de ovulação relacionadas ao tamanho dos folículos dominantes e relataram que acima de 10 mm, os folículos dominantes saudáveis poderiam ser induzidos a ovulação, porém quando eram menores ou iguais a 11 mm precisaria de doses maiores de LH para rompê-los e já os folículos com 12 ou mais mm tiveram taxa de ovulação maior, com menores doses de LH (SARTORI et al., 2001).

Uma explicação para isso é que a aquisição de capacidade ovulatória pode ser mediada pela quantidade de receptores de LH presentes nas células da granulosa. Perry (2017) apresentou estudos que correlacionaram o tamanho dos

folículos à expressão de receptores de LH em que, conforme os folículos crescem, maior a quantidade de receptores. Dessa forma, a aquisição de capacidade ovulatória acontece durante a fase de dominância do desenvolvimento folicular.

### **3.4. Indutores de ovulação**

#### **3.4.1 Hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH)**

O GnRH é um decapeptídeo liberado de forma pulsátil pelo hipotálamo, cujo alvo são sítios específicos localizados na hipófise anterior, ocasionando a liberação do LH (ESTES et al., 1977). Desse modo, sua ação é causar ovulação ou luteinização do folículo dominante presente no momento da aplicação (MACMILLAN E THACTHER, 1991). A sua atuação diretamente na hipófise resulta em ovulações em intervalos menores em relação aos ésteres de estradiol.

O Ovsynch é um dos protocolos pioneiros na utilização de GnRH para o controle do ciclo estral e ovulação, e consiste na aplicação de GnRH no dia 0, PGF no dia 7 e 48 h após, nova aplicação de GnRH. Com este protocolo, as ovulações ocorrem cerca de 24 a 32 h após a aplicação da segunda dose do GnRH em vacas e novilhas leiteiras (PURSLEY et al., 1995).

#### **3.4.2 Gonadotrofina coriônica humana (hCG)**

A gonadotrofina coriônica humana pertence à família dos hormônios glicoproteicos, que também inclui o hormônio luteinizante (LH), o hormônio folículo-estimulante (FSH) e o hormônio estimulante da tireoide (TSH) (STENMAN et al., 2006). É muito utilizado devido a sua atividade semelhante ao LH, porém com ação mais prolongada.

O seu efeito luteotrófico é devido a ligação aos receptores de LH das células lúteas, o qual persiste por até 30 h após o tratamento (DE RENSIS et al., 2008). A aplicação da hCG ocasiona elevação da capacidade esteroidogênica do CL primário, devido à diferenciação das células da teca e granulosa em células lúteas

grandes e pequenas e à transformação de células lúteas pequenas em células grandes (FARIN et al., 1988).

Em bovinos, a hCG se liga aos receptores de LH nas células da granulosa e da teca dos folículos ovarianos, sendo utilizada para induzir a ovulação em protocolos de IATF (DE RENSIS et al., 2008). A ação luteinizante da hCG permite prolongar a vida útil do CL e aumentar as concentrações plasmáticas de progesterona que, conseqüentemente, pode ter efeito na redução das perdas embrionárias iniciais e assim, melhora da fertilidade (WALLACE et al., 2011).

Além de induzir a maturação de folículos e a ovulação, quando administrada durante o diestro, na presença de folículos pré-ovulatórios, a hCG pode induzir a formação de corpos lúteos acessórios, prolongando o ciclo estral (DIAZ et al., 1998).

#### 4. Referências bibliográficas

- ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P. et al. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction Fertility**. 94:177-188, 1992.
- ALRICH, R.D. Endocrine and neural control of estrus in dairy cows. **Journal of Dairy Science** 77, 2738–2744, 1994.
- AOKI, M.; KIMURA, K.; SUZUKI, O. Predicting time of parturition from changing vaginal temperature measured by data-logging apparatus in beef cows with twin fetuses. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 86, n. 1-2, p. 1-12, 2005.
- BARUSELLI, P.; SALES, J.; SALA, R. et al. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Animal Reproduction**, v.9, p.139-152, 2012.
- BARUSELLI, P.S.; FERREIRA, R.M.; COLLI, M.H.A. et al. Timed artificial insemination: current challenges and recent advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. **Animal Reproduction**. V.14, p.558–571, 2017.
- BARUSELLI, P.S.; FERREIRA, R.M.; SÁ FILHO, M.F. et al. Review: Using artificial insemination v. natural service in beef herds. **Animal**. V.12, p.45-52, 2018.
- BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O. et al. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**. V.82-83, p.479-486, 2004.
- BERRY, D.P.; WALL, E.; PRYCE, J. E. Genetics and genomics of reproductive performance in dairy and beef cattle. **Animal**. V.8, p.105-21, 2014.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTINEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, 78:307-326, 2003.
- BÓ, G.A.; DE LA MATA, J.J.; BARUSELLI, P.S. et al. Alternative programs for synchronizing and re-synchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology*, v.86, p.388- 396, 2016.
- BURFEIND, O; SUTHAR, V.S.; VOIGTSBERGER R. et al. Validity of prepartum changes in vaginal and rectal temperature to predict calving in dairy cows. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v. 94, n. 10, p. 5053–5061, 2011.
- BURNS, M.G.; BUTTREY, B.S.; DOBBINS, C.A. et al. Evaluation of human chorionic gonadotropin as a replacement for gonadotropin-releasing hormone in ovulation-synchronization protocols before fixed timed artificial insemination in beef cattle. **Journal Animal Science**. V.86(10), p.2539-2548, 2008.

395 CAMPBELL, B.K.; SCARAMUZZI, R.J.; WEBB, R. Control of antral follicle  
396 development and selection in sheep and cattle. **Journal Reproduction Fertility**.  
397 49(suppl):335-350, 1995.

398 COLAGAR, A.H.; MARZONY, E.T.; CHAICHI, M.J. Os níveis de zinco no plasma  
399 seminal estão associados à qualidade espermática em homens férteis e inférteis.  
400 **Nutrition Research**. V.29, p.82-88, 2009.

401 COLAZO, M.G.; MAPLETOFT, R.J. Pregnancy per AI in Holstein heifers  
402 inseminated with sex-selected or conventional semen after estrus detection or  
403 timed-AI. **Canadian Veterinary Journal**. Apr;58(4):365-370, 2017.

404 COLAZO, M.G.; AMBROSE, D.J. Neither duration of progesterone inserts nor initial  
405 GnRH treatment affected pregnancy per timed-insemination in dairy heifers  
406 subjected to a Co-synch protocol. **Theriogenology**. V.76, p.578-588, 2011.

407 DE MEDEIROS, S.F.; NORMAN, R.J. Human choriogonadotropin protein core and  
408 sugar branches heterogeneity: basic and clinical insights. **Human Reproduction**.  
409 V.15, p.69e95, 2008.

410 DE RENSIS, F.; VALENTINI R.; GORRIERI, F. et al. Inducing ovulation with hCG  
411 improves the fertility of dairy cows during the warm season. **Theriogenology**. V.69,  
412 p.1077e82, 2008.

413 DIAZ, T.; SCHMITT, E.J.; DE LA SOTA, R.L. et al. Human chorionic gonadotropin  
414 induced alterations in ovarian follicular dynamics during the estrous cycle of heifers.  
415 **Journal Animal Science**. V.76, p.1929-36, 1998.

416 DISKIN, M.G.; MACKEY, D.R.; ROCHE, J.F. et al. Effects of nutrition and metabolic  
417 status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Animal**  
418 **Reproduction Science**. V.15, p.345-370, 2003.

419 ESTES, K.S.; PADMANABHAN, V.; CONVEY, E.M. Localization of gonadotropin  
420 releasing hormone (GnRH) within the bovine hypothalamus. **Biology of**  
421 **Reproduction**. V.17, p.706-11, 1977.

422 FARIN, C.E.; MOELLER, C.L.; MAYAN, H. et al. Effect of luteinizing hormone and  
423 human chorionic gonadotropin on cell populations in the ovine corpus luteum.  
424 **Biology of Reproduction**. V.38, p.413-21, 1988.

425 FIGUEIREDO R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L. et al. Ovarian follicular  
426 dynamics in nelore breed (*Bos indicus*) cattle., **Theriogenology** 47:1489-1505,  
427 1997.

428 FRICKE, P.; REYNOLDS, L.; REDMER, D. Effect of human chorionic gonadotropin  
429 administered early in the estrous cycle on ovulation and subsequent luteal function  
430 in cows. **Journal Animal Science**. V.71, p.1242e6, 1993.

431 GINTHER, O.J.; KASTELIC, J.P.; KNOFF, L. Composition and characteristics of  
 432 follicular waves during the bovine oestrous cycle. **Animal Reproduction Science**.  
 433 20:187-200, 1989.

434 GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M. et al. Selection of the dominant  
 435 follicle in cattle. **Biology of Reproduction**.55:1187-1194, 1996.

436 GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; DONADEU, F.X. et al. Mechanism of follicle deviation  
 437 in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**. V.78, p.239-257, 2003.

438 HAFEZ, E.S.E. Effects of stage of the estrus cycle on interval to estrus after  
 439 PGF2a in beef cattle. **Theriogenology**, v.18, n.2, P.191-200, 1982.

440 IRELAND, J.J.; ROCHE, J.F. Development of antral follicles in cattle after  
 441 prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular  
 442 fluid, and gonadotropin receptors. **Endocrinology**. V.111, p. 2077e2086, 1982.

443 KANITZ, W. Follicular dynamic and ovulation in cattle – a review. **Archives Animal**  
 444 **Breeding**. Dummerstorf, v. 46, n. 2, p. 187-198, 2003.

445 KASTELIC, J.P.; KNOFF, L.; GINTHER, O.J. Effect of day of prostaglandin  
 446 treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. **Animal**  
 447 **Reproduction Science**. 23:169-180, 1990.

448 KERNS, K; ZIGO, M; DROBNIS, E.Z. et al. Zinc ion flux during mammalian sperm  
 449 capacitation. **Nature communications**. V.9, p.2061, 2018.

450 KHANAL, A. R.; GILLESPIE, J.; MACDONALD, J. Adoption of technology,  
 451 management practices, and production systems in US milk production. **Journal of**  
 452 **Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 12, p. 6012–6022, 2010.

453 LIU, T.C.; HO, C.T.; LI, K.P. et al. Human chorionic gonadotropin (hCG)-induced  
 454 ovulation occurs later but with equal occurrence in lactating dairy cows: comparing  
 455 hCG and gonadotropin-releasing hormone protocols. **Journal of Reproduction**  
 456 **and Development**. V.65(6), p.507-514, 2019.

457 LUCY, M.C.; SAVIO, J.D.; BADINGA, L. et al. Factors that affect ovarian follicular  
 458 dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**. 70:3615-3626, 1992.

459 MACDONALD, J. M. et al. Profits, costs, and the changing structure of dairy farming.  
 460 **Economic research report**. United States. Dept. of Agriculture. Economic  
 461 Research Service. No. 47, 2007.

462 MACMILLAN, K.L.; THATCHER, W. Effects of an agonist of gonadotropin-releasing  
 463 hormone on ovarian follicles in cattle. **Biology of Reproduction**. V.45, p.883-9,  
 464 1991.

- 465 MANUAL para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. 3.ed. Belo  
466 Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 49p, 2013.
- 467 MARTINEZ, M. F.; ADAMS, G.P.; BERGFELT, D.R. et al. Effect of LH or GnRH on  
468 the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. **Animal**  
469 **Reproduction**. Sci. 57: 23-33, 1999.
- 470 MIHM, M.; BLEACH, E.C. Endocrine regulation of ovarian antral follicle  
471 development in cattle. **Animal Reproduction Science**. 78:217-237, 2003.
- 472 NASCIMENTO A.B.; BENDER R.W.; SOUZA A.H. et al. Effect of treatment with  
473 human chorionic gonadotropin on day 5 after timed artificial insemination on fertility  
474 of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**.v.96, p.2873e2882, 2013.
- 475 NOGUEIRA, E.; SILVA, A.S.; DIAS, A.M. et al. Taxa de prenhez de vacas nelores  
476 submetidas a protocolos de iatf no pantanal de MS. Corumbá-MS. Embrapa  
477 Pantanal. 5p. (Circular Técnica, 97), 2011.
- 478 NOGUEIRA, E.; COSTA FILHO, L.C.C; SILVA, A. S. et al. Pregnancy rate in  
479 lactating Bos indicus cows subjected to fixed time artificial insemination and treated  
480 with different follicular growth inducers. **Revista Brasileira de Zootecnia**. V.43,  
481 p.358-362, 2014.
- 482 NOGUEIRA, É.; RODRIGUES, W.B.; SILVA, A.S. et al. Aplicação de gnrh em vacas  
483 com baixa ou sem expressão de estro avaliadas com bastões marcadores aumenta  
484 a taxa de prenhez em vacas de corte submetidas a IATF. **In: REUNIÃO ANUAL DA**  
485 **SBTE**, 30, 2016, Foz do Iguaçu. Anais... Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de  
486 Tecnologia de Embriões, p. 240, 2016.
- 487 NOGUEIRA, E.; SILVA, M.R.; SILVA, J.C.B. et al. Timed artificial insemination plus  
488 heat I: effect of estrus expression scores on pregnancy of cows subjected to  
489 progesterone-estradiol-based protocols. **Animal**. V.15, p.1-8, 2019.
- 490 PALOMBI, C.; PAOLUCCI, M.; STRADAIOLI, G. et al. Evaluation of remote  
491 monitoring of parturition in dairy cattle as a new tool for calving management. **BMC**  
492 **Veterinary Research**, London, v. 9, p. 191-200, 2013.
- 493 PEREIRA, M.H.C.; WILTBANK, M.C.; VASCONCELOS, J.L.M. Expression of  
494 estrus improves fertility and decreases pregnancy losses in lactating dairy cows that  
495 receive artificial insemination or embryo transfer. **Journal Dairy Science**. V.99,  
496 p.2237-2247, 2016.
- 497 PERRY, G.A.; PERRY, B.L. Effect of preovulatory concentrations of estradiol and  
498 initiation of standing estrus on uterine pH in beef cows. **Domestic Animal**  
499 **Endocrinol**. 34, 333–338, 2008.

- 500 PERRY, G. A. Efecto de la madurez folicular sobre el establecimiento de la preñez.  
501 In: Proceedings XII Simposio Internacional de Reproduccion Animal. P. 171-190,  
502 2017.
- 503 PONTES, G.A.; HESLER L.A.; GRUM D.E. et al. Decreasing the interval between  
504 GnRH and PGF2 $\alpha$  from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI  
505 pregnancy rates in beef cows. **Theriogenology**. V.69, p.843-851, 2008.
- 506 PURSLEY, J.R.; MEE, M.O.; WILTBANK, M.C. Synchronization of ovulation in dairy  
507 cows using PGF2a and GnRH. **Theriogenology**. 44: 915–23, 1995.
- 508 RAO, T. K. S.; KUMAR, N.; KUMAR, P. et al. Heat detection techniques in cattle  
509 and buffalo. **Veterinary World**. V.6, p.363-369, 2013.
- 510 RICHARDSON, B.N.; HILL, S.L.; STEVENSON, J.S. et al. Expression of estrus  
511 before fixed-time AI affects conception rates and factors that impact expression of  
512 estrus and the repeatability of expression of estrus in sequential breeding seasons.  
513 **Animal Reproduction Science**. V.166, p.133-140, 2016.
- 514 RODRIGUES, W.B.; SILVA, A.S.; BORGES SILVA, J.C. et al. Timed artificial  
515 insemination plus heat II: Gonadorelin injection in cows with low estrus expression  
516 scores increased pregnancy in progesterone/estradiol-based protocol. **Animal**.  
517 V.13(10), p.2313-2318, 2019.
- 518 ROELOFS, J.B.; GRAAT, E.A.; MULLAART, E. et al. Effects of insemination-  
519 ovulation interval on fertilization rates and embryo characteristics in dairy cattle.  
520 **Theriogenology**. V.66(9), p.2173-2181, 2006.
- 521 RORIE, R. W.; T. R. BILBY, T.D. LESTER. Application of electronic estrus detection  
522 technologies to reproductive management of cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v.  
523 57, p.137-148, 2002.
- 524 SÁ FILHO, M.F.; AYRES, H.; FERREIRA, R.M. et al. Equine chorionic gonadotropin  
525 and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based,  
526 timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows.  
527 **Theriogenology**. V.73, p.651-658, 2010.
- 528 SALES, J.N.S.; CARVALHO, J.B.P.; CREPALDI, G.A. et al. Effects of two estradiol  
529 esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos*  
530 *indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**.  
531 V.78, p.510-516, 2012.
- 532 SALES, J.N.S.; BOTTINO, M.P.; SILVA, L.A.C.L. et al. Effects of eCG are more  
533 pronounced in primiparous than multiparous *Bos indicus* cows submitted to a timed  
534 artificial insemination protocol. **Theriogenology**. V.86, p.2290-2295, 2016.
- 535 SARTORI, R. et al. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in  
536 bovine follicles. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 65, n. 5, p. 1403–1409,



537 2001.

538 SILVA, K.S.; BORGES, J.C.; ABREU, U.G.P. et al. Escore de cio avaliado com  
539 bastões marcadores influencia as taxas de gestação de vacas nelore submetidas a  
540 protocolos de inseminação artificial em tempo fixo. **Animal Reproduction**. V.13(3),  
541 p.451, 2016.

542 SKENANDORE C.S., CARDOSO F.C. The effect of tail paint formulation and heifer  
543 behavior on estrus detection. **Journal of Veterinary Science Medicine**, 2017.

544 SMITH, M.F.; POHLER, K.G.; PERRY, G.A. et al. Physiological factors that affect  
545 pregnancy rate to artificial insemination in beef cattle. **Proceedings, Applied**  
546 **Reproductive Strategies in Beef Cattle**. October 15-16, 2013.

547 SOUZA, A.H.; GÜMEN A.; SILVA E.P. et al. Supplementation with estradiol-17beta  
548 before the last gonadotropin-releasing hormone injection of the Ovsynch protocol in  
549 lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**. V.90(10), p.4623-4634, 2007.

550 STREYL, D.; SAUTER-LOUIS, C.; BRAUNERT, A. et al. Establishment of a  
551 standard operating procedure for predicting the time of calving in cattle. **Journal of**  
552 **Veterinary Science**. Suwon, v. 12, n. 2, p. 177-185, 2011.

553 TOWNSON, D.H.; TSANG, P.C.; BUTLER, W.R. et al. Relationship of fertility to  
554 ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. **Journal of Animal Science**.  
555 80:1053-1058, 2002.

556 WALLACE, L.D.; BREINER, C.A.; BREINER, R.A. et al. Administration of human  
557 chorionic gonadotropin at embryo transfer induced ovulation of a first wave  
558 dominant follicle, and increased progesterone and transfer pregnancy rates.  
559 **Theriogenology**. V.75(8), p.1506-1515, 2011.

560 WILTBANK, M.C.; PURSLEY, J.R. The cow as an induced 25otmail25y: timed AI  
561 after synchronization of ovulation. **Theriogenology**. V.81, p.170-185, 2014.

