



**LUIZ MANOEL SOUZA SIMÕES**

**EXPOSIÇÃO DE PROGESTERONA PREVIAMENTE AO  
PROTOCOLO DE IATF E SEUS EFEITOS NA FERTILIDADE  
DE VACAS DE CORTE EM ANESTRO PÓS-PARTO**

**LAVRAS – MG  
2023**

**LUIZ MANOEL SOUZA SIMÕES**

**EXPOSIÇÃO DE PROGESTERONA PREVIAMENTE AO PROTOCOLO DE IATF E  
SEUS EFEITOS NA FERTILIDADE DE VACAS DE CORTE EM ANESTRO PÓS-  
PARTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Reprodução Animal, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. José Nélio de Sousa Sales

Orientador

**LAVRAS – MG  
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo (a) próprio(a) autor(a).

Simões, Luiz Manoel Souza.  
Exposição de progesterona previamente ao protocolo de IATF  
na fertilidade de vacas de corte em anestro pós-parto / Luiz  
Manoel Souza Simões. – 2022. 93 p.

Orientador(a): José Nélio de Sousa Sales.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.  
Bibliografia.

1. Endométrio. 2. Concepção. 3. Folículo. 4. IATF I.  
Sales, José Nélio de Sousa. II. Título.

**LUIZ MANOEL SOUZA SIMÕES**

**EXPOSIÇÃO DE PROGESTERONA PREVIAMENTE AO PROTOCOLO DE IATF E  
SEUS EFEITOS NA FERTILIDADE DE VACAS DE CORTE EM ANESTRO PÓS-  
PARTO**

**PROGESTERONE EXPOSURE PRIOR TO THE TAI PROTOCOL AND ITS  
EFFECTS ON FERTILITY OF POSTPARTUM ANESTROUS BEEF COWS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Reprodução Animal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 31 de agosto de 2022.

Dr. José Camisão de Souza	UFLA
Dra. Nadja Gomes Alves	UFLA
Dr. Guilherme Pugliesi	FMVZ-USP
Dr. Bernardo Garziera Gasperin	UFPEL

Prof. Dr. José Nélio de Sousa Sales

Orientador

**LAVRAS MG  
2023**

## AGRADECIMENTOS

A concretização de um sonho, que é a conclusão de um Doutorado, não posso dizer que foi de maneira fácil. No entanto, tenho uma rede de apoio que sempre esteve ao meu lado nos momentos complicados dessa jornada. Além disso, me mostraram que os obstáculos encontrados durante o percurso eram para o meu crescimento, seja ele profissional, intelectual ou pessoal.

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por permitir ter saúde para a realização de todas as atividades, mesmo em um momento tão difícil que toda a humanidade enfrentou. Ele, que em todos os momentos sempre esteve me abençoando e permitindo que eu conseguisse seguir em frente.

À Fernanda, por ser a minha melhor companhia durante todo esse tempo e por não me deixar desistir. Por acreditar no meu potencial, por compreender minha ausência em muitos momentos, por sempre estar ao meu lado e me ajudar na concretização de vários sonhos, inclusive esse. Juntos, formamos um casal que sempre complementa um ao outro e não deixa que o outro desista de seus sonhos e dos nossos sonhos. O seu apoio, paciência e carinho foram fundamentais durante toda essa caminhada.

Aos meus queridos pais, Lenira e Manuelito, que me forneceram a base para que conseguisse chegar aonde cheguei, e que sempre fizeram de tudo para mim. Obrigado por me mostrarem que com humildade, perseverança, honestidade e vontade de trabalhar se consegue realizar sonhos, mesmo eles parecendo impossíveis. Também agradeço imensamente aos meus irmãos, tias, avó e aos meus sogros que sempre me ajudaram nos momentos difíceis e permitiram que eu conseguisse trabalhar com tranquilidade na execução desse grande sonho.

À Universidade Federal de Lavras e Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias por todo o suporte técnico e estrutural que foram importantes na realização desse Doutorado. Aos colegas de pós-graduação do laboratório do Zé Nélio que sempre que possível me auxiliaram na execução dos projetos, e também aos alunos de graduação e estagiários do nosso grupo. A FAPEMIG pelo apoio na elaboração desse trabalho.

A todos os professores, em especial João Bosco, José Camisão e Nadja que ao longo desses anos de graduação e pós-graduação me ensinaram muito. Ao meu orientador José Nélio, que além de orientador se tornou um grande amigo. Seus ensinamentos serão sempre válidos para toda a minha carreira e carrego comigo todo esse seu encanto pela pesquisa. Aos membros da banca de avaliação, por dedicarem um pouco do seu tempo para que esse trabalho seja finalizado da melhor maneira possível.

A todas as fazendas que cederam seus animais, equipe e instalações para que eu executasse os estudos, em especial a Agropecuária Água Preta – MT e Eldorado – MG. Ao Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular da USP (LFEM-USP), na pessoa do professor Guilherme Pugliesi e de sua aluna de pós-graduação Isabella Feltrin, que me auxiliaram na parte laboratorial desse estudo. O apoio de vocês e de toda a equipe foi fundamental para que todos os projetos fossem executados da melhor forma possível.