562 ZHAO, J.; DONG, X.; HU, X. et al. Níveis de zinco no plasma seminal e sua  
563 correlação com a infertilidade masculina: uma revisão sistemática e metanálise.  
564 **Scientific Reports**. V.6, p.22386, 2016.

565

566

567

568

570

## CAPÍTULO 2: DINÂMICA FOLICULAR E TEMPO DE OVULAÇÃO COM O USO DE DIFERENTES DOSES DE HCG NO MOMENTO DA IATF.

Artigo formatado nas normas do periódico: *Animal Reproduction Science*

### Efeito do uso de diferentes doses de hCG nas taxas ovulação, prenhez e dinâmica folicular em protocolos de IATF.

*Nathalia Albaneze Anache<sup>a</sup>; Eriklis Nogueira<sup>b</sup>*

<sup>a</sup>Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Av. Senador Felinto Muller 2443, 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil. E-mail: nathaliaanache@hotmail.com

<sup>b</sup>Embrapa Gado de Corte, Av. Rádio Maia, 830, 79106-550, Campo Grande, MS, Brasil. E-mail: eriklis.nogueira@embrapa.br

**Resumo:** Apesar dos evidentes avanços na produção de gado de corte, conferidos pelo desenvolvimento comercial da IATF diversos fatores, extrínsecos ou intrínsecos, podem estar relacionados a esses índices, destacando-se aqueles inerentes à fêmea, como o anestro pós-parto e a condição corporal no início dos protocolos. Sabe-se que vacas que não apresentam cio durante o protocolo tendem a ter menor taxa de ovulação e, conseqüentemente, menor probabilidade de engravidar. Assim, esse trabalho avaliou estratégias para melhorar nas taxas de prenhez de vacas de corte, submetidas a protocolos de IATF, com o uso do indutor de ovulação hCG, em fêmeas classificadas segundo o escore de remoção de tinta na cauda, sendo aplicados naquelas com baixa expressão de cio (ESCT 1 e 2) no momento da inseminação, testando diferentes doses e comparando seus efeitos, com acompanhamento da atividade ovariana. Foram avaliadas 45 fêmeas da raça Nelore, submetidas ao protocolo de IATF. Os animais que apresentaram pouco ou nenhum cio (ESCT 2 e 1, respectivamente) foram divididos em três grupos, no dia da inseminação: controle (n=11): receberam 1 ml de, I.M., de solução fisiológica, grupo 500 UI (n=12): receberam aplicação de 500 UI, I.M. de hCG e grupo 1000 UI (n=12): receberam a aplicação de 1000 UI, I.M. de hCG. As vacas que apresentaram ESCT 3 (n=10) foram inseminadas no mesmo momento, sem aplicação de tratamento adicional. Após 07 dias da IATF os animais tiveram seus ovários examinados por ultrassonografia transretal para avaliar o momento da ovulação (tempo médio e taxa de ovulação) e área de CL (cm<sup>3</sup>). Foi realizado diagnóstico de gestação em torno de 30 dias após a IATF (com ultrassonografia modo B). Avaliaram-se as taxas de prenhez e ovulação dos animais para comparar os efeitos das doses do hCG, bem como a área do CL e só houve diferença estatística em relação ao tempo médio de ovulação, sendo os grupos Controle, 500

UI e 1000 UI iguais, diferindo do grupo ESCT 3, que apresentou menor tempo de ovulação. Não houve diferença estatística quanto a taxa de prenhez.

Palavras chaves: Bastão marcador, estro, protocolo hormonal.

## 1. Introdução

A inseminação artificial é uma ferramenta que, quando amplamente utilizada nos rebanhos bovinos, permite maior disseminação da genética de touros superiores com subsequente melhoramento genético dos rebanhos a um custo acessível, utilizando protocolos hormonais de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) (Satake et al., 2017). A biotecnologia teve grande avanço em sua utilização, aumentando o número de animais inseminados no Brasil dentro o total de matrizes do rebanho nacional (Baruselli et al. 2018).

As vacas *Bos Indicus* apresentam períodos mais longos de anestro pós-parto, levando a baixa expressão e detecção de estro e, conseqüentemente, baixa taxa de prenhez ao final da época de criação (Baruselli et al., 2004). Para minimizar os efeitos negativos da condição anovular e garantir melhores taxas de concepção durante a estação reprodutiva, protocolos de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) à base de estradiol (E2) e progesterona (P4) têm sido cada vez mais utilizados (Meneghetti et al., 2009; Sa Filho et al., 2013).

Estudos também relatam que as taxas de prenhez poderiam ser aumentadas com a manipulação das fases do ciclo estral como, diminuir o período de crescimento do folículo dominante ovulatório e prolongado a duração do proestro (Pontes et al., 2008, Colazo & Ambrose, 2011, Bó et al., 2016). Nas fêmeas bovinas os folículos adquirem capacidade ovulatória quando atingem diâmetro aproximado de 9-10mm e conforme aumentam em tamanho, aumentam também a secreção de estradiol (Sartori et al., 2001).

Estudos compararam taxas de ovulação relacionadas ao tamanho dos folículos dominantes e relataram que acima de 10 mm, os folículos dominantes saudáveis poderiam ser induzidos a ovulação, porém quando eram menores ou iguais a 11 mm a ovulação precisaria de doses maiores de LH para acontecer e já

646 os folículos com 12 mm ou mais tiverem taxa de ovulação maior, com menores  
647 doses de LH (Sartori et al., 2001).

648 Vacas que não apresentam cio durante o protocolo tendem a ter menor taxa  
649 de ovulação e, conseqüentemente, menor probabilidade de engravidar (Silva et al.,  
650 2016). Ademais, estudos indicam uma diminuição na perda de gestação em vacas  
651 que exibem estro durante protocolos de IATF, sugerindo que o ambiente hormonal  
652 que produz a falta de expressão de estro também produz alterações uterinas que  
653 diminuem a probabilidade de manutenção da gestação no período crítico entre o  
654 primeiro e o segundo mês (Pereira et al., 2016; Richardson et al., 2016).

655 Diante disso, novas tecnologias estão sendo desenvolvidas e  
656 implementadas em programas de IATF para melhorar o controle do estro e maior  
657 sucesso no número e qualidade de gestação (Holman et al., 2011; Jónsson et al.  
658 2011; Richardson et al., 2016). Entre elas, o uso de indutores da ovulação em  
659 fêmeas classificadas segundo o escore de remoção de tinta na cauda, sendo  
660 aplicados naquelas com baixa expressão de cio (ESCT 1 e 2) no momento da  
661 inseminação (Nogueira et al., 2016).

662 A gonadotrofina coriônica humana (hCG) é produzida pelo trofoblasto  
663 humano e excretado em grandes quantidades na urina de mulheres grávidas (De  
664 Medeiros e Norman, 2008). É utilizado em animais domésticos devido seu efeito  
665 semelhante ao LH, se ligando aos receptores de LH nas células da granulosa e da  
666 teca dos folículos ovarianos com alta afinidade (Ireland & Roche, 1983) e tem sido  
667 usado para induzir a ovulação em protocolos de IATF ou para formar o CL acessório  
668 após inseminação (Fricke et al., 1993; Nascimento et al., 2013).

669 Alguns trabalhos que testaram a utilização do hCG como indutor de ovulação  
670 em protocolos de IATF obtiveram efeitos semelhantes ao GnRH (Burns, et al., 2008;  
671 Liu et al., 2019), além terem efeito no aumento dos níveis de progesterona  
672 plasmático, redução das perdas embrionárias iniciais e assim, melhora da  
673 fertilidade (De Rensis et al., 2008; Wallace et al., 2011). Também age modificando  
674 a dinâmica das ondas foliculares, aumentando a frequência dos ciclos foliculares  
675 dominantes de três ondas (Diaz et al., 1998).

O objetivo deste estudo foi determinar a dose mais efetiva de hCG em vacas com baixa ou nenhuma expressão de cio, no momento da IATF, em diferentes ESCT, avaliando tempo médio de ovulação, taxa de ovulação, área média do corpo lúteo (cm<sup>3</sup>) e taxa de prenhez.

## **2. Materiais e métodos**

### *Animais*

O experimento utilizou 45 vacas zebuínas lactantes, de uma mesma propriedade: Fazenda Primavera, situada no município de Corguinho, estado de Mato Grosso do Sul, durante as estações de monta de 2019 e 2020.

Buscou-se determinar a melhor dose de hCG para aplicação no momento da IATF. As fêmeas destinadas a protocolos reprodutivos foram submetidas a exame ginecológico completo, considerando: escore de condição corporal (ECC (1-5)), categoria animal, histórico reprodutivo e avaliação sanitária. Também foi realizado exame ultrassonográfico para avaliar a condição ovariana e uterina.

### *Delineamento Experimental*

O protocolo utilizado foi: em dia aleatório do ciclo estral (D0) receberam implante intravaginal de 1mg de P4 (DIB) e administração de 2 mg de BE (Estrogin®, Biofarm, São Paulo, Brasil). No D8, o implante foi retirado e receberam 1 mg de cipionato de estradiol (ECP®, Zoetis, Brasil), 150µg de d-cloprostenol (Prolise®, Arsa, Argentina) e 300 UI de eCG (Folligon® 5000UI, MSD, São Paulo, Brasil).

No momento da retirada dos implantes, todas as vacas foram marcadas na região sacro-caudal com bastões de tinta (Raidl-Maxi;RAIDEX, Alemanha). No D10, 50-54 horas após a retirada do implante, as vacas foram inseminadas.

A taxa de ESCT, avaliada no momento da IATF, foi classificada de acordo com Silva et al. (2016): 1= sem expressão de cio; 2= baixa expressão de cio; 3= alta expressão de cio.

No momento da IATF as vacas com ESCT 1 e 2, foram submetidas aos seguintes tratamentos:

- I. Controle: 11 vacas receberam a aplicação 1 ml de solução fisiológica, servindo de grupo controle do experimento;
- II. Tratamento 500 UI HCG (Chorulon®, MSD, Brasil): 12 vacas receberam a aplicação de hCG (500 UI, I.M.);
- III. 1000 UI de HCG (Chorulon®, MSD, Brasil): 12 vacas receberam a aplicação de hCG (1000 UI, I.M.).

Adicionalmente, as vacas que apresentaram ESCT 3 (n=10) foram inseminadas no mesmo momento, sem aplicação de tratamento adicional, sendo o controle positivo do experimento.

Após 7 dias da inseminação (D17), os animais tiveram seus ovários examinados por ultrassonografia transretal para avaliar o momento da ovulação e área de CL (cm<sup>3</sup>), usando um Mindray DP 20 Vet (Mindray Medical International Limited, Shenzhen, China) com sonda linear transretal (5 a 9 MHz). Avaliação do corpo lúteo no D17 também foi usado para calcular a taxa de ovulação, que foi verificada pela detecção de um CL no mesmo ovário onde foi observado o folículo pré-ovulatório e nenhum CL anterior no dia 10 do protocolo, de acordo com Pfeifer et al. (2009 e 2015) e Dadarwal et al. (2013). O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a IATF, por ultrassonografia transretal.

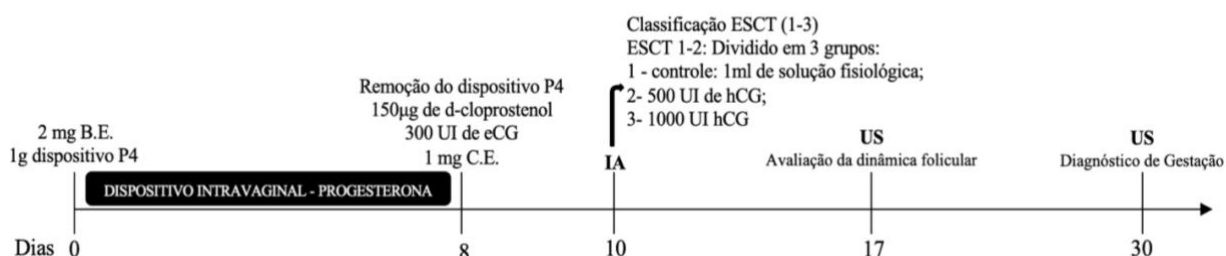


Figura 1. Delineamento experimental.

### Análise estatística

Todas as análises foram feitas utilizando o SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA; versão 9.4. A taxa de ovulação, tempo médio, diâmetro e taxa de prenhez no dia 30, foram avaliadas utilizando o procedimento GLIMMIX do SAS. O modelo estatístico utilizou como efeito fixo o tratamento e como efeito aleatório o animal. O ECC inicial, foi incluído no modelo. A significância foi definida quando  $P \leq 0.05$ , e tendência quando  $P > 0.05$  e  $\leq 0.10$ .

### 3. Resultados

Foram encontrados os seguintes resultados, conforme apresentado abaixo na Tabela 1 em relação ao tempo médio de ovulação (h) os grupos: Controle, 500 UI e 1000 UI obtiveram resultados iguais, diferindo apenas do grupo ESCT 3 que apresentou menor tempo médio de ovulação.

Quanto a taxa de ovulação, não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 2). A área média do corpo lúteo (CL), analisada 07 dias após a inseminação, também não apresentou diferença estatística entre os grupos, conforme demonstrado na Figura 3.

Em relação as taxas de prenhez, avaliadas 30 dias após a inseminação, também não houve diferença estatística entre os grupos testados, controle e ESCT 3 (Figura 2). O Escore de condição corporal (ECC) dos animais teve efeito na taxa de prenhez ( $P > 0,01$ ), porém não teve efeito nos tratamentos.

Tabela 1. Tempo médio de ovulação, taxa de ovulação (%), diâmetro do CL (cm<sup>3</sup>) e Taxa de prenhez (%), com uso de diferentes doses de hCG no momento da IATF e diferentes ESCT.

| TRATAMENTO                  | ESCT 1 e 2         |                    |                    | ESCT 3                        | P      |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|--------|
|                             | Controle<br>(n=11) | 500 UI<br>(n=12)   | 1000UI<br>(n=12)   | <u>ESCT3</u><br><u>(n=10)</u> |        |
| Tempo médio de ovulação (h) | 80:06 <sup>a</sup> | 75:25 <sup>a</sup> | 75:49 <sup>a</sup> | 67:07 <sup>b</sup>            | 0.0028 |
| Taxa de ovulação            | 82%                | 83%                | 100%               | 100%                          | 0.9997 |

|                                |     |     |        |      |        |
|--------------------------------|-----|-----|--------|------|--------|
| Diâmetro CL (cm <sup>3</sup> ) | 2,4 | 2,9 | 2,8    | 3,15 | 0.5824 |
| (D17)                          |     |     |        |      |        |
| Taxa de Prenhez                | 27% | 33% | 58,30% | 60%  | 0.3101 |

\*Valor significativo com  $P \leq 0,05$ .

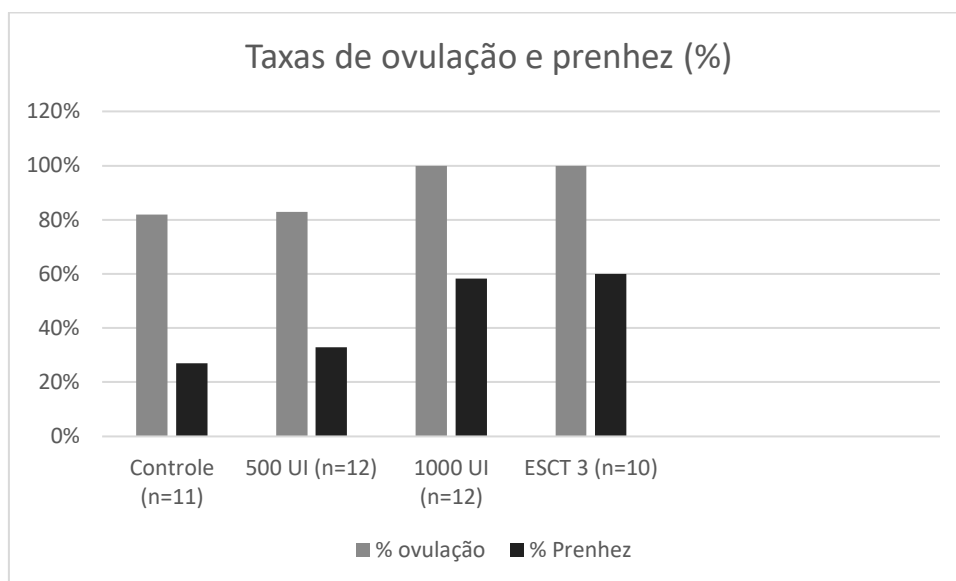


Figura 2. Taxa de ovulação e taxa de prenhez (%), com uso de diferentes doses de hCG no momento da IATF e diferentes ESCT em vacas Nelore.



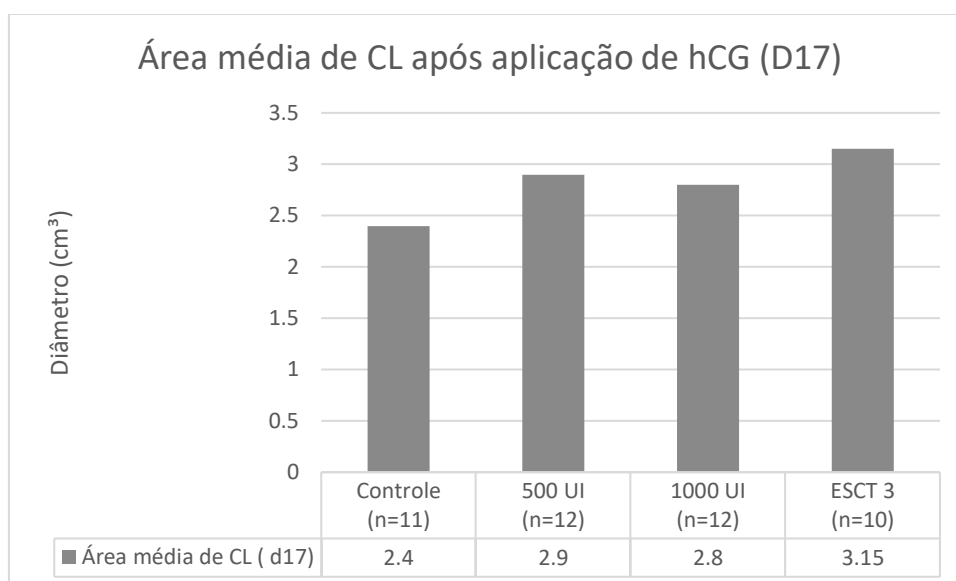


Figura 3. Diâmetro do corpo lúteo (cm<sup>3</sup>) 7 dias após a inseminação e aplicação de diferentes doses de hCG no momento da IATF e diferentes ESCT.

#### 4. Discussão

Este estudo testou qual a dose mais efetiva de hCG para aplicação no momento da IATF em vacas zebuínas lactantes que expressaram baixa ou nenhuma expressão de cio (ESCT 1-2), avaliando os seus efeitos na ovulação, área média do corpo lúteo (cm<sup>3</sup>) e na taxa de prenhez. O hCG até então não havia sido utilizado no momento da inseminação, apenas sido testado no início (D0) e meio (D8) do protocolo ou após a inseminação ou transferência de embrião.

A gonadotrofina coriônica humana pertence a família dos hormônios glicoproteicos, que também inclui o hormônio luteinizante (LH), o hormônio folículo-estimulante (FSH) e o hormônio estimulante da tireoide (TSH) (Stenman et al., 2006). É utilizada em animais domésticos devido seu efeito semelhante ao LH, se ligando aos receptores de LH nas células da granulosa e da teca dos folículos ovarianos com alta afinidade (Ireland & Roche, 1983).

Ele tem sido usado para induzir a ovulação em protocolos de IATF ou para formar o CL acessório após inseminação (Fricke et al., 1993; Nascimento et al., 2013). Além disso, tem efeito no aumento dos níveis de progesterona plasmático, redução das perdas embrionárias iniciais e assim, melhora da fertilidade (De Rensis et al., 2008; Wallace et al., 2011). Também age modificando a dinâmica das ondas

foliculares, aumentando a frequência dos ciclos foliculares dominantes de três ondas (Diaz et al., 1998).

Vimos, quanto ao seu efeito na ovulação, tratando-se do tempo médio de ovulação não houve diferença entre os grupos tratados com hCG, diferindo apenas dos animais do grupo ESCT 3, que tiveram um tempo de ovulação médio menor, ou seja, ovularam mais rápido, o que é esperado em animais que respondem ao protocolo expressando cio (Rodrigues et al., 2019).

A taxa de prenhez, também não diferiu entre os grupos controle, 500 UI, 1000 UI e ESCT 3, apenas sendo numericamente maior nos animais que responderam ao protocolo sugerindo que o ambiente hormonal que produz a falta de expressão de estro também produz alterações uterinas ligadas à fertilidade (Pereira et al., 2016; Richardson et al., 2016).

Pesquisas que testaram a utilização do hCG como indutor de ovulação em protocolos de IATF obtiveram efeitos semelhantes (Burns, et al., 2008). Buttrey et al. (2010) descreveram maior incidência de ovulação na dose de 1000 UI de hCG, comparado com as dosagens de 500, 2000 e 3000 UI, inclusive maior que o do GnRH.

Esse maior efeito pode ser, possivelmente, em função da maior meia-vida de hCG em comparação com a liberação de LH induzida por GnRH (Jameson e Hollenberg, 1993). O hCG é ligado ao receptor de LH nas células lúteas é internalizado mais lentamente que o LH (Niswender et al., 1995), o que permite que o hCG induza a ovulação de forma mais potente.

Apesar da sua atividade semelhante ao LH, o hCG possui maior tempo de duração, a sua meia-vida é bifásica, com uma fase rápida de 5 a 9 horas, depois uma fase mais lenta que dura cerca de 24 a 33h (Stenman et al., 2006). Quando administrado por via intramuscular, a meia-vida é mais longa do que a via intravenosa (Rizkallah et al., 1969).

Liu et al., (2019) apresentaram bons resultados de ovulação, porém utilizando 3000 UI. Stevenson et al. (2006) também relataram a eficácia do hCG na estimulação da ovulação em gado leiteiro com dose de 3.300 UI. Em outro estudo, com um protocolo de IATF baseado no uso de P4 por cinco dias comparando os

efeitos do GnRH e hCG ao final do protocolo, utilizou hCG nas concentrações de 1000 UI e 3000 UI, sendo esta última dosagem a que resultou em melhor dinâmica folicular e melhores resultados (Garcia-Ispuerto et al., 2019).

Entretanto, neste experimento, vimos que 1000 UI já foi suficiente para estimular a ovulação em 100% dos animais tratados e elevar a taxa de prenhez que ficou igual a taxa dos animais que deram cio no protocolo (ESCT 3). Visto que o objetivo é atingir resultados eficazes com o melhor custo-benefício, a dose menor de hCG se torna uma alternativa mais promissora.

Também avaliamos a medida da área média do CL ( $\text{cm}^3$ ) nos diferentes tratamentos para verificar o efeito do tratamento hormonal sobre a qualidade dele e da ovulação e vimos que a área foi igual em todos os grupos. Esses resultados confrontam os encontrados por outros pesquisadores que relataram esse aumento da área e volume do CL (Santos et al., 2001; Stevenson et al., 2007).

Ao induzir a ovulação do folículo dominante, o hCG estimula a diferenciação das células da teca e granulosa em células luteais pequenas e grandes e a transformação de células luteais pequenas em grandes, levando ao aumento da capacidade esteroidogênica do CL primário, aumentando o número de células secretoras de progesterona (Fricke et al., 1993; Machado et al., 2008).

Assim, os efeitos luteotrópicos do tratamento com hCG no CL primário foram atribuídos a um aumento no tamanho das células lúteas, um aumento no número de células lúteas grandes concomitante com uma redução no número de células lúteas pequenas e a um aumento da área de superfície, volume e diâmetro do CL (Santos et al., 2001; Stevenson et al., 2007).

Neste estudo não identificamos diferenças na área de CL no grupo ESCT 3, mas estudos mostram que o CL induzido por hCG se comporta de maneira diferente do CL induzido espontaneamente quanto a sua regressão pela PGF<sub>2</sub>, sendo induzido a regredir antes do quinto dia de vida útil. Também, diferia em tamanho e cor do CL formado espontaneamente e produzia menos progesterona quando cultivado in vitro na presença de LH (Howard & Britt, 1990; Fricke et al., 1993).

A administração de 1000 UI de hCG em vacas de corte pós-parto foi suficiente para induzir a luteinização independentemente do tamanho ou

dominância do folículo no momento do tratamento (Cooper et al., 1991). A eficácia do hCG para luteinizar os folículos podem variar durante o ciclo estral. Assim, a formação de estruturas lúteas acessórias foi maior quando o hCG foi administrado durante o estágio lúteo inicial (dias 4 a 7) do que durante o estágio folicular (dias 0 a 3) ou lúteo médio (dias 8 a 12) do ciclo estral (De Rensis et al., 2010).

Além disso, conforme Diaz et al. (1998), quando administrado durante o diestro, na presença de folículos pré-ovulatórios, o hCG pode induzir a formação de corpos lúteos acessórios, prolongando o ciclo estral e auxiliando na manutenção inicial de gestação, visto que maior produção de progesterona após a ovulação está relacionada com uma maior taxa de desenvolvimento embrionário e reconhecimento materno da gestação (Maubrigades et al., 2022).

O uso do hCG deve ser avaliado em relação ao valor do protocolo, sendo o custo da dose (considerando 1000 UI por animal) cerca de cinco vezes maior quando comparado ao GnRH. Deve-se levar em conta que, além da eficácia em promover a ovulação, a ação luteinizante do hCG permite prolongar a vida útil do CL e aumentar as concentrações plasmáticas de progesterona (Bertan et al., 2006; Nascimento et al., 2013).

Todas as atribuições positivas do hCG devem ser levadas em consideração no momento de avaliar o custo-benefício, uma vez que não são todos os animais que recebem o tratamento, apenas aqueles que não expressaram cio no protocolo de IATF. Esses animais correspondem, normalmente, a uma parcela pequena dentro do total do lote e podem ser identificados de forma prática e eficiente com a utilização do bastão marcador na região sacro-caudal (Anache et al., 2017; Nogueira et al., 2019).

Pesquisas descreveram que o uso repetido de hCG em bovinos pode induzir uma resposta de anticorpos que pode neutralizar a molécula de hCG e reduzir drasticamente a ligação ao seu receptor, porém isso ocorre com a exposição prolongada e sucessiva ao fármaco (De Rensis et al., 2010). Em protocolos de IATF há um intervalo significativo entre as aplicações e as doses utilizadas são mínimas, não produzindo esse efeito humoral.

O hCG no momento da IA, como foi feito neste experimento, aumenta os níveis plasmáticos de progesterona dos dias 5 a 12 do ciclo estral em vacas sem CL acessório. A ligação estendida do hCG à membrana da célula lútea poderia explicar os efeitos estimulatórios aumentados do hCG nas concentrações plasmáticas de progesterona durante a fase lútea (Machado et al., 2008; De Rensis et al., 2008).

Foi observado um melhor efeito na fertilidade do hCG em relação ao período do ano, sendo melhor durante o período quente do ano, mas não no frio (De Rensis et al., 2008; De Rensis et al., 2017). Garcia-Ispuerto et al. (2019), apresentaram um aumento da taxa de prenhez em vacas multíparas, mostrando efeito positivo do hCG sobre a fertilidade de vacas multíparas em anestro, independentemente de estresse térmico e estação do ano.

Essa observação sugere que o hCG é capaz, até certo ponto, de neutralizar o efeito negativo sobre a fertilidade do estresse térmico durante a estação quente, o que para as regiões de temperaturas mais extremas pode representar um ganho significativo em resultado de prenhez.

Quando utilizado para estimular o crescimento folicular no dia 8 do protocolo, em vacas Nelore submetidas a IATF, o uso de hCG (300 UI i.m, 200 UI i.m ou 200 UI s.c) foi inferior ao uso de eCG (300 UI i.m) quanto ao crescimento final do folículo dominante, ocasionando ovulações precoces (Prata et al., 2018). O fato de induzir a ovulação em um menor espaço de tempo torna o hCG mais indicado para ser utilizado no dia da inseminação, considerando o tempo de viabilidade do sêmen no trato feminino até o momento da ovulação. Conforme Roelofs et al. (2006), o intervalo de tempo no qual as vacas foram inseminadas está diretamente ligado as taxas de fertilização e qualidade embrionária.

Este estudo baseou-se em dados provados de que fêmeas que não apresentam cio durante o protocolo de IATF tendem a ter menor taxa de ovulação e, conseqüentemente, menor probabilidade de engravidar (Silva et al., 2016). Os indutores, por sua vez, melhoram a sincronização da ovulação e taxas de prenhez, (Rodrigues et al., 2019).

Os resultados vistos nesse experimento corroboram com Nogueira et al. (2016) que testaram a eficácia do uso de indutores da ovulação no aumento nas taxas de prenhez, utilizando para detecção dos animais em cio os bastões marcadores, mostrando correlação com o diâmetro folicular no momento da IATF, bem como com a taxa de prenhez.

Em conclusão, a utilização do hCG, independente da dose (500 UI ou 1000 UI) é uma ferramenta efetiva para induzir a ovulação em vacas zebuínas com baixa ou nenhuma expressão de cio na IATF.

## 5. Referências Bibliográficas

Anache, N.A., Silva, K.C., Rodrigues, W.B., Jara, J.P., Cardoso, C., Nogueira, E., 2018. Estrus identification methods as an alternative to optimize IATF results. *Animal Reproduction*, v. 15, n. 3, p. 380, Jul./Sept. 2018. Abstract A065. Edição dos Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE); Florianópolis, SC, Brazil, August 16th to 18th.

Baruselli, P.S., Reis, E.L., Marques, M.O., Nasser, L.F., Bo, G.A., 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Animal Reproduction Science*. 82:479-86. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.025>.

Baruselli, P., Ferreira, F., Sá Filho, M.F., Bó, G.A., 2018. Review: Using artificial insemination v. natural service in beef herds. *Animal*. v.12, p.45-52. <https://doi.org/10.1017/S175173111800054X>.

Bertan, C.M., Cesar, M.C., Pugine, S. M. P., Binelli, M., Visintin, J. A., Assumpção, M.E.O.D., 2006. Induction of ovulation in cows with affinity chromatography-purified Human Chorionic Gonadotropin (hCG). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 43(3), 379-386. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26486>.

Bó, G.A., De La Mata, J.J., Baruselli, P.S., Menchaca, A., 2016. Alternative programs for synchronizing and re-synchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology*, v.86, p.388- 396. <https://doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04053>.

Burns, M.G., Buttrey, B.S., Dobbins, C.A., Martel, C. A., Olson, K.C., Lamb, G.C., Stevenson, J.S., 2008. Evaluation of human chorionic gonadotropin as a replacement for gonadotropin-releasing hormone in ovulation-synchronization protocols before fixed timed artificial insemination in beef cattle. *Journal Animal Science*. v.86(10), p.2539-2548. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1122>.

943 Buttrey, B.S., Burns, M.G., Stevenson, J.S., 2010. Ovulation and pregnancy  
944 outcomes in response to human chorionic gonadotropin before resynchronized  
945 ovulation in dairy cattle. *Theriogenology*. v.73, p.449-59.  
946 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.09.027>.

947 Colazo, M.G., Ambrose, D.J., 2011. Neither duration of progesterone inserts nor  
948 initial GnRH treatment affected pregnancy per timed-insemination in dairy heifers  
949 subjected to a Co-synch protocol. *Theriogenology*. v.76, p.578-588.  
950 <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0025>.

951 Cooper, D.A., Carver, D.A., Villeneuve, P., Silvia, W.J., Inskeep, E.K., 1991. Effects  
952 of progestagen treatment on concentrations of prosta glandins and oxytocin in  
953 plasma from the posterior vena cava of post-partum beef cows. *Journal*  
954 *Reproduction Fertility*. 91:411–21. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0910411>.

955 De Medeiros, S.F., Norman, R.J., 2008. Human choriogonadotropin protein core  
956 and sugar branches heterogeneity: basic and clinical insights. *Human*  
957 *Reproduction*. v.15, p.69-95. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn036>.

958 De Rensis, F., Valentini, R., Gorrieri, F., Bottarelli, E., Lopez-Gatius, F., 2008.  
959 Inducing ovulation with hCG improves the fertility of dairy cows during the warm  
960 season. *Theriogenology*, v.69, p.1077-82.

961 De Rensis, F., López-Gatius, I., García-Ispuerto, M., 2010. Techakumpu, Clinical  
962 use of human chorionic gonadotropin in dairy cows: An update, *Theriogenology*,  
963 Volume 73, Issue 8. Pages 1001-1008.  
964 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.027>.

965 De Rensis, F., Lopez-Gatius, F., Garcia-Ispuerto, I., Morini, G., Scaramuzzi, R.J.,  
966 2017. Causes of declining fertility in dairy cows during the warm season.  
967 *Theriogenology*. 91:145-53. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.12.024>.

968 Diaz, T., Schmitt, E.J., De La Sota, R.L., Thatcher M.J., Thatcher, W., 1998. Human  
969 chorionic gonadotropin induced alterations in ovarian follicular dynamics during the  
970 estrous cycle of heifers. *Journal Animal Science*, v.76, p.1929-36.  
971 <https://doi.org/10.2527/1998.7671929x>.

972 Fricke, P., Reynolds, L., Redmer, D., 1993. Effect of human chorionic gonadotropin  
973 administered early in the estrous cycle on ovulation and subsequent luteal function  
974 in cows. *Journal Animal Science*. v.71, p.1242-6.  
975 <https://doi.org/10.2527/1993.7151242x>.

976 Garcia-Ispuerto, I., De Rensis, F., Casas, X., Caballero, F., Serrano-Pérez, B.,  
977 López-Gatius, F., 2019. Inducing ovulation with hCG in a five-day progesterone-  
978 based fixed-time AI protocol improves the fertility of anestrous dairy cows under  
979 heat stress conditions. *Theriogenology*. 124:65-68.  
980 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.10.015>.

- 981 Hanlon, D.W., Jarrat, G.M., Davidson, P.J., Millar, A.J., Douglas, V.L., 2005. The  
982 effect of hCG administration five days after insemination on the first service  
983 conception rate of anestrous dairy cows. *Theriogenology*. 63:1938–45.  
984 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.002>.
- 985 Howard, H.J., Britt, J.H., 1990. Prostaglandin F<sub>2</sub> causes regression of an hCG-  
986 induced corpus luteum before day 5 of its life-span in cattle. *Journal Reproduction*  
987 *Fertility*. 90:245–53. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0900245>.
- 988 Ireland, J.J., Roche, J.F., 1983. Growth and differentiation of large antral follicles  
989 after spontaneous luteolysis in heifers: changes in concentration of hormones in  
990 follicular fluid and specific binding of gonadotropins to follicles. *Journal Animal*  
991 *Science*. v.57, p.157-167. <https://doi.org/10.2527/jas1983.571157x>.
- 992 Jameson, L.J., Hollenberg, A.N., 1993. Regulation of chorionic gonadotropin gene  
993 expression. *Endocrine reviews*, 14(2), 203–221. [https://doi.org/10.1210/edrv-14-2-](https://doi.org/10.1210/edrv-14-2-203)  
994 203.
- 995 Jónsson, R., Blanke, M., Poulsen, N.K., Caponetti, F., Hojsgaard, S., 2011. Estrus  
996 detection in dairy cows from activity and lying data using on-line individual models.  
997 *Computers and electronics in agriculture*. v.76, p.6-15.  
998 <https://doi.org/10.1016/j.compag.2010.12.014>.
- 999 Liu, T.C., Ho, C.T., Li, K.P., Chang, C.C., Chan, J.P., 2019. Human chorionic  
1000 gonadotropin (hCG)-induced ovulation occurs later but with equal occurrence in  
1001 lactating dairy cows: comparing hCG and gonadotropin-releasing hormone  
1002 protocols. *Journal of Reproduction and Development*. v.65(6), p.507-514.  
1003 <https://doi.org/10.1262/jrd.2019-037>.
- 1004 Machado, R., Bergamaschi, M.A.C.M., Barbosa, R.T., De Oliveira, C.A., Binelli, M.,  
1005 2008. Ovarian function in Nelore (*Bos Taurus indicus*) cows after post-ovulation  
1006 hormonal treatment. *Theriogenology*. 69:798–804.  
1007 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.10.025>.
- 1008 Maubrigades, L.R., Almeida, A.M., Lazzari, J., Ferreira, R., Gasperin, B.G.,  
1009 Mondadori, R.G., 2022. Efeitos da gonadotrofina coriônica humana sobre a função  
1010 do corpo lúteo bovino. *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e*  
1011 *Extensão*, v. 2, n. 14.  
1012 <https://periodicos.unipampa.edu.br/index.php/SIEPE/article/view/113306>.
- 1013 Meneghetti, M., Sa Filho, O.G., Peres, R.F.G., Lamb, G.C., Vasconcelos, J.L.M.,  
1014 2009. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos*  
1015 *indicus* cows I: basis for development of protocols. *Theriogenology*. 72:179-89.  
1016 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.02.010>.
- 1017 Nascimento, A.B., Bender, R.W., Souza, A.H., Ayres, H., Araujo, R.R., Guenther,  
1018 J.N., Sartori, R., Wiltbank, M.C., 2013. Effect of treatment with human chorionic  
1019 gonadotropin on day 5 after timed artificial insemination on fertility of lactating dairy



- 1020 cows. Journal Dairy Science. v.96, p.2873-2882. [https://doi.org/10.3168/jds.2012-](https://doi.org/10.3168/jds.2012-5895)  
1021 5895.
- 1022 Niswender, G.D., Schwall, R.H., Fitz, T.A., Farin, C.E., Sawyer, H.R., 1995.  
1023 Regulation of luteal function in domestic ruminants: new concepts. Recent Progress  
1024 in Hormone Research. 41:101–51. [https://doi.org/10.1016/b978-0-12-571141-](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-571141-8.50007-x)  
1025 8.50007-x.
- 1026 Nogueira, E., Silva, M.R., Silva, J.C.B., Abreu, U.P.G., Anache, N.A., Silva, K.C.,  
1027 Cardoso, C.J.T., Sutovsky, P., Rodrigues, W.B., 2019. Timed artificial insemination  
1028 plus heat I: effect of estrus expression scores on pregnancy of cows subjected to  
1029 progesterone-estradiol-based protocols, Animal, v.15, p.1-8.  
1030 <https://doi.org/10.1017/S1751731119000442>.
- 1031 Nogueira, E., Rodrigues, W.B., Silva, A.S, Borges, J.C., Silva, K.C., Anache, N.A.,  
1032 Bezerra, A.O., Leão, B.C.S., Rocha, N.A.S., Mingoti, G.Z., 2016. Aplicação de  
1033 GnRH em vacas com baixa ou sem expressão de estro avaliadas com bastões  
1034 marcadores aumenta a taxa de prenhez em vacas de corte submetidas a iatf.. In:  
1035 REUNIÃO ANUAL DA SBTE, 30, 2016, Foz do Iguaçu. Anais... Foz do Iguaçu:  
1036 Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. p. 240.
- 1037 Pereira, M.H.C., Wiltbank, M.C., Vasconcelos, J.L.M., 2016. Expression of estrus  
1038 improves fertility and decreases pregnancy losses in lactating dairy cows that  
1039 receive artificial insemination or embryo transfer. Journal Dairy Science. v.99,  
1040 p.2237-2247. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9903>.
- 1041 Pontes, G.A., Hesler, L.A., Grum, D.E., Mussard, M.L., Gasser, C.L., Day, M.L.,  
1042 2008. Decreasing the interval between GnRH and PGF2 $\alpha$  from 7 to 5 days and  
1043 lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows.  
1044 Theriogenology. v.69, p.843-851.  
1045 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.12.011>
- 1046 Prata, A.B., Drum, J.N., Melo, L.F., Araujo, E.R., Sartori, R., 2018. Effect of different  
1047 chorionic gonadotropins on final growth of the dominant follicle in Bos indicus cows.  
1048 Theriogenology, v.111, p.52-55.  
1049 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.01.011>.
- 1050 Richardson, B.N., Hill, S.L., Stevenson, J.S., Djira, G.D., Perry, G.A., 2016.  
1051 Expression of estrus before fixed-time AI affects conception rates and factors that  
1052 impact expression of estrus and the repeatability of expression of estrus in  
1053 sequential breeding seasons. Animal Reproduction Science. v.166, p.133-140.  
1054 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.013>.
- 1055 Rizkallah, T., Gorpide, E., Van de Wiele, R.L., 1969. Metabolism of hCG in man.  
1056 Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 29:92–100.
- 1057 Rodrigues, W.B., Silva, A.S., Borges Silva, J.C., Anache, N.A., Silva, K.C., Cardoso,  
1058 C.J.T., Garcia, W.R., Sutovsky, P., Nogueira, E., 2019. Timed artificial insemination

1059 plus heat II: Gonadorelin injection in cows with low estrus expression scores  
 1060 increased pregnancy in progesterone/estradiol-based protocol. *Animal*. v.13(10),  
 1061 p.2313-2318. <https://doi.org/10.1017/S1751731119000454>.

1062 Roelofs, J.B., Graat, E.A., Mullaart, E., Soede, N.M., Voskamp-Harkema, W., Kemp,  
 1063 B., 2006. Effects of insemination-ovulation interval on fertilization rates and embryo  
 1064 characteristics in dairy cattle. *Theriogenology*. v.66(9), p.2173-2181.  
 1065 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.07.005>.

1066 Sá Filho, M.F., Ayres, H., Ferreira, R.M., Marques, M. O., Reis, E.L., Silva, R.C.,  
 1067 Rodrigues, C.A., Madureira, E.H., Bó, G.A., Baruselli, P.S., 2010. Equine chorionic  
 1068 gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a  
 1069 norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos*  
 1070 *indicus*) cows. *Theriogenology*. v.73, p.651-658.  
 1071 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.004>

1072 Santos, J.E.P., Thatcher, W.W., Pool, L., Overton, M.W., 2001. Efeito da  
 1073 gonadotrofina coriônica humana na função lútea e no desempenho reprodutivo de  
 1074 vacas leiteiras Holandesas em lactação de alta produção, *Journal of Animal*  
 1075 *Science*, Volume 79, Edição 11. Páginas 2881– 2894.

1076 Satake, N., Edwards, S.A.A., Tutt, D., McGowan, M.R., Boe-Hansen, G.B., 2017.  
 1077 Investigation of in vitro measurable sperm attributes and their influence on  
 1078 electroejaculated bull semen with a fixed-time artificial insemination protocol in  
 1079 Australian *Bos indicus* cattle. *Reproduction in Domestic Animals*. v.53, p.414-422.  
 1080 <https://doi.org/10.1111/rda.13121>.

1081 Silva, K.S., Borges, J.C., Abreu, U.G.P., Batista, D.S.N., Anache, N.A., Bezerra,  
 1082 A.O., Jara, J.P., Nogueira, E., 2016. Escore de cio avaliado com bastões  
 1083 marcadores influencia as taxas de gestação de vacas nelore submetidas a  
 1084 protocolos de inseminação artificial em tempo fixo. *Animal Reproduction*, v.13(3),  
 1085 p.451.

1086 Stenman, U.H., Tiitinen, A., Alfthan, H., Valmu, L., 2006. The classification,  
 1087 functions and clinical use of different isoforms of HCG. *Human Reproduction*  
 1088 *Update*. 12:769–84. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml029>.

1089 Stevenson, J.S., Tiffany, S.M., Inskeep, E.K., 2008. Maintenance of pregnancy in  
 1090 dairy cattle after treatment with human chorionic gonadotropin or gonadotropin-  
 1091 releasing hormone. *Journal of Dairy Science*. 91:3092–101.  
 1092 <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1027>.

1093 Stevenson, J.S., Portaluppi, M.A., Tenhouse, D.E., Lloyd, A., Eborn, D.R., Kacuba,  
 1094 S., De Jarnette, J.M., 2007. Interventions After Artificial Insemination: Conception  
 1095 Rates, Pregnancy Survival, and Ovarian Responses to Gonadotropin-Releasing  
 1096 Hormone, Human Chorionic Gonadotropin, and Progesterone. *Journal of Dairy*  
 1097 *Science*, 90(1), 331–340. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)72634-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72634-6).

1098 Wallace, L.D., Breiner, C.A., Breiner, R.A., Spell, A.R., Carter, J.A., Lamb, G.C.,  
1099 Stevenson, J.S., 2011. Administration of human chorionic gonadotropin at embryo  
1100 transfer induced ovulation of a first wave dominant follicle, and increased  
1101 progesterone and transfer pregnancy rates. *Theriogenology*. v.75(8), p.1506-1515.  
1102 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.012>.

1103

1104

1105

1106

1107

1108

1109

1110

1111

1112

1113

1114

1115

1116

1117

1118

1119

1120

1121

1122

**CAPÍTULO 3: USO DE DIFERENTES INDUTORES DE OVULAÇÃO COM  
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CIO (ESCT) EM PROTOCOLOS DE  
IATF.**

Artigo formatado nas normas do periódico: *Animal Reproduction Science*

**Efeito do uso de hCG e GnRH nas taxas de prenhez em protocolos de  
IATF com avaliação de expressão de cio (ESCT).**

*Nathalia Albaneze Anache<sup>a</sup>; Eriklis Nogueira<sup>b</sup>*

<sup>a</sup>Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Av. Senador Felinto Muller 2443, 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil. E-mail: nathaliaanache@hotmail.com

<sup>b</sup>Embrapa Gado de Corte, Av. Rádio Maia, 830, 79106-550, Campo Grande, MS, Brasil. E-mail: eriklis.nogueira@embrapa.br

**Resumo:** Apesar dos evidentes avanços na produção de gado de corte, conferidos pelo desenvolvimento comercial da IATF, a taxa de prenhez média esperada é estimada em cerca de 50%, e diversos fatores podem estar relacionados a esses índices, destacando-se aqueles inerentes à fêmea, como o anestro pós-parto e a condição corporal no início dos protocolos. Sabe-se que vacas que não apresentam cio durante o protocolo tendem a ter menor taxa de ovulação e, conseqüentemente, menor probabilidade de engravidar. Assim, esse trabalho avaliou estratégias para melhorar nas taxas de prenhez de vacas de corte, submetidas a protocolos de IATF com avaliações simples de cio (ESCT) e aplicação de dois diferentes indutores adicionais de ovulação (GnRH e hCG). Foram avaliadas 2.315 fêmeas da raça Nelore, submetidas ao protocolo de IATF. Os animais que apresentaram pouco ou nenhum cio (ESCT 2 e 1, respectivamente) foram divididos em três grupos, no dia da inseminação: controle (n=301): não receberam nenhum tratamento, tratamento GnRH (n=265): receberam aplicação de 0,1 mg, I.M. de Gonadorelina e tratamento hCG (n=267): receberam a aplicação de 1000 UI, I.M. de hCG. As vacas que apresentaram ESCT 3 (n= 1483) foram inseminadas no mesmo momento, sem aplicação de tratamento adicional. Foi realizado diagnóstico de gestação em torno de 30 dias após a IATF (com ultrassonografia modo B). Avaliaram-se as taxas de prenhez dos animais para comparar os efeitos dos indutores da ovulação e não houve diferença estatística ( $P<0,001$ ) entre os grupos GnRH (48,3%) e hCG (53,05%), sendo ambos eficazes na indução da ovulação em animais que deram pouco ou nenhum cio (ESCT 1 e 2), aumentando as taxas de prenhez quando comparado ao grupo controle.

**Palavras chaves:** Bastão marcador, dinâmica folicular, indutor de ovulação.

## 1. Introdução

A incorporação de programas reprodutivos ajuda a otimizar os resultados e rentabilidade dos rebanhos, assim, a Inseminação artificial (IA), bem como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), permitem maior ganho genético e econômico (Baruselli et al., 2018). Em protocolos de IATF, como regra, todas as vacas aptas são inseminadas, independentemente se o animal expressou o estro, embora estudos mostrem que a expressão do estro próximo a IATF está associada a maior fertilidade (Pancarci et al., 2002; Souza et al., 2007).

Vacas que não apresentam cio durante o protocolo tendem a ter menor taxa de ovulação e, conseqüentemente, menor probabilidade de engravidar (Silva et al., 2016). Ademais, estudos indicam uma diminuição na perda de gestação em vacas que exibem estro durante protocolos de IATF, sugerindo que o ambiente hormonal que produz a falta de expressão de estro também produz alterações uterinas que diminuem a probabilidade de manutenção da gestação no período crítico entre o primeiro e segundo mês (Pereira et al., 2016; Richardson et al., 2016).

Uma das grandes vantagens em se verificar a expressão de cio está em poder identificar o melhor momento para a IA, em relação à ovulação, uma vez que a vida útil do oócito bovino é curta e esse intervalo é crucial para melhorar a fertilidade do rebanho. Conforme Roelofs et al. (2006), o intervalo de tempo no qual as vacas foram inseminadas está diretamente ligado as taxas de fertilização e qualidade embrionária. Assim, a falha na identificação do cio, ou ausência do mesmo, resulta em grandes perdas econômicas para o sistema de produção, reduzindo a taxa de serviço e rendimento do rebanho (Rao et al., 2013).

Diante disso, novas tecnologias estão sendo desenvolvidas e implementadas em programas de IATF para melhorar o controle do estro e maior sucesso no número e qualidade de gestação (Jónsson et al. 2011; Richardson et al., 2016; Nogueira et al., 2019). Entre elas, o uso de indutores da ovulação em fêmeas zebuínas lactantes classificadas segundo o escore de remoção de tinta na cauda, sendo aplicados naquelas com baixa expressão de cio (ESCT 1 e 2) no momento da inseminação (Nogueira et al., 2016).

O análogo de GnRH, usado como indutor da ovulação, induz uma onda de LH semelhante a pré-ovulatória em 2 horas e a ovulação entre 26 e 30 horas, respectivamente, e sua utilização na IATF, em fêmeas com baixa ou sem expressão de cio, melhora a sincronização da ovulação e taxas de prenhez (Sá Filho et al., 2010; Rodrigues et al., 2019).

A gonadotrofina coriônica humana (hCG) é produzida pelo trofoblasto humano e excretado em grandes quantidades na urina de mulheres grávidas (De Medeiros & Norman, 2008). Nas vacas, o hCG se liga aos receptores de LH nas células da granulosa e da teca dos folículos ovarianos com alta afinidade (Ireland & Roche, 1983) e tem sido usado para induzir a ovulação em protocolos de IATF ou para formar o CL acessório após inseminação (FRICKE et al., 1993; Nascimento et al., 2013).

Alguns trabalhos que testaram a utilização do hCG como indutor de ovulação em protocolos de IATF obtiveram efeitos semelhantes ao GnRH (Burns, et al., 2008; Liu et al., 2019), além terem efeito no aumento dos níveis de progesterona plasmático, redução das perdas embrionárias iniciais e assim, melhora da fertilidade (De Rensis et al., 2008; Wallace et al., 2011).

Estudos também relataram recentemente que as taxas de prenhez poderiam ser aumentadas se fosse diminuído o período de crescimento do folículo dominante ovulatório e prolongado a duração do proestro (Pontes et al., 2008, Colazo & Ambrose, 2011, Bó et al., 2016). Esse novo protocolo, promove modificações durante o proestro e define um perfil endócrino pré-ovulatório, que está positivamente associado com CL mais competente e uma melhora do ambiente uterino (De La Mata et al., 2018).

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos indutores da ovulação GnRH e hCG, utilizados no momento da inseminação, em protocolos de IATF, comparando-os em relação as taxas de prenhez obtidas em fêmeas com avaliação de cio ESCT 1 e 2.

## **2. Material e métodos**

### *Animais*

Foram utilizadas 2.316 vacas lactantes da raça Nelore, na região de Planalto do estado de Mato Grosso do Sul (ECC (1-5)), durante as estações de monta de 2019 e 2020. As fêmeas destinadas a protocolos reprodutivos foram submetidas a exame ginecológico completo, considerando: escore de condição corporal (ECC), categoria animal, histórico reprodutivo e sanitário. Também foi realizado exame ultrassonográfico para avaliar a condição ovariana e uterina.

#### *Delineamento experimental*

Todos os animais foram submetidos a protocolo de IATF e classificados segundo o escore de remoção de tinta da cauda (ESCT), em que: ESCT 1 - sem remoção de tinta = sem expressão de cio; ESCT2 - pouca remoção de tinta = baixa expressão de cio; ESCT3 - muita ou remoção total de tinta = alta expressão de cio. Os animais classificados como ESCT 1 e ESCT 2 no momento da IATF foram aleatoriamente distribuídos em três tratamentos:

I. Controle: 301 vacas não receberam nenhum tratamento, servindo de grupo controle do experimento.

II. Tratamento GnRH: 265 vacas receberam a aplicação de GnRH (0,1 mg Gonadorelina, I.M.), no momento da inseminação (IATF).

III. Tratamento hCG: 267 vacas receberam a aplicação de hCG (1000 UI, I.M.) no momento da inseminação (IATF).

Adicionalmente, as vacas que apresentaram ESCT 3 (n= 1483) foram inseminadas no mesmo momento, sem aplicação de tratamento adicional.

O experimento foi realizado em fazendas diferentes, mas o protocolo de IATF utilizado em todas foi de três manejos, sendo no primeiro dia de tratamento (D0) realizada a colocação de implante intravaginal de progesterona e aplicação de benzoato de estradiol (BE – 2mg, I.M.). No dia 8 (D8) foi retirado o dispositivo e aplicado os hormônios prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ , 500 $\mu$ g, I.M.), cipionato de estradiol (ECP – 1mg, I.M.) e 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (ECG, I.M.).

Também foi feito a marcação dos animais na região sacro-caudal, com bastão marcador, para classificação do cio.

No dia 10 (D10) foi feita a classificação da expressão do cio através de escores de remoção da tinta na cauda (ESCT), realizado os três tratamentos mencionados e feita a inseminação artificial (IA), após 48 horas da retirada do dispositivo (D10). O sêmen utilizado para inseminação foi devidamente testado e possuíam os padrões de qualidade necessários.

O diagnóstico de gestação foi realizado, em todas as propriedades, em torno de 35 dias após a IATF (com ultrassonografia modo B), para avaliação da taxa de prenhez.

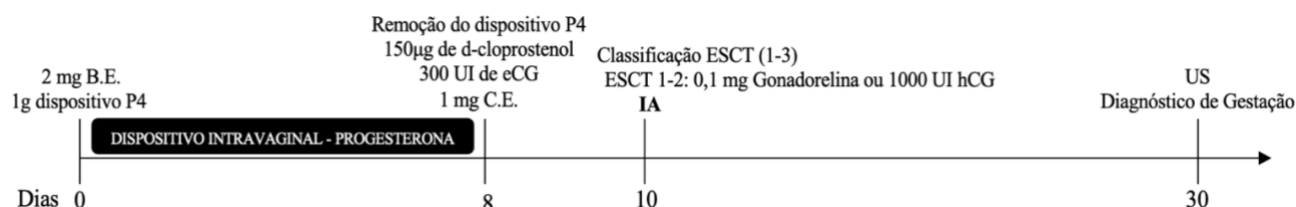


Figura 4. Delineamento experimental.

### *Análise estatística*

Todas as análises foram feitas utilizando o SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA; versão 9.4. A taxa de prenhez no dia 30, foram avaliadas utilizando o procedimento GLIMMIX do SAS. O modelo estatístico utilizou como efeito fixo o tratamento e como efeito aleatório o animal (tratamento×lote) e lote. O ECC inicial, touro e inseminador, foram incluídos como covariáveis, porém foram removidos do modelo quando o  $P$  foi  $\leq 0.10$  para cada covariável específica. A significância foi definida quando  $P \leq 0.05$ , e tendência quando  $P > 0.05$  e  $\leq 0.10$ .

### **3. Resultados**

Foram avaliadas as taxas de prenhez dos animais para comparar os efeitos dos indutores da ovulação, conforme mostrado na Tabela 1, não houve diferença estatística entre os grupos GnRH (48,3%) e hCG (52,05%) ( $P=0,590$ ), ambos se mostraram eficazes na indução da ovulação em animais que deram pouco ou



nenhum cio (ESCT 1 e 2), aumentando as taxas de prenhez quando comparado ao grupo controle, que não recebeu nenhum tratamento.

O grupo hCG, porém, foi igual estatisticamente ao grupo ESCT 3 (55,83%,  $P=0,160$ ), ou seja, aos animais que apresentaram cio em resposta ao protocolo da IATF (Figura 5). O Escore de condição corporal (ECC) dos animais teve efeito na taxa de prenhez ( $P>0,01$ ), porém não teve efeito nos tratamentos.

Tabela 2. Taxa de prenhez (%) de acordo com o uso de diferentes indutores adicionais de ovulação no momento da IATF e diferentes ESCT.

| TRATAMENTO            | ESCT 1 e 2         |                    |                     | ESCT 3             | Valor P |
|-----------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------|
|                       | Controle           | GnRH               | hCG                 | ESCT 3             |         |
| Número de animais (n) | 300                | 265                | 267                 | 1483               | 0,001   |
| Taxa de Prenhez (%)   | 42,00 <sup>c</sup> | 48,30 <sup>b</sup> | 52,05 <sup>ab</sup> | 55,83 <sup>a</sup> |         |

\*Valor significativo com  $P\leq0,05$ .

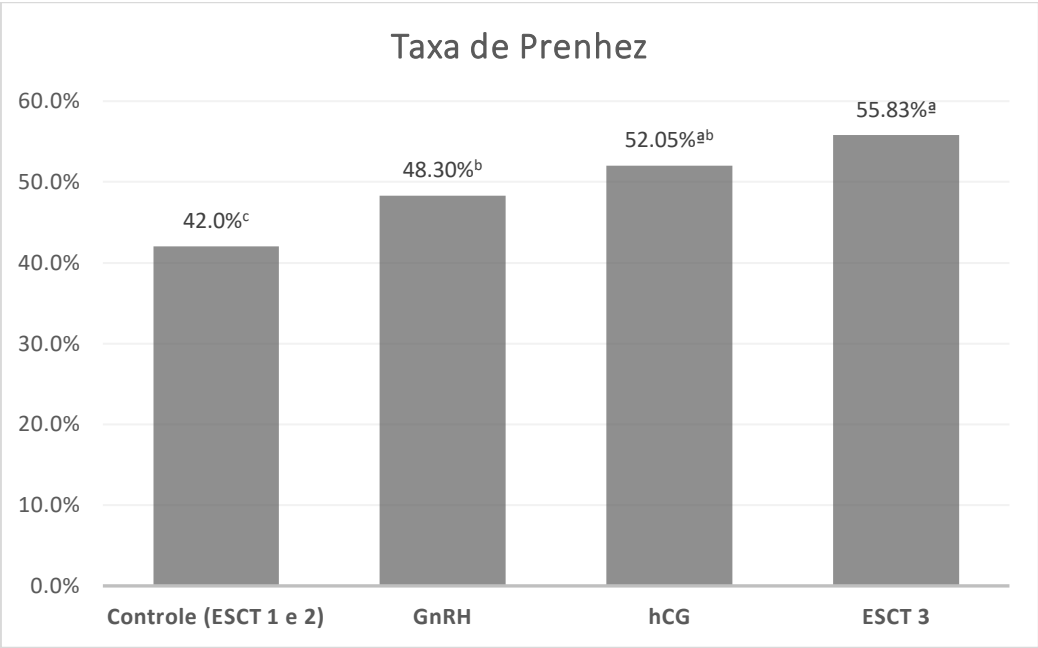


Figura 5. Taxa de prenhez (%), de acordo com uso de diferentes indutores adicionais de ovulação no momento da IATF e diferentes ESCT ( $P\leq0,05$ ).

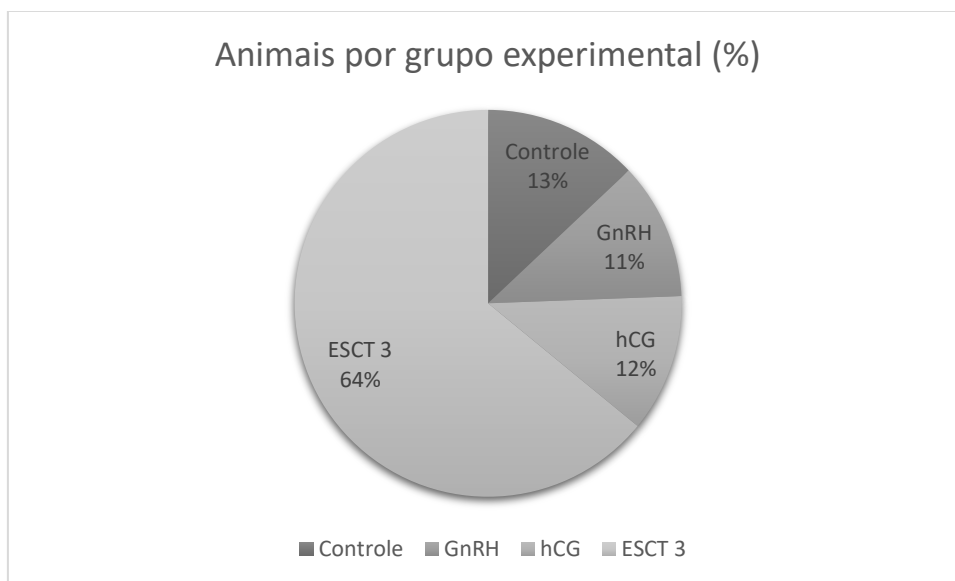


Figura 6. Distribuição animais por grupo experimental (%), de acordo com uso de diferentes indutores adicionais de ovulação no momento da IATF e diferentes ESCT.

#### 4. Discussão

Este experimento testou qual o melhor indutor de ovulação, GnRH ou hCG, para ser aplicado no momento da inseminação no protocolo de IATF, nos animais que expressaram pouco ou nenhum cio em resposta ao protocolo hormonal (ESCT 1-2), avaliando os seus efeitos nas taxas de prenhez.

Este estudo baseou-se em dados provados de que fêmeas que não apresentam cio durante o protocolo de IATF tendem a ter menor taxa de ovulação e, conseqüentemente, menor probabilidade de engravidar (Silva et al., 2016). Os indutores, por sua vez, melhoram a sincronização da ovulação e taxas de prenhez, (Rodrigues et al., 2019), fatos que foram vistos nos resultados desse experimento.

Além disso, vimos a resposta superior em relação a taxa de prenhez e ovulação nos animais que expressaram cio no protocolo. Estudos indicam uma redução na perda gestacional em vacas que demonstram estro durante protocolos de IATF, sugerindo que o ambiente hormonal que produz a falta de expressão de estro também produz alterações uterinas que diminuem a probabilidade de manutenção da gestação no período crítico entre o primeiro e o segundo mês (Pereira et al., 2016; Richardson et al., 2016).

Os resultados observados nesse experimento corroboram com (Nogueira et al., 2016) que testaram a eficácia do uso de indutores da ovulação no aumento nas taxas de prenhez, utilizando para detecção dos animais em cio os bastões marcadores, mostrando correlação com o diâmetro folicular no momento da IATF, bem como com a taxa de prenhez. Uma das grandes vantagens em se verificar a expressão de cio está em poder identificar os animais que responderam ao protocolo hormonal e aumentar as chances de sucesso da inseminação (Silva et al., 2016).

Conforme Roelofs et al. (2006), o intervalo de tempo no qual as vacas foram inseminadas está diretamente ligado as taxas de fertilização e qualidade embrionária. Assim, a falha na identificação do cio, ou ausência do mesmo, resulta em grandes perdas econômicas para o sistema de produção, reduzindo a taxa de serviço e rendimento do rebanho (Rao et al., 2013). Esses dados reforçam o que relatamos nos animais do grupo controle ESCT 1 e 2, que não apresentaram cio e tiveram menor taxa de prenhez.

O GnRH é liberado de forma pulsátil pelo hipotálamo, cujo alvo são sítios específicos localizados na hipófise anterior, ocasionando a liberação do LH (Estes et al., 1977). Assim, sua ação é causar ovulação ou luteinização do folículo dominante presente no momento da aplicação. A sua atuação diretamente na hipófise resulta em ovulações em intervalos menores em relação aos ésteres de estradiol (Macmillan & Thacther, 1991).

Nesse experimento, a utilização de GnRH como indutor da ovulação aumentou a taxa de prenhez em animais que não haviam apresentado cio durante o protocolo quando comparado ao grupo controle que não recebeu nenhum tratamento. Resultados similares foram encontrados por Sá Filho et al. (2010) e Rodrigues et al. (2019), em que o GnRH induziu uma onda de LH semelhante a pré-ovulatória em 2 horas e a ovulação entre 26 e 30 horas, respectivamente, e sua utilização na IATF, em fêmeas com baixa ou sem expressão de cio, resultou em melhora na sincronização da ovulação e taxas de prenhez.

A gonadotrofina coriônica humana (hCG) tem sido muito utilizada devido a sua atividade semelhante ao LH, porém com ação mais prolongada. Nas vacas, o

hCG tem efeito luteotrófico devido a ligação aos receptores de LH das células lúteas, o qual persiste por até 30 h após o tratamento (Ireland & Roche, 1983; De Rensis et al., 2008). Sua aplicação aumenta a capacidade esteroidogênica do CL primário, devido à diferenciação das células da teca e granulosa em células lúteas grandes e pequenas e à transformação de células lúteas pequenas em células grandes (Farin et al., 1988).

A utilização do hCG nesse experimento mostrou eficácia quando comparado ao grupo controle. Igualmente, pesquisas que testaram a utilização do hCG como indutor de ovulação em protocolos de IATF obtiveram efeitos semelhantes ao GnRH (Burns, et al., 2008; Liu et al., 2019), além de terem efeito no aumento dos níveis de progesterona plasmática, redução das perdas embrionárias iniciais e assim, melhora da fertilidade (De rensis et al., 2008; Wallace et al., 2011).

O resultado do hCG foi igual ao dos animais que apresentaram cio durante o protocolo (ESCT 3), podendo sugerir um melhor desempenho quando comparado ao GnRH. Geary et al. (2001) e Stevenson et al. (2006) também relataram maior eficácia do hCG na estimulação da ovulação em gado leiteiro e em vacas de corte cíclicas, respectivamente.

Buttrey et al. (2010) também descreveram maior incidência de ovulação após hCG, o que possivelmente pode ser uma função da maior meia-vida de hCG em comparação com a liberação de LH induzida por GnRH em resposta aos quatro locais de glicosilação do hCG (Jameson & Hollenberg, 1993), por exemplo, o hCG ligado ao receptor de LH nas células lúteas foi internalizado 50 vezes mais lentamente que o LH (Niswender et al., 1995). Essas características permitem que o hCG induza a ovulação de forma mais potente.

Foi descoberto que o CL induzido por hCG se comporta de maneira diferente do CL induzido espontaneamente quanto a sua regressão pela PGF2, sendo induzido a regredir antes do quinto dia de vida útil. Também, observou-se que diferia em tamanho e cor do CL formado espontaneamente e produzia menos progesterona quando cultivado in vitro na presença de LH (Howard & Britt, 1990; Fricke et al., 1993).

Ainda, Buttrey (2010) e colaboradores identificaram que os CL auxiliares induzidos em vacas tratadas com GnRH ou hCG variaram de 35,7% a 85,7% (média = 61%) em um grupo, mas apenas 27,5% a 62,5% (média = 33%) em outro grupo. Esses animais tiveram aumento nas concentrações séricas de progesterona, como visto em outros estudos (Santos et al., 2001; Stevenson et al., 2007), porém, a perda de gestação foi maior em vacas tratadas com hCG, mesmo ele gerando maior formação de CL auxiliares do que o GnRH.

Uma explicação para não terem reduzido efetivamente a perda de gestação pode ser o tempo em que o tratamento foi realizado, onde os animais foram tratados tardiamente, após a IA, entre os dias 30 e 71 de gestação. Mesmo tendo aumento nas concentrações de progesterona com a formação de novas estruturas lúteas, a formação do CL acessório possivelmente ocorreu muito tarde, entre os dias 23 a 35, após o estro ou IA (Buttrey et al., 2010). Assim, a aplicação precoce se mostraria mais efetiva.

Santos et al., 2001 testaram a aplicação de hCG cinco dias após a IA, e seus resultados quanto ao aumento da taxa de prenhez nos animais tratados corroboram com os resultados encontrados nesse experimento, inclusive melhorando a taxa de prenhez em vacas que perderam condição corporal entre a IA e 28 dias após. Entretanto, mesmo verificando a formação de CL acessório, aumento da concentração de progesterona e melhora na concepção, as perdas gestacionais foram semelhantes entre os grupos de tratamento.

O aumento das concentrações séricas de progesterona no tratamento com hCG ocorre por pelo menos duas maneiras: primeiro pela formação do CL acessório, segundo pelo aumento no número de células lúteas secretoras de progesterona no CL existente aumentando sua área de superfície e volume, sendo que ambas as maneiras também podem ocorrer ao mesmo tempo (Santos et al., 2001; Stevenson et al., 2007).

Keskin et al. (2010) obtiveram resultados diferentes comparando o uso dos dois indutores com protocolo Ovsynch em vacas em lactação e não houve aumento nas taxas de ovulação e concepção quando utilizou-se hCG, não sendo ele um bom substituto para o GnRH. Esse resultado corrobora com o encontrado por Geary et

al. (2001) e Burns et al. (2008), que encontraram resultados superiores com o uso do GnRH.

Ainda comparando os indutores em outro tipo de protocolo, em vacas de corte, a substituição do GnRH por hCG também não foi eficaz, sendo as taxas de prenhez maiores com o uso de GnRH no início e no final ou apenas no final do protocolo (Schmitz et al., 2017).

Apesar de ter se mostrado eficaz neste estudo, o uso do hCG deve ser avaliado em relação ao valor do protocolo, sendo o custo da dose (considerando 1000 UI por animal) cerca de cinco vezes maior quando comparado ao GnRH. Deve-se levar em conta que, além da eficácia em promover a ovulação, a ação luteinizante do hCG permite prolongar a vida útil do CL e aumentar as concentrações plasmáticas de progesterona (Bertan et al., 2006; Nascimento et al., 2013).

Além disso, conforme Diaz et al. (1998), quando administrado durante o diestro, na presença de folículos pré-ovulatórios, o hCG pode induzir a formação de corpos lúteos acessórios, prolongando o ciclo estral e auxiliando na manutenção inicial da gestação, visto que maior produção de progesterona após a ovulação está relacionada com uma maior taxa de desenvolvimento embrionário e reconhecimento materno da gestação (Maubrigades et al., 2022).

Essa redução de perda embrionária deve ser levada em consideração no momento de avaliar o custo-benefício, uma vez que não são todos os animais que recebem o tratamento, apenas aqueles que não expressaram cio no protocolo de IATF. Esses animais correspondem, normalmente, a uma parcela pequena dentro do total do lote e podem ser identificados de forma prática e eficiente com a utilização do bastão marcador na região sacro-caudal (Anache et al., 2018; Nogueira et al., 2019).

Em protocolos de IATF em vacas os principais fármacos usados como indutores de ovulação são os análogos (gonadorelina) ou superanálogos (buserelina, lecirelina, fertirelina) do GnRH, ésteres de estradiol, como o benzoato (BE) e o cipionato de estradiol (CE), o hCG e o hormônio luteinizante (LH).

Recentemente, foi relatado efeito positivo da PGF na ovulação em bovinos (Castro et al., 2018).

Os ésteres de estradiol são amplamente usados para o controle do ciclo estral e, quando usados na ausência de progesterona, estimulam a liberação de GnRH e LH pelo hipotálamo e hipófise, respectivamente, induzindo a ovulação do folículo dominante (Moenter et al., 1990).

A ovulação é mais tardia nesses protocolos quando comparado com protocolo que utilizam GnRH (Williams & Stancel, 1996). Dessa forma, não seriam bons indutores para serem empregados no dia da inseminação (D10) como uma forma de aumentar as chances de prenhez dos animais que não obtiveram boa resposta a sincronização (ESCT 1 e 2), já que o tempo de ação não seria ideal.

Outro ponto importante em relação ao uso de ésteres de estradiol como indutores de ovulação é que, apesar de sua eficiência e da excelente relação custo-benefício, alguns países proibiram sua utilização devido à preocupação com possíveis efeitos residuais nos alimentos de origem animal e prejuízos a saúde humana (Lane et al., 2008).

Os tratamentos com hCG e GnRH possuem efeitos semelhantes no ovário (Fricke et al., 1993), na indução a ovulação e na formação de corpos lúteos acessórios, elevando consideravelmente as concentrações plasmáticas de progesterona alcançadas sete dias após o tratamento (Hanlon et al., 2005).

Enquanto o hCG tem seu efeito mais prolongado, a administração de GnRH aumenta as concentrações de LH no soro por aproximadamente 5h (Kinser et al., 1983). Ademais, o CL formado após a ovulação induzida por GnRH pode não ser totalmente funcional (Santos et al., 2001).

Diante disso, estudos mostraram que o tratamento com hCG geralmente eleva as concentrações de progesterona mais do que o tratamento com GnRH (Stevenson et al., 2007; Stevenson et al., 2008). Também mostraram que vacas com menores concentrações de progesterona durante o diestro subsequente à IA, tiveram menores taxas de concepção (Mann et al., 1999).

A fertilidade após ambos os tratamentos está diretamente relacionada à fase do ciclo estral em que a administração foi realizada, à ciclicidade do animal e o

período do ano. Observou-se em alguns estudos mais vacas em anestro retornarem ao estro após GnRH em comparação com hCG mas em outros estudos isso não foi relatado (Burns et al., 2008).

O tratamento com hCG também foi relacionado a um aumento da taxa de prenhez em vacas multíparas por Garcia-Ispuerto et al. (2019), mostrando efeito positivo do hCG sobre a fertilidade de vacas multíparas em anestro, independentemente de estresse térmico e estação do ano. De Rensis et al. (2008), também observou um melhor efeito na fertilidade do hCG em comparação com o GnRH em relação ao período do ano, sendo melhor durante o período quente do ano, mas não no frio.

A última observação sugere que o hCG é capaz, até certo ponto, de neutralizar o efeito negativo sobre a fertilidade do estresse térmico durante a estação quente, o que para regiões de temperaturas mais extremas pode representar um ganho significativo em resultado de prenhez.

A administração de GnRH requer a presença de LH, no nível hipofisário, para ter eficácia e o efeito endógeno do LH no CL dura menos tempo do que o hCG (Garcia-Ispuerto et al., 2019) Assim, o uso de hCG em vez de GnRH pode ser indicado para vacas com problemas de fertilidade, como por exemplo, vacas leiteiras de alta produção ou vacas com perda expressiva de escore de condição corporal, que podem apresentar deficiência no estoque de LH e assim, baixo efeito no tratamento com GnRH.

Butler (2003) relatou que o balanço energético negativo está relacionado com a diminuição da frequência dos pulsos de LH e com os baixos níveis de glicose, insulina e IGF-I no sangue, os quais restringem a produção de estrogênio pelos folículos dominantes, favorecendo a diminuição da qualidade dos ovócitos e a competência para o desenvolvimento embrionário, além de baixas concentrações séricas de progesterona.

Em conclusão, os indutores da ovulação GnRH e hCG se mostraram eficientes para aumentar taxa de prenhez em fêmeas que não apresentaram cio no protocolo de IATF, mostrando-se alternativas promissoras para o incremento nos resultados da estação de monta.



## 1506        **5. Referências bibliográfica**

- 1507        Anache, N.A., Silva, K.C., Rodrigues, W.B., Jara, J.P., Cardoso, C., Nogueira, E.,  
1508        2018. Estrus identification methods as an alternative to optimize IATF results.  
1509        *Animal Reproduction*, v. 15, n. 3, p. 380, Jul./Sept. 2018. Abstract A065. Edição  
1510        dos Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology  
1511        Society (SBTE); Florianópolis, SC, Brazil.
- 1512        Baruselli, P., Ferreira, F., Sá Filho, M.F., Bó, G.A., 2018. Review: Using artificial  
1513        insemination v. natural service in beef herds. *Animal*. v.12, p.45-52.  
1514        <https://doi.org/10.1017/S175173111800054X>.
- 1515        Bertan, C.M., Cesar, M.C., Pugine, S. M. P., Binelli, M., Visintin, J. A., Assumpção,  
1516        M.E.O.D., 2006. Induction of ovulation in cows with affinity chromatography-purified  
1517        Human Chorionic Gonadotropin (hCG). *Brazilian Journal of Veterinary Research  
1518        and Animal Science*, 43(3), 379-386. [https://doi.org/10.11606/issn.1678-  
1519        4456.bjvras.2006.26486](https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26486).
- 1520        Bó, G.A., De La Mata, J.J., Baruselli, P.S., Menchaca, A., 2016. Alternative  
1521        programs for synchronizing and re-synchronizing ovulation in beef cattle.  
1522        *Theriogenology*, v.86, p.388- 396. <https://doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04053>.
- 1523        Burns, M.G., Buttrey, B.S., Dobbins, C.A., Martel, C. A., Olson, K.C., Lamb, G.C.,  
1524        Stevenson, J.S., 2008. Evaluation of human chorionic gonadotropin as a  
1525        replacement for gonadotropin-releasing hormone in ovulation-synchronization  
1526        protocols before fixed timed artificial insemination in beef cattle. *Journal Animal  
1527        Science*. v.86(10), p.2539-2548. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1122>.
- 1528        Butler, W.R., 2003. Energy balance relationships with follicular development,  
1529        ovulation, and fertility in postpartum dairy cows. *Livestock Production Science*.  
1530        Volume 83, Issues 2–3, p.211-218. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(03\)00112-  
1531        X](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(03)00112-X).
- 1532        Buttrey, B.S., Burns, M.G., Stevenson, J.S., 2010. Ovulation and pregnancy  
1533        outcomes in response to human chorionic gonadotropin before resynchronized  
1534        ovulation in dairy cattle. *Theriogenology*. v.73, p.449-59.  
1535        <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.09.027>.
- 1536        Castro, N.A., Neves, P.M.A., Cestaro, J.P., Melo, V.O., Schneider, A., Pfeifer,  
1537        L.F.M., 2018. Use of prostaglandin F2 $\alpha$  as ovulatory stimulus for synchronizing dairy  
1538        cattle. *Research in Veterinary Science*. v.118, p.151-154.  
1539        <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.01.010>.
- 1540        Colazo, M.G., Ambrose, D.J., 2011. Neither duration of progesterone inserts nor  
1541        initial GnRH treatment affected pregnancy per timed-insemination in dairy heifers  
1542        subjected to a Co-synch protocol. *Theriogenology*. v.76, p.578-588.  
1543        <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0025>.

1544 De La Mata, J.J., Núñez-olivera, F., Cuadro, F., Bosolasco, D., de Brun, V., Meikle,  
1545 A., Bó, G. A., Menchaca, A., 2018. Impact of extending the proestrus length in an  
1546 oestradiol and progesterone-based oestrus synchronization program on follicular  
1547 and luteal development, uterine gene expression, and protein localization, and  
1548 pregnancy rates in beef heifers. *Reproduction, fertility and development*. v. 30(11),  
1549 p.1541-1552. <https://doi.org/10.1071/RD17473>.

1550 De Medeiros, S.F., Norman, R.J., 2008. Human choriogonadotropin protein core  
1551 and sugar branches heterogeneity: basic and clinical insights. *Human*  
1552 *Reproduction*. v.15, p.69-95. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn036>.

1553 De Rensis, F., Valentini, R., Gorrieri, F., Bottarelli, E., Lopez-Gatius, F., 2008.  
1554 Inducing ovulation with hCG improves the fertility of dairy cows during the warm  
1555 season. *Theriogenology*, v.69, p.1077-82.

1556 Diaz, T., Schmitt, E.J., De La Sota, R.L., Thatcher M.J., Thatcher, W., 1998. Human  
1557 chorionic gonadotropin induced alterations in ovarian follicular dynamics during the  
1558 estrous cycle of heifers. *Journal Animal Science*, v.76, p.1929-36.  
1559 <https://doi.org/10.2527/1998.7671929x>.

1560 Estes, K.S., Padmanabhan, V., Convey, E.M., 1977. Localization of gonadotropin  
1561 releasing hormone (GnRH) within the bovine hypothalamus. *Biology of*  
1562 *Reproduction*, v.17, p.706-11.

1563 Farin, C.E., Moeller, C.L., Mayan, H., Gamboni, F., Sawyer, H.R., Niswender, G.D.,  
1564 1988. Effect of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin on cell  
1565 populations in the ovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*, v.38, p.413-21.  
1566 <https://doi.org/10.1095/biolreprod38.2.413>.

1567 Fricke, P., Reynolds, L., Redmer, D., 1993. Effect of human chorionic gonadotropin  
1568 administered early in the estrous cycle on ovulation and subsequent luteal function  
1569 in cows. *Journal Animal Science*. v.71, p.1242-6.  
1570 <https://doi.org/10.2527/1993.7151242x>.

1571 Garcia-Ispuerto, I., De Rensis, F., Casas, X., Caballero, F., Serrano-Pérez, B.,  
1572 López-Gatius, F., 2019. Inducing ovulation with hCG in a five-day progesterone-  
1573 based fixed-time AI protocol improves the fertility of anestrous dairy cows under  
1574 heat stress conditions. *Theriogenology*. 124:65-68.  
1575 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.10.015>.

1576 Geary, T.W., Salverson, R.R., Whittier, J.C., 2001. Sincronização da ovulação  
1577 usando GnRH ou hCG com o protocolo CO-Synch em vacas de corte  
1578 amamentadas, *Journal of Animal Science*, Volume 79, Edição 10, Páginas 2536–  
1579 2541

1580 Hanlon, D.W., Jarrat, G.M., Davidson, P.J., Millar, A.J., Douglas, V.L., 2005. The  
1581 effect of hCG administration five days after insemination on the first service

1582 conception rate of anestrous dairy cows. *Theriogenology*. 63:1938–45.  
 1583 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.002>.

1584 Howard, H.J., Britt, J.H., 1990. Prostaglandin F<sub>2</sub> causes regression of an hCG-  
 1585 induced corpus luteum before day 5 of its life-span in cattle. *Journal Reproduction*  
 1586 *Fertility*. 90:245–53. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0900245>.

1587 Ireland, J.J., Roche, J.F., 1983. Growth and differentiation of large antral follicles  
 1588 after spontaneous luteolysis in heifers: changes in concentration of hormones in  
 1589 follicular fluid and specific binding of gonadotropins to follicles. *Journal Animal*  
 1590 *Science*. v.57, p.157-167. <https://doi.org/10.2527/jas1983.571157x>.

1591 Jameson, L.J., Hollenberg, A.N., 1993. Regulation of chorionic gonadotropin gene  
 1592 expression. *Endocrine reviews*, 14(2), 203–221. [https://doi.org/10.1210/edrv-14-2-](https://doi.org/10.1210/edrv-14-2-203)  
 1593 203.

1594 Jónsson, R., Blanke, M., Poulsen, N.K., Caponetti, F., Hojsgaard, S., 2011. Estrus  
 1595 detection in dairy cows from activity and lying data using on-line individual models.  
 1596 *Computers and electronics in agriculture*. v.76, p.6-15.  
 1597 <https://doi.org/10.1016/j.compag.2010.12.014>.

1598 Keskin, G., Yilmazbas-Mecitoglu, Gumen, A., Karakaya, E., Darici, R., Okut, H.,  
 1599 2010. Effect of hCG vs. GnRH at the beginning of the Ovsynch on first ovulation and  
 1600 conception rates in cyclic lactating dairy cows. *Theriogenology*. Volume 74, Issue 4,  
 1601 Pages 602-607. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.03.009>.

1602 Kinser, A.R., Gibson, M.F., Vincent, D.L., Scheffrahn, N.S., Kesler, D.J., 1983.  
 1603 Ovarian responses of seasonally anestrous ewes administered progesterone,  
 1604 PMSG, hCG and (or) GnRH. *Theriogenology*. 19:449–60.

1605 Lane, E.A., Austin, E.J., Crowe, M.A., 2008. Oestrous synchronization in cattle--  
 1606 current options following the EU regulations restricting use of oestrogenic  
 1607 compounds in food-producing animals: a review. *Animal Reproduction Science*,  
 1608 v.109, p.1-16. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.08.009>.

1609 Liu, T.C., Ho, C.T., Li, K.P., Chang, C.C., Chan, J.P., 2019. Human chorionic  
 1610 gonadotropin (hCG)-induced ovulation occurs later but with equal occurrence in  
 1611 lactating dairy cows: comparing hCG and gonadotropin-releasing hormone  
 1612 protocols. *Journal of Reproduction and Development*. v.65(6), p.507-514.  
 1613 <https://doi.org/10.1262/jrd.2019-037>.

1614 Macmillan, K.L., Thatcher, W., 1991. Effects of an agonist of gonadotropin-releasing  
 1615 hormone on ovarian follicles in cattle. *Biology of reproduction*. v.45, p.883-9.  
 1616 <https://doi.org/10.1095/biolreprod45.6.883>.

1617 Mann, G.E., Lamming, G.E., 1999. The influence of progesterone during early  
 1618 pregnancy in cattle. *Reproduction of Domestic Animal*. 34:269–74.

- 1619 Maubrigades, L.R., Almeida, A.M., Lazzari, J., Ferreira, R., Gasperin, B.G.,  
1620 Mondadori, R.G., 2022. Efeitos da gonadotrofina coriônica humana sobre a função  
1621 do corpo lúteo bovino. Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e  
1622 Extensão, v. 2, n. 14.  
1623 <https://periodicos.unipampa.edu.br/index.php/SIEPE/article/view/113306>.
- 1624 Moenter, S.M., Caraty, A., Karsch, F.J., 1990. The estradiol-induce surge of  
1625 gonadotropin-releasing hormone in the ewe. Endocrinology, v.123, p.1375-84.  
1626 <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.1999.tb01250.x>.
- 1627 Nascimento, A.B., Bender, R.W., Souza, A.H., Ayres, H., Araujo, R.R., Guenther,  
1628 J.N., Sartori, R., Wiltbank, M.C., 2013. Effect of treatment with human chorionic  
1629 gonadotropin on day 5 after timed artificial insemination on fertility of lactating dairy  
1630 cows. Journal Dairy Science. v.96, p.2873-2882. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5895>.  
1631
- 1632 Niswender, G.D., Schwall, R.H., Fitz, T.A., Farin, C.E., Sawyer, H.R., 1995.  
1633 Regulation of luteal function in domestic ruminants: new concepts. Recent Progress  
1634 in Hormone Research. 41:101–51. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-571141-8.50007-x>.  
1635
- 1636 Nogueira, E., Rodrigues, W.B., Silva, A.S, Borges, J.C., Silva, K.C., Anache, N.A.,  
1637 Bezerra, A.O., Leão, B.C.S., Rocha, N.A.S., Mingoti, G.Z., 2016. Aplicação de  
1638 GnRH em vacas com baixa ou sem expressão de estro avaliadas com bastões  
1639 marcadores aumenta a taxa de prenhez em vacas de corte submetidas a iatf.. In:  
1640 REUNIÃO ANUAL DA SBTE, 30, 2016, Foz do Iguaçu. Anais... Foz do Iguaçu:  
1641 Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. p. 240.
- 1642 Nogueira, E., Silva, M.R., Silva, J.C.B., Abreu, U.P.G., Anache, N.A., Silva, K.C.,  
1643 Cardoso, C.J.T., Sutovsky, P., Rodrigues, W.B., 2019. Timed artificial insemination  
1644 plus heat I: effect of estrus expression scores on pregnancy of cows subjected to  
1645 progesterone-estradiol-based protocols, Animal, v.15, p.1-8.  
1646 <https://doi.org/10.1017/S1751731119000442>.
- 1647 Pancarci, S.M., Jordan, E.R., Risco, C.A., Shouten, M.J., Lopes, F., Moreira, F.,  
1648 Thatcher, W., 2002. Use of estradiol cypionate in a pre-synchronized timed artificial  
1649 insemination program for lactating dairy cows. Journal Dairy Science. v.85, p.122-  
1650 131. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74060-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74060-5).
- 1651 Pereira, M.H.C., Wiltbank, M.C., Vasconcelos, J.L.M., 2016. Expression of estrus  
1652 improves fertility and decreases pregnancy losses in lactating dairy cows that  
1653 receive artificial insemination or embryo transfer. Journal Dairy Science. v.99,  
1654 p.2237-2247. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9903>.
- 1655 Pontes, G.A., Hesler, L.A., Grum, D.E., Mussard, M.L., Gasser, C.L., Day, M.L.,  
1656 2008. Decreasing the interval between GnRH and PGF2 $\alpha$  from 7 to 5 days and  
1657 lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows.

- 1658 Theriogenology. v.69, p.843-851.  
1659 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.12.011>.
- 1660 Rao, T.K.S., Kumar, N., Kumar, P., Chaurasia, S., Patel, N.B., 2013. Heat detection  
1661 techniques in cattle and buffalo. Veterinary World. v.6, p.363-369.  
1662 <https://doi.org/10.5455/vetworld.2013.363-369>.
- 1663 Richardson, B.N., Hill, S.L., Stevenson, J.S., Djira, G.D., Perry, G.A., 2016.  
1664 Expression of estrus before fixed-time AI affects conception rates and factors that  
1665 impact expression of estrus and the repeatability of expression of estrus in  
1666 sequential breeding seasons. Animal Reproduction Science. v.166, p.133-140.  
1667 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.013>.
- 1668 Rodrigues, W.B., Silva, A.S., Borges Silva, J.C., Anache, N.A., Silva, K.C., Cardoso,  
1669 C.J.T., Garcia, W.R., Sutovsky, P., Nogueira, E., 2019. Timed artificial insemination  
1670 plus heat II: Gonadorelin injection in cows with low estrus expression scores  
1671 increased pregnancy in progesterone/estradiol-based protocol. Animal. v.13(10),  
1672 p.2313-2318. <https://doi.org/10.1017/S1751731119000454>.
- 1673 Roelofs, J.B., Graat, E.A., Mullaart, E., Soede, N.M., Voskamp-Harkema, W., Kemp,  
1674 B., 2006. Effects of insemination-ovulation interval on fertilization rates and embryo  
1675 characteristics in dairy cattle. Theriogenology. v.66(9), p.2173-2181.  
1676 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.07.005>.
- 1677 Sá Filho, M.F., Ayres, H., Ferreira, R.M., Marques, M. O., Reis, E.L., Silva, R.C.,  
1678 Rodrigues, C.A., Madureira, E.H., Bó, G.A., Baruselli, P.S., 2010. Equine chorionic  
1679 gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a  
1680 norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos*  
1681 *indicus*) cows. Theriogenology. v.73, p.651-658.  
1682 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.004>.
- 1683 Santos, J.E.P., Thatcher, W.W., Pool, L., Overton, M.W., 2001. Efeito da  
1684 gonadotrofina coriônica humana na função lútea e no desempenho reprodutivo de  
1685 vacas leiteiras Holandesas em lactação de alta produção, Journal of Animal  
1686 Science, Volume 79, Edição 11. Páginas 2881– 2894.
- 1687 Schmitz, W., Kramer, M., Erhardt, G., Gauly, M., Driancourt, M.A., Holtz, W., 2017.  
1688 Pregnancy rate after fixed time artificial insemination of suckled beef cows subjected  
1689 to a cosynch protocol with either buserelin or hCG as ovulation inducing agent.  
1690 Livestock Science. v.206, p.141-147.
- 1691 Silva, K.S., Borges, J.C., Abreu, U.G.P., Batista, D.S.N., Anache, N.A., Bezerra,  
1692 A.O., Jara, J.P., Nogueira, E., 2016. Escore de cio avaliado com bastões  
1693 marcadores influencia as taxas de gestação de vacas nelore submetidas a  
1694 protocolos de inseminação artificial em tempo fixo. Animal Reproduction, v.13(3),  
1695 p.451.

1696 Souza, A.H., Gümen A., Silva, E.P. et al., 2007. Supplementation with estradiol-  
1697 17beta before the last gonadotropin-releasing hormone injection of the Ovsynch  
1698 protocol in lactating dairy cows. *Journal Dairy Science*. v.90(10), p.4623-4634.

1699 Stevenson, J.S., Portaluppi, M.A., Tenhouse, D.E., Lloyd, A., Eborn, D.R., Kacuba,  
1700 S., De Jarnette, J.M., 2007. Interventions After Artificial Insemination: Conception  
1701 Rates, Pregnancy Survival, and Ovarian Responses to Gonadotropin-Releasing  
1702 Hormone, Human Chorionic Gonadotropin, and Progesterone. *Journal of Dairy*  
1703 *Science*, 90(1), 331–340. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)72634-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72634-6).

1704 Stevenson, J.S., Tiffany, S.M., Inskeep, E.K., 2008. Maintenance of pregnancy in  
1705 dairy cattle after treatment with human chorionic gonadotropin or gonadotropin-  
1706 releasing hormone. *Journal of Dairy Science*. 91:3092–101.  
1707 <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1027>.

1708 Wallace, L.D., Breiner, C.A., Breiner, R.A., Spell, A.R., Carter, J.A., Lamb, G.C.,  
1709 Stevenson, J.S., 2011. Administration of human chorionic gonadotropin at embryo  
1710 transfer induced ovulation of a first wave dominant follicle, and increased  
1711 progesterone and transfer pregnancy rates. *Theriogenology*. v.75(8), p.1506-1515.  
1712 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.012>.

1713 Willians, C., Stancel, G., 1996. Estrogênios e progestogênios. In: Goodman H,  
1714 Gilman TL. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 8a ed., São Paulo: Manole,  
1715 p.1045-1067.

1716

1717

1718

1719

1720

1721

1722

1723

1724

1725

1726

1727

1728 **CAPÍTULO 4**

1729

1730 **1. CRONOGRAMA**

| Ano<br>2018/2019/<br>2020/2021/<br>2022 | 1º semestre<br>2018 |   |   |   |   | 2º semestre<br>2019 |   |   |   |   | 3º semestre<br>2019 |   |   |   |   | 4º semestre<br>2020 |   |   |   |   | 5º semestre<br>2020 |   |   |   |   | 6º semestre<br>2021 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |
|-----------------------------------------|---------------------|---|---|---|---|---------------------|---|---|---|---|---------------------|---|---|---|---|---------------------|---|---|---|---|---------------------|---|---|---|---|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--|
| Atividades                              | A                   | S | O | N | D | J                   | F | M | A | M | J                   | J | A | S | O | N                   | D | J | F | M | A                   | M | J | J | A | S                   | O | N | D | J | F | M | A | M | J | J |  |
| <b>Etapas já executadas</b>             |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |
| Experimento 1 – GnRH e hCG              |                     |   |   |   |   | X                   | X | X | X | X | X                   |   |   |   | X | X                   | X | X | X | X | X                   | X | X |   |   |                     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |
| Análise estatística                     |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   | X                   | X | X | X |   |                     |   |   |   |   |                     |   | X | X | X | X                   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |
| Redação e Qualificação                  |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |                     |   | X | X | X | X                   | X | X | X | X | X                   | X | X |   |   |   |   |   |   |   |   |  |
| <b>Etapas a executar</b>                |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |
| Análises Laboratoriais do sêmen         |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |
| Análise Estatística                     |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |
| Redação da dissertação                  |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |                     |   |   | X | X | X | X | X | X |   |   |  |
| Defesa da Dissertação                   |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |                     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |

1731

| Ano 2018/2019/2020/2021/2022    | 7-8º semestre<br>2022 |   |   |   |   | 1º semestre<br>2023 |   |   |   |   |   |
|---------------------------------|-----------------------|---|---|---|---|---------------------|---|---|---|---|---|
| Atividades                      | A                     | S | O | N | D | J                   | F | M | A | M | J |
| Análises Laboratoriais do sêmen | X                     | X | X |   |   |                     |   |   |   |   |   |
| Análise Estatística             |                       |   | X | X | X |                     |   |   |   |   |   |
| Redação da dissertação          | X                     | X | X | X | X | X                   | X |   |   |   |   |
| Defesa da dissertação           |                       |   |   |   |   |                     | X |   |   |   |   |

1732

1733

1734

1735

1736

## 2. JUSTIFICATIVAS

1. A execução deste projeto permitirá que novas alternativas hormonais para inseminar vacas em tempo fixo estejam disponíveis para os profissionais que atuam no mercado e para difusão tecnológica, via órgãos de fomento. Além disso, os resultados oriundos dessa proposta científica permitirão que o sistema de produção de gado de corte e leite esteja mais conectado com as exigências mercadológicas e com uma produção mais sustentável e menos onerosa.
2. Inovação dos protocolos de IATF utilizados no Brasil, pois poderá ser recomendada utilização de novos protocolos e hormônios para melhora de índices de prenhez em vacas com utilização de sêmen convencional ou sexado.



1768

## ANEXOS

1769

1770

## 1. CÓPIA DO PROJETO APROVADO

1771



TÍTULO:

**Estratégias de aumento de prenhez em protocolos de Inseminação Artificial em Tempo Fixo com avaliação de expressão de cio, Indutores de ovulação e qualidade do sêmen congelado.**

RESUMO

Apesar dos evidentes avanços na produção de gado de corte e leite, conferidos pelo desenvolvimento comercial da IATF, a taxa de prenhez média esperada é estimada entre 40 a 50%, e diversos fatores podem estar relacionados a esses índices, destacando-se aqueles inerentes à fêmea, como o anestro pós-parto e a condição corporal no início dos protocolos. Associados a isso, outros fatores também influenciam esses resultados, como aqueles inerentes à qualidade do sêmen utilizado nos programas, tais como os padrões de movimento espermático, integridade de membrana plasmática ou biomarcadores e dose inseminante praticada. Dessa forma, a avaliação espermática laboratorial tem o intuito de analisar o potencial de fertilidade de um indivíduo, determinar e estabelecer características confiáveis, que possam ser utilizadas como indicadores de fertilidade. Os protocolos baseados em Progesterona e Estradiol (Benzoato- BE e Iou Clonato- CE), associado a prostaglandina e ECG são particularmente efetivos em vacas em anestro, que representa a maioria das vacas que recebem IA no Brasil, e usando esses protocolos, os produtores do Brasil geralmente inseminam todas as vacas, independentemente da vaca expressar estro, mesmo com estudos indicando que a expressão de estro perto de IATF está associada a maior fertilidade. Assim, a detecção de estro poderia melhorar a fertilidade ou direcionar a gestão da IATF com o uso de sêmen sexado ou touros desejados. Assim, esse projeto busca avaliar estratégias de melhora nas taxas de prenhez de vacas de corte ou leite, submetidas a protocolos de IATF com sêmen convencional ou sexado, com avaliações simples de cio e aplicação de indutores adicionais de ovulação ou momentos diferenciados de IA e a validação de parâmetros observados em avaliações seminais com a realização de 5 experimentos. Como resultados de projetos anteriores do autor proponente, com inseminação e avaliação seminal, foram identificados parâmetros que mostram correlações com a fertilidade (SANCHES, et al., 2017), e a partir destes será estabelecido um índice de fertilidade a ser aplicado nas amostras a serem avaliadas e utilizadas em IATF na presente proposta, dando sequência a experimentos que já demonstraram melhora nas taxas de prenhez. Além da utilização e validação dos parâmetros seminais identificados, também foi

Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação  
Cidade Universitária, s/n, Caixa Postal 549  
CEP 79070-900 Campo Grande-MS  
<http://www.propp.ufms.br>



validada a estratégia de avaliação de cio em vacas submetidas a IATF com aplicação de indutores adicionais de ovulação (GnRH) para aumento de prenhez (IATF + CIO-EMBRAPA), e o que está sendo buscado neste projeto é a utilização de indutores adicionais, ou momentos diferenciados de IA, para desenvolvimento de protocolos com melhores resultados de prenhez e melhor relação benefício/custo, inclusive com utilização de IATF em vacas de corte e leite, com sêmen sexado, que mostra resultados inferiores em protocolos tradicionais.

## 1. INTRODUÇÃO

A incorporação de programas reprodutivos ajudam a otimizar os resultados e rentabilidade dos rebanhos, assim, a Inseminação artificial (IA), bem como a Inseminação artificial em tempo fixo (IATF), permitem maior ganho genético e econômico (BARUSELLI et al., 2018). Em protocolos de IATF, como regra, todas as vacas aptas são inseminadas, independentemente se o animal expressou o estro, embora estudos mostrem que a expressão do estro próximo a IATF está associada a maior fertilidade (PANCARCI et al., 2002; KASIMANICKAM et al., 2005; SOUZA et al., 2007).

Vacas que não apresentam cio durante o protocolo tendem a ter menor taxa de ovulação e, consequentemente, menor probabilidade de engravidar (SILVA et al., 2016). Ademais, estudos indicam uma diminuição na perda de gestação em vacas que exibem estro durante protocolos de IATF, sugerindo que o ambiente hormonal que produz a falta de expressão de estro também produz alterações uterinas que diminuem a probabilidade de manutenção da gestação no período crítico entre o primeiro e o segundo mês (CERRI et al., 2004; GALVÃO et al., 2004; PEREIRA et al., 2014; RICHARDSON et al., 2016).

Uma das grandes vantagens em se verificar a expressão de cio está em poder identificar o melhor momento para a IA, em relação a ovulação, uma vez que a vida útil do óvulo bovino é curta e esse intervalo é crucial para melhorar a fertilidade do rebanho. Conforme Roelofs et al. (2006), o intervalo de tempo no qual as vacas foram inseminadas está diretamente ligado às taxas de fertilização e qualidade embrionária. Assim, a falha na identificação do cio resulta em grandes perdas econômicas para o sistema de produção, reduzindo a taxa de serviço e rendimento do rebanho (RAO et al., 2013).

Diante disso, novas tecnologias estão sendo desenvolvidas e implementadas em programas de IATF para melhorar o controle do estro e maior sucesso no número e qualidade de gestação (HOLMAN et al., 2011; JÖNSSON et al., 2011; RICHARDSON et al., 2016). Entre elas, o uso de indutores da ovulação em fêmeas classificadas segundo o

Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação  
Cidade Universitária, s/n, Caixa Postal 549  
CEP 79070-900 Campo Grande-MS  
<http://www.propp.ufms.br>

1772

1773

1774

1775

1776

1777



escor de remoção de tinta na cauda, sendo aplicados naquelas com baixa expressão de cio (ESCT 1 e 2) no momento da inseminação (NOGUEIRA et al., 2016). O GnRH, usado como indutor da ovulação, quando administrado por via intramuscular, induz uma onda de LH semelhante a pré-ovulatória em 2 horas e a ovulação entre 26 e 30 horas, respectivamente. Conforme demonstrado por Sá Filho et al. (2010), a utilização de GnRH na IATF, em fêmeas com baixa ou sem expressão de cio, melhora a sincronização da ovulação e taxas de prenhez.

Estudos também relataram recentemente que as taxas de prenhez poderiam ser aumentadas se fosse diminuído o período de crescimento do folículo dominante ovulatório e prolongado a duração do proestro (BRIDGES et al., 2008; COLAZO e AMBROSE, 2011; BÔ et al., 2016). Esse novo protocolo, chamado J-Synch, promove modificações durante o proestro e define um perfil endócrino pré-ovulatório, que está positivamente associado com um corpo lúteo (CL) mais competente e uma melhora do ambiente uterino. Assim, se mostra uma alternativa promissora para protocolos de IATF que utilizam sêmen sexado, que possuem menores taxas de prenhez em relação aos protocolos com sêmen convencional (DE LA MATA et al., 2016).

Bo et al. (2018), utilizaram o protocolo J-Synch, com auxílio de bastão marcador para detecção de cio, com sêmen sexado e avaliaram as taxas de prenhez de diferentes touros usando sêmen convencional e SexedULTRA® em programas IATF, sendo esse último método de sexagem menos traumático aos espermatozoides. Apesar de obterem taxas maiores com utilização de sêmen convencional, conseguiu-se aumentar as taxas esperadas para o sêmen sexado.

O sêmen utilizado é outro fator determinante para a melhora nas taxas de prenhez nas técnicas de Inseminação Artificial (IA) e Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) (NOGUEIRA et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2014), fato que acaba limitando alguns resultados pela falta de preditores precisos de fertilidade em touros (BERRY et al., 2014). No Brasil, atualmente a maioria das metodologias de avaliação de sêmen de touros, baseadas em microscopia, classifica somente características exteriores nos espermatozoides, que garantem o alcance de padrões mínimos de qualidade reprodutiva (Manual CBRA, 1998).

Assim, seria interessante determinar variáveis de sêmen congelado que de fato melhorem as taxas de gestação ao final dos programas de IA. Kems et al. (2018), relataram o uso da citometria de fluxo baseada em imagem (IBFC) para documentar os fluxos de zinco e suas alterações durante a capacitação *in vitro* (IVC) de espermatozoides de



touros e humanos, mostrando um novo papel dos íons de zinco durante a capacitação e a fertilização.

Tais descobertas representam uma mudança fundamental na compreensão da fertilização de mamíferos, abrindo caminho para uma análise de sêmen mais precisa para melhorar a metodologia de fertilização *in vitro* (FIV) e Inseminação Artificial (IA). Esses achados são consistentes com outros estudos que relatam homens férteis com níveis aumentados de Zn no plasma seminal em comparação com homens inférteis (COLAGAR et al., 2009; ZHAO et al., 2016). Otimização do sêmen Zn<sup>2+</sup> e / ou níveis de proteína (s) contendo zinco poderiam, assim, melhorar os resultados da IA no gado.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Validar técnicas e procedimentos para aumento das taxas de prenhez em protocolos de IATF em vacas de corte e leite.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Validar os parâmetros de qualidade em sêmen congelado de alto e baixo poder fecundante, identificados em projeto de pesquisa anterior;
- 2- Avaliar a estratégia da utilização da avaliação de expressão de cio, de acordo com a presença de Corpo Lúteo (CL), para aumento de prenhez de IATF;
- 3- Avaliar a estratégia da utilização da avaliação de expressão de cio, com diferentes indutores de ovulação e horários de inseminação para aumento de prenhez de IATF;
- 4- Avaliar a estratégia da utilização da avaliação de expressão de cio e aplicação de indutores adicionais de ovulação, para utilização de sêmen sexado em IATF.

## 3. METODOLOGIA

Este projeto de pesquisa envolverá a execução de cinco experimentos, cuja metodologia individual está descrita a seguir. Os experimentos serão realizados em propriedades rurais comerciais, com Contrato de Parceria assinado com a Embrapa e Instituições participantes, no Pantanal e Planalto do MS, bem como nas fazendas experimentais da Embrapa:

1778  
1779  
1780  
1781  
1782  
1783  
1784  
1785  
1786  
1787  
1788  
1789  
1790



Exp. 1- Validação dos parâmetros de sêmen congelado através de testes laboratoriais.

Serão avaliadas doses de sêmen congeladas compradas de estabelecimentos comerciais visando a identificação dos parâmetros de fertilidade identificados em projeto anterior (Edital Chamada FUNDECT/CNPq N° 05/2013 – DCR: Inovação, Impacto da qualidade do sêmen, e eficiência bio-econômica de estratégias pós-inseminação em protocolos de Inseminação Artificial em Tempo Fixo no Mato Grosso do Sul).

As amostras serão avaliadas no laboratório da UFMS (avaliação de sêmen), realizados os seguintes testes laboratoriais:

- 1- Motilidade e vigor ao descongelamento, concentração e análise morfológica do sêmen congelado
- 2- Teste de Termo-Resistência Rápido
- 3- Citometria de fluxo (integridade de membrana, Ubiquitina, Aggrosome (AGG), Proteína Pós-Acrosomal (PAWP), polarização mitocondrial)
- 4- Análise Computadorizada do sêmen (CASA)
- 5- Avaliação da capacitação espermática através da liberação de Zinco

Após as análises, será utilizado um Índice e classificadas as partidas de sêmen de acordo com o poder fecundante.

O Índice a ser validado será obtido a partir de Sanches et al. (2017) e Nogueira et al. (2018), associado a avaliação de novos biomarcadores de qualidade seminal (Ubiquitina, AGG, PAWP)

Exp. 2- Utilização de sêmen congelado em IATF com maior Índice de predição de fertilidade, para avaliação de taxa de prenhez e perda embrionária.

A partir das doses identificadas no Exp 1, como maior ou menor predição de fertilidade, serão inseminadas em tempo fixo 500 vacas multiparas Nelore, para validação do índice de predição de fertilidade, com o seguinte protocolo:

Os animais serão avaliados ginecologicamente em dia aleatório do ciclo estral (D0) e receberão dispositivo Intravaginal de P4 (Cronipress® Mono Dose M-24, Biogênese Bagó, Paraná, Brasil) e administração de 2 mg de BE (Estrogin®; Biofarm, São Paulo, Brasil). No Dia 8, o implante será retirado e aplicado 1 mg de ciplonato de estradiol- (ECP®; Zoetis, Brasil), 150µg de d-cloprostenol (Proliset®, Arsa, Argentina) e 300 UI de eCG (Folligon®



5000UI, MSD, São Paulo, Brazil). No momento da retirada dos implantes, todas as vacas serão marcadas na região sacro-caudal com bastões de tinta (Raid-Max/RAIDEX, Germany). No dia 10, 50 horas após a retirada do implante, as vacas serão inseminadas. A taxa de expressão de cio (ESCT), avaliada no momento da IATF, classificada de acordo com Silva et al. (Animal Reproduction, 2016): 1- sem expressão de cio; 2- baixa expressão de cio; 3- alta expressão de cio. Animais com ESCT 1 e 2 receberão 1 ml de GnRH.

Será realizado o diagnóstico de gestação aos 21 dias (com ultrassonografia doppler), 35, 60 e 90 dias (com ultrassonografia modo B), para avaliação das perdas embrionárias e fetais, de acordo com a fertilidade dos touros.

Serão utilizadas fichas para controle das inseminações a campo, distribuídas entre os inseminadores, contendo as seguintes informações:

- Nome ou número do touro; Partida (toursoluções em biotecnologias reprodutivas para os novos sistemas de produção do Brasil) utilizada; Categoria animal (multipara x primipara); Inseminador; ECC.

Exp. 3- Uso da PGF em início de protocolo de IATF, e avaliação da expressão de cio (ESCT) e prenhez em protocolos de IATF com uso de GnRH.

Para avaliar o efeito da ausência do CL no dia da retirada do implante sobre a expressão de cio e taxa de prenhez, sem aumento do manejo dos lotes, será realizado o experimento a seguir:

Trat Controle: 300 vacas serão submetidas ao mesmo protocolo base do Exp 2.

Trat PGF no início: 300 vacas serão submetidas ao mesmo protocolo base do Exp 2, com aplicação de dose de PGF2a no D0 do protocolo.

Exp. 4- Uso de diferentes indutores de ovulação ou atraso na IATF com avaliação da expressão de cio (ESCT) em protocolos de IATF.

Neste experimento, será avaliado o indutor de ovulação HCG, que tem efeitos diretos, sem a necessidade de estoque endógeno de GnRH dos animais, que pode estar comprometido, devido as condições pós parto e de baixa condição corporal. O hormônio supracitados, serão confrontados com GnRH, ou animais controle, que não receberão aplicação de indutores adicionais além do Ciplonato de Estradiol.

Trat Controle: 300 vacas serão submetidas ao mesmo protocolo base do Exp 2, porém sem aplicação de GnRH nas vacas de ESCT 1 e 2, no momento da IATF.

1791  
1792  
1793  
1794  
1795  
1796  
1797  
1798  
1799  
1800  
1801  
1802



Trat GnRH: 300 vacas – semelhante ao trat Controle, porém com aplicação de GnRH nas vacas de ESCT 1 e 2, no momento da IATF.

Trat HCG: 300 vacas - trat Controle, com aplicação de HCG (1500 UI) nas vacas com ESCT 1 e 2 no momento da IATF.

Trat Atraso- Animais com ESCT 1 e 2, serão inseminados 60-72 após a retirada de Implantes

Exp. 5- Escore de remoção de tinta na cauda (ESCT) como ferramenta alternativa para aumentar a taxa de prenhez do sêmen sexado à IATF.

Para realização deste experimento 1000 fêmeas da raça Nelore (*Bos indicus*) e cruzadas (*Bos taurus* x *Bos indicus*) serão submetidas a protocolos de IATF com sêmen convencional e sexado e avaliadas quanto à expressão de cio no momento da inseminação.

Será utilizado o protocolo com melhor resultado definido nos experimentos anteriores, e avaliadas as diferenças de prenhez com sêmen sexado e convencional, de acordo com as diferentes notas de expressão de cio, e para tal, os animais serão distribuídos em dois tratamentos, em um delineamento experimental inteiramente ao acaso. Sendo G1= fêmeas inseminadas com sêmen convencional (n=500) e G2= fêmeas inseminadas com sêmen sexado (n= 500).

O sêmen convencional e sexado adquiridos serão avaliados com base nos parâmetros sugeridos no Exp. 1. para predição da fertilidade.

#### Ultrassonografia

Serão avaliados no exp 2-5 por ultrassonografia transretal (Mindray DP 20 vet), os diâmetros dos folículos pré-ovulatórios no dia da IATF, e o diâmetro do CI, 7 dias após a IATF, bem como o diagnóstico de gestação realizado 30-40 dias após a IATF ou término do período de estação de monta.

Será avaliada a luteinização como resultados dos protocolos com diferentes indutores de ovulação e expressão de cio, com ultrassonografia Doppler, 7 dias após a IATF.

No experimento 5 será realizado o diagnóstico ultrassonográfico do sexo fetal aos 60 dias de gestação.

#### Coleta de Sangue e dosagem de progesterona (P4)

Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação  
Cidade Universitária, s/n, Caixa Postal 549  
CEP 79070-900 Campo Grande-MS  
<http://www.propp.ufms.br>



Em cada experimento de IATF, serão coletadas em uma porcentagem das vacas Inseminadas (20%) amostras de sangue por venopunção (veia cocóigea) em tubos de 10 mL de no D17, a partir do momento da avaliação do CL. O sangue será deixado em repouso para coagulação à temperatura ambiente e centrifugado a 2.000 x g durante 20 min. O soro colhido será armazenado a -20 ° C até que as concentrações séricas de progesterona sejam determinadas por Radioimunoensaio (RIA).

As concentrações séricas de progesterona serão analisadas no FMVA Araputuba-UNESP Campus, Laboratório de Endocrinologia, Departamento de Apoio ao Campo, Produção e Saúde Animal (DAPSA), em amostras de soro utilizando um kit RIA de anticorpo-tubo (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA).

#### Avaliação do sêmen - Citometria de fluxo, CASA.

Nos laboratórios da UFMS, será determinada a qualidade espermática, realizados testes de motilidade e vigor ao descongelamento, concentração e análise morfológica do sêmen congelado, análise computadorizada do sêmen (CASA) e citometria de fluxo, de acordo com as metodologias descritas a seguir.

A avaliação da motilidade e vigor será obtida mediante a deposição de uma gota de sêmen sobre lâmina aquecida (35 a 37°C) e recoberta por lamínula, para observação em microscopia óptica em aumentos de 20x, sendo os valores de motilidade expressos em porcentagem (MANUAL, 2013). A concentração espermática foi determinada em hematócrito, na diluição de 1:100, sendo o resultado expresso em células espermáticas/mL (MANUAL, 2013).

A morfologia das células espermáticas será avaliada em preparação úmida e microscópio de contraste de fase sob imersão, com aumento de 1.000x, de acordo com a metodologia de Barth e Oke (1989).

A cinética espermática será determinada pelo equipamento Computer-assisted semen analysis (CASA), modelo SCA- SPERM CELL ANALYZER, previamente ajustado (setup) para análise de sêmen bovino. Serão utilizados dois microlitros de sêmen e selecionados no mínimo sete campos para a leitura e análise dos parâmetros: motilidade total (%; MT), motilidade progressiva (%; MP), velocidade média (µm/s; VAP), velocidade retilínea (µm/s; VSL), velocidade curvilínea (µm/s; VCL), amplitude lateral de cabeça (µm; ALC), linearidade (%; LIN), retilinearidade (%; STR).

No aparelho Cytotex (Beckman Coulter ®), será avaliada por citometria de fluxo, a

Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação  
Cidade Universitária, s/n, Caixa Postal 549  
CEP 79070-900 Campo Grande-MS  
<http://www.propp.ufms.br>

1803  
1804  
1805  
1806  
1807  
1808  
1809  
1810  
1811  
1812  
1813





Integridade estrutural da membrana plasmática e polarização mitocondrial, utilizando, respectivamente, as sondas fluorescentes PI (iodeto de propídeo) e JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazoli-carbocianina iodide), além de novos biomarcadores, como Ubiquitina, Aggressome e avaliação de influxo de Zn.

Análises estatísticas - Os resultados de percentagem de clivagem e de blastocisto, bem como de concepção serão analisados através do programa computacional Proc Logistic incluído no Statistical Analysis System 9.1.3 (SAS Institute Inc., 1999). Para os resultados de concepção das vacas inseminadas em IATF será considerada a resposta binária (prenhe ou vazia) e será realizada a análise de regressão logística múltipla, admitindo-se o nível de significância de 5%, e análise de correlação múltipla entre as variáveis (fertilidade da partida, resultados dos testes laboratoriais e concentrações hormonais), tendo como fontes de variação os tratamentos, fazenda, inseminador, EOC e interações.

#### 4. REFERÊNCIAS

BÓ, G.A.; HUGUENINE, E.; DE LA MATA, J.J.; TSCHOPP, J.C.; RACCA, D.; FILIPPI, L.; BLENGINO, G.; PEREZ WALLACE, S.; VENERANDA, G.; DE CARNERIO, R.L.R.; MENCHACA, A. Utilização de semen sexado em rebanhos de leite e corte. In: 8º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2018, LONDRINA. ANAIS DO 8º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2018.

BÓ, G.A.; DE LA MATA, J.J.; BARUSELLI, P.S.; MENCHACA, A. Alternative programs for synchronizing and re-synchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology* 86:388- 396, 2016.

BRIDGES G.A.; HESLER L.A.; GRUM D.E.; MUSSARD M.L.; GASSER C.L.; AND DAY M.L. Decreasing the interval between GnRH and PGF2α from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology* 69: 843- 51, 2008.

COLAGAR, A.H.; MARZONY, E.T.; CHAICHI, M.J. Os níveis de zinco no plasma seminal estão associados à qualidade espermática em homens férteis e inférteis. *Nutr. Res.* 29, 82-88 (2009).



COLAZO M.G. AND AMBROSE D.J. 2011. Neither duration of progesterone Insert nor Initial GnRH treatent affected pregnancy per timed-insemination in dairy heifers subjected to a Co-synch protocol. *Theriogenology* 76: 578-588.

DE LA MATA J.J., NUÑEZ-OLIVERA F., CUADRO F., BOSOLASCO D., DE BRUNO V., MEIKLE A., BÓ GA MENCHACA A. 2018. Impact of extending the proestrus length in an oestradiol and progesterone-based oestrus synchronization program on follicular and luteal development, uterine gene expression, and protein localization, and pregnancy rates in beef heifers. *Reprod Fertil Dev*, Online Early <https://doi.org/10.1071/RD17473>.

KERNS, K; ZIGO, M; DROBNIS, E.Z.; SUTOVSKY, M.; SUTOVSKY, P. Zinc ion flux during mammalian sperm capacitation. *NATURE COMMUNICATIONS* | (2018) 9:2051.

MANUAL para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2013, 49p.

NOGUEIRA, E.; RODRIGUES, W.B.; SILVA, A. S.; BORGES SILVA, J. C.; SILVA, K. C.; ANACHE, N. A.; BEZERRA, A. O.; LEÃO, B.C.S.; ROCHA-FRIGONI, NATHALIA ALVES DE SOUZA; MINGOTI, G.Z. Aplicação de gnrh em vacas com baixa ou sem expressão de estro avaliadas com bastões marcadores aumenta a taxa de prenhez em vacas de corte submetidas a iatf. In: XXX Reunião Anual da SBTE, 2016, FOZ DO IGUAÇU. ANAIS DA XXX REUNIÃO ANUAL DA SBTE, 2016.

NOGUEIRA, E.; RODRIGUES, W.B.; SANCHES, C.; COSTA E SILVA, E. V.; POTIENS, J. R.; BORGES SILVA, J. C.; SUTOVSKY, P. Identification of seminal parameters predictive of conception rates in Angus and Nelore bulls used in TAI. In: International Bull Fertility Conference, 2018, Westport. Proceedings of the International Bull Fertility Conference. Cambridge: Cambridge University Press, 2018. v. 9. p. 324-324.

SANCHES, C.; RODRIGUES, W.B.; POTIENS, J. R.; BORGES SILVA, J. C.; ROSSIGNOLO, E. A. A.; BARBOSA, F. B.; COSTA E SILVA, E. V.; NOGUEIRA, E. Qualidade do sêmen criopreservado e fertilidade de fêmeas bovinas em programas de IATF: dados preliminares. In: 2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA), 2017, Uberlândia. 2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA). Curitiba: Embrapa Pantanal, v. 1. p. 171-174, 2017.

1814  
1815  
1816  
1817  
1818  
1819  
1820  
1821



SILVA, K. S.; BORGES SILVA, J. C.; ABREU, U. G. P.; BATISTA, D. S. N.; ANACHE, N. A.; BEZERRA, A. O.; JARA, J. P.; NOGUEIRA, E. Escore de cio avaliado com bastões marcadores influencia as taxas de gestação de vacas nelore submetidas a protocolos de inseminação artificial em tempo fixo. *Animal Reproduction*, v. 13, n. 3, p. 451, 2016.

RODRIGUES, W.B.; SILVA, A.S.; BORGES SILVA, J.C.; ANACHE, N.A.; SILVA, K.C.; CARDOSO, C.J.T.; GARCIA, W.; ABREU, U.; NOGUEIRA, E.. Tai plus heat II: GnRH application in cows with low or no estrus expression increases the pregnancy rate in Bos indicus cows submitted P4/estradiol-based tai protocols. *ANIMAL (CAMBRIDGE. ONLINE)*, 2018.

ZHAO, J. et al. Níveis de zinco no plasma seminal e sua correlação com a infertilidade masculina: uma revisão sistemática e metanálise. *Sol. Rep.* 6, 22386 (2016).

#### 5. EQUIPE:

##### 1. Érikis Nogueira

Pesquisador A da EMBRAPA Pantanal – Corumbá, MS.

CPF: 686.743.791-68

Email: [erikis.nogueira@embrapa.br](mailto:erikis.nogueira@embrapa.br)

##### 2. Karine Casanova Silva

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - FAMEZ

CPF: 037.863.651-05

Email: [karine\\_casanova@hotmail.com](mailto:karine_casanova@hotmail.com)

##### 3. Nathália Albaneze Anache

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - FAMEZ

CPF: 727.942.161-04

Email: [nathaliaanache@hotmail.com](mailto:nathaliaanache@hotmail.com)

##### 4. Juliana Correa Borges Silva

Pesquisadora EMBRAPA Pantanal – Corumbá, MS.

CPF: 269.659.598-43

Email: [juliana.correa@embrapa.br](mailto:juliana.correa@embrapa.br)

Pré-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação  
Cidade Universitária, s/n, Caixa Postal 549  
CEP 79070-900 Campo Grande-MS  
<http://www.propp.ufms.br>



#### 5. Fabiana Andrade Melo Sterza

Docente na Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul – UEMS, Aquidauana.

CPF: 023.919.279-67

Email: [fabiana.sterza@uems.br](mailto:fabiana.sterza@uems.br)

#### 6. Eliane Viana Costa e Silva

Docente na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFMS – FAMEZ, Campo Grande, MS.

CPF: 500.697.216-53

Email: [eliane.silva@ufms.br](mailto:eliane.silva@ufms.br)

#### 6. CRONOGRAMA

| Atividades                     | Anos |    |    |    |
|--------------------------------|------|----|----|----|
|                                | 1º   | 2º | 3º | 4º |
| Treinamento análise de sêmen   | x    |    |    |    |
| Experimento 1                  | x    |    |    |    |
| Experimento 2                  |      | x  |    |    |
| Experimento 3                  |      | x  |    |    |
| Experimento 4                  |      |    | x  |    |
| Experimento 5                  |      |    | x  |    |
| Análise de dados e estatística |      |    | x  |    |
| Redação                        |      |    |    | x  |

#### 7. ORÇAMENTO

Os recursos para o projeto serão solicitados as fontes de financiamento EMBRAPA e CNPQ.

|                | Orçamento  | Quantidade | Total    |
|----------------|------------|------------|----------|
| Materiais      | (unitário) |            | (R\$)    |
| Hormônios IATF |            |            |          |
| Cronipress®    | R\$ 12     | 2.700      | 32.400   |
| Estrogin®      | R\$ 19,70  | 54         | 1.063,80 |

Pré-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação  
Cidade Universitária, s/n, Caixa Postal 549  
CEP 79070-900 Campo Grande-MS  
<http://www.propp.ufms.br>

1822  
1823  
1824  
1825  
1826  
1827  
1828  
1829  
1830  
1831  
1832  
1833

## 2. NORMAS DA REVISTA

**Revista:** Animal Reproduction Science.

### PREPARATION

#### *Editorial Structure and Preliminary Assessment*

The Editor-in-Chief, who decides whether the Manuscripts fit the scope of manuscripts published in this journal, firstly evaluates manuscripts. Associate Editors also make a preliminary evaluation of the Manuscript, with or without the involvement of other Editorial Board members, and then decide whether or not the Manuscript deserves to be sent out for peer review. These preliminary assessments made by the Editorial Board are based on the scope, novelty, interest, potential contribution to the field, and quality of science and narrative (in the case of review articles). Manuscripts that are not consistent with Journal standards will be returned to the author without peer review.

#### **Queries**

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

#### **Peer review**

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of one independent expert reviewer to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review](#).

#### **Appeals**

In case of a rejection decision, authors are allowed to submit an appeal, which may be considered by the Editorial Board. Priority of appeals is less than that of new submitted Manuscripts with regard to the Journal's workload. Only one appeal is permitted per Manuscript. If the authors wish to submit an appeal, they must provide evidence that substantial errors of fact and/or biases were made during the reviewing process; a decision will only be reversed if the Editorial Board is convinced that the original decision was a mistake. Should an appeal merit consideration, the Editor-in-Chief will request the authors to provide a response to the reviewers' and Associate Editors' comments and will be then sent out for further peer review. Decisions after submitting an appeal are made by the Editor-in-Chief and are final.

#### **Article structure**

Manuscripts should have numbered lines (continuous numbering across pages) with wide margins and double spacing throughout (i.e., also for abstracts, footnotes and references). Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. In the text no reference should be made to page numbers; however, if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text. The structure of the manuscript must be Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements, Author Contribution Statement, Competing interests statement, References, Figure legends and Tables (if the latter are provided with the Main text file).

Tables and Figures should be inserted separately at the end of the manuscript. Furthermore, the format used for the Table and Figure legends should be consistent with that of manuscripts published in this journal.

#### **Abstract**

The ABSTRACT can be no longer than 250 words in length and details about what should be included in the ABSTRACT are described subsequently in this document.

#### **Introduction (labelled with the number 1)**

State the objectives of the research and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

The introduction "sets the scene" for the research. Do not over-reference statements; two or three key references should suffice unless each adds something specific. The introduction should not normally be more than 500 words (approximately two manuscript pages).

#### *Materials and Methods (labelled with the number 2)*

Provide sufficient details to allow the research to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

#### *Description of analytical methods*

The description of analytical methods (e.g., hormone analysis, immunohistochemistry) must include information on quality assessment and method validation for the respective laboratory where sample analysis has been performed.

#### *Gene names*

Authors must use standard gene names, as provided by HGNC. Gene names must be italicized. If the case of mammalian species and if gene names refer to rodent species, they must be upper case (i.e. HspA1A); if they refer to non-rodent species they must be written in capitals (e.g., HSPA1A). If they refer to other species, they must be written lower case (e.g., hspa1a). Protein names are written in capitals and are not italicized.

#### *Quantitative PCR*

If authors have used quantitative PCR, the Methods section must be written following Bustin et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Use of terminology - relative abundance of mRNA transcripts as compared with the abundance of mRNA for a reference gene(s).

Experiments. Clin Chem 2009; 55: 611-622. The authors should also ensure that the following information is provided:

Protocol for DNA/RNA extraction, including quantitation and determination of purity; Reverse transcription: amount of RNA, concentration of all reagents: primers concentration (either random primers or oligonucleotides), reverse transcriptase and master mix components; For qPCR: sequence of Forward and Reverse primers, amplicon size, accession number of Genbank; Thermocycler parameters (i.e. denaturation, annealing and extension steps, number of cycles, melting curves); Validation of PCR products; Non-template controls for Reverse Transcription and qPCR should be included in all reactions; and Data analysis: details for the quantitative or relative determination.

#### *Semen analysis*

Sperm motility must be evaluated with a computer-assisted sperm analysis - failure to do so will result in the rejection of manuscripts. Also sperm membrane integrity should be assessed using double-fluorochrome staining and fluorescence microscopy or flow cytometry. Acrosome integrity should also be evaluated with fluorochrome staining where possible. In addition sperm cryopreservation should be preferentially conducted with a controlled-rate freezer to ensure repeatability and standardization. Exceptions to these requirements will be considered.

#### *Flow cytometry*

When performed, the Methods section should provide technical details for flow cytometry experiments, following the recommendations set by the International Society for Advancement of Cytometry (Lee J et al. MIFlowCyt: The minimum information about a flow cytometry experiment. Cytometry A 2008; 73: 926-930). Amongst others, the following information should be provided: technical specifications of the equipment, laser wavelength, BP and LP for filters, sheath rate, how populations have been gated, concentration of cells during analysis, calibration of the equipment, linear or logarithmic representation, number of technical replicates, data compensation and software used to analyze histograms. The Editorial Board may request, at any point, the authors to provide the original files (.FCS/.LMD) or the histograms and dot-plots.

#### *Use of antibodies*

1840

1841



Validation of antibodies through peptide blocking experiments is required when immunoblotting (Western blot), immunofluorescence, immunohistochemistry or immunocytochemistry are performed. The authors may cite a previous reference in which the specificity of the antibody used for the species reported in the submitted Manuscript has been validated and published.

#### *Statistical analyses*

Authors must provide enough details on how data were evaluated and which statistical package was used to conduct that evaluation. If linear models are used, authors should have previously confirmed that parametric assumptions (normal distribution and homogeneity of variances) are not violated and, when applicable, indicate whether linear transformations of data or non-parametric tests have been conducted. Authors are also encouraged to consult with biometricians and determine which the most suitable statistical test before conducting the study (e.g., GLM, mixed model, linear regression).

#### *Results (labelled with the number 3)*

Results should be clear and concise.

#### *Discussion (labelled with the number 4)*

In this section, there should be an exploration of the significance of the results of the research, not a repeating of the results. For Research Papers, there needs to be a separate Results and Discussion section. Avoid extensive citations and discussion of published literature. Discussion should range between 1,000 and 1,250 words (approximately 4-5 pages).

#### *Conclusions (labelled with the number 5)*

The main conclusions of the study should be presented in a separate, short Conclusions section.

#### *Essential Title Page Information*

**Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible. Only the first letter of titles should be capitalized unless using words that need to be capitalized (e.g., breed name - Cashmere goats, Holstein cows **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the research was conducted) below the names. Indicate all affiliations with a lower- case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author. **Corresponding author.** Clearly indicate who will manage correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is provided and that contact details are current for the corresponding author. Present/permanent address.** If an author has relocated since the research described in the article was conducted, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually conducted the research must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

#### **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

#### **Abstract**

A concise and factual abstract is required of not more than 250 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential these must be defined when first used in the abstract.

### *Graphical abstract*

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### *Please note:*

The first letter of each of the Keywords should be capitalized and with semicolons between each word.

### *Acknowledgements*

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### *Formatting of funding sources*

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### *Nomenclature*

Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

### *Nomenclature and units*

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult [IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents](#) for further information.

### *Math formulae*

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).



### Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

### Artwork

#### Electronic artwork

##### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

##### Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

##### Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

##### Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

### Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Number tables consecutively in accordance with the appearance of the tables in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

##### Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### *Data references*

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

### *Preprint references*

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

### *Reference management software*

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

### *Reference style*

**Text:** All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

**List:** References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

#### *Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

### *Video*

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the

1848