Aos amigos que fiz durante esses anos de Pós-graduação, em especial aos que fiz na Agropecuária Água Preta, na Reproduz AP, na fazenda Santa Cruz da Serra, na Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE) e nas várias viagens que tiver o prazer de realizar durante todos esses anos de Pós-graduação para a execução de vários projetos.

Por mim, mas não menos importante a todas as vacas com que trabalhei para que a ciência fosse aprimorada e novos conhecimentos sobre Reprodução Animal fossem construídos, para que a pecuária mundial se torne cada vez mais eficiente.

Muito obrigado a todos que acreditaram em mim.

*“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo” – Walter S. Landor*

## RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da administração de 150mg de progesterona injetável de longa ação (P4i) previamente ao protocolo de IATF na fertilidade e na dinâmica folicular de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* em anestro, e no diâmetro uterino e na expressão de receptores nas células endometriais de vacas *Bos indicus* em anestro pós-parto. Avaliou-se o efeito da exposição prévia à progesterona em substituição a eCG em protocolos de IATF. No estudo 1, animais foram divididos em 3 grupos (Controle, P4 e P4GnRH). Vacas dos grupos P4 e P4GnRH receberam P4i no D-10. No D0, vacas de todos os grupos receberam um protocolo de IATF. Nesse momento, administraram-se 10µg de buserelina nas vacas do grupo P4GnRH. Verificou-se diferença entre os grupos quanto ao FD no D0 (P=0,001), no D8 (P=0,05) e na P/IA (P=0,01). No estudo 2, avaliou-se a P4i prévia ao protocolo de IATF em vacas *Bos taurus* lactantes. No D-10, as vacas foram divididas em grupo Controle e P4i. Verificou-se maior FD no D0 (P=0,01) e no D8 (P=0,08), além de maior P/IA nas vacas do grupo P4i (P= 0,03). No estudo 3, avaliou-se o efeito da substituição da eCG pela P4i prévia ao protocolo de IATF em vacas Nelore lactantes. No D-10 as vacas foram alocadas em arranjo fatorial 2x2 para receber ou não 150mg de P4i no D-10 e receber ou não 300UI eCG no D8. O FD foi maior no D0 (P<0,01) e no D8 (P<0,01) nas vacas que receberam P4i. As taxas de crescimento folicular (P<0,01) e a P/IA (P<0,01) foram maiores nas vacas que receberam eCG. Além disso, verificou-se diferença entre os grupos no diâmetro do FD no D10 (P=0,04). No estudo 4, avaliou-se o efeito da administração prévia de P4i ao protocolo de IATF no diâmetro uterino e na expressão de PGR, ESR1, ESR2 e OXTR nas células endometriais no D0 e no D10 de vacas *Bos indicus* em anestro pós-parto. No D-10 as vacas foram divididas em grupo Controle e P4i. O diâmetro uterino no D0 (P=0,10) e no D10 (P=0,07) tenderam a ser maior no grupo P4i. A expressão de OXTR tendeu a ser maior nas vacas do grupo P4i (P=0,08). Em adição, na diferença de expressão de ESR1 do D-10 para o D0, observou-se maior aumento na expressão em vacas do grupo P4i (P>0,05). Além disso, observou-se que a diferença de expressão de ESR2 do D-10 para o D10 foi menor nas vacas do grupo P4i (P=0,05). Conclui-se que a administração de progesterona de longa ação 10 dias prévios ao protocolo de sincronização da ovulação aumenta o diâmetro folicular no D0 e no D8 e aumenta a fertilidade de vacas de corte. Além disso, a exposição prévia aumentou o diâmetro uterino e modificou a expressão de ESR1, ESR2 e OXTR no protocolo de sincronização da ovulação. No entanto, a exposição prévia a progesterona não é uma alternativa para a substituição à eCG no protocolo de IATF.

**Palavras-chave:** Endométrio. Concepção. Folículo. IATF.



## ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the effect of administering 150mg of long-acting injectable progesterone (P4i) prior to the TAI protocol on the fertility and follicular dynamics of *Bos indicus* and *Bos taurus* cows in anestrus, and on the uterine diameter and expression of receptors in endometrial cells of *Bos indicus* cows in postpartum anestrus. In addition, the effect of previous exposure to progesterone replacing eCG in TAI protocols was evaluated. In study 1, the animals were divided into 3 groups (Control, P4 and P4GnRH). Cows in the P4 and P4GnRH groups received P4i on D-10. On D0, cows from all groups received a TAI protocol. In this moment, 10µg of buserelin was administered to cows in the P4GnRH group. There was a difference between groups regarding DF on D0 (P=0.001), on D8 (P=0.05) and on P/AI (P=0.01). In study 2, P4i prior to the TAI protocol was evaluated in lactating *Bos taurus* cows. On D-10, the cows were divided into Control and P4i groups. There was a higher DF in D0 (P=0.01) and D8 (P=0.08), in addition to a higher P/AI in cows in the P4i group (P= 0.03). In study 3, the effect of replacing eCG with P4i prior to the TAI protocol in suckled Nellore cows was evaluated. On D-10, cows were allocated in a 2x2 factorial arrangement to receive or not receive 150mg of P4i on D-10 and receive or not receive 300UI eCG on D8. DF was higher at D0 (P<0.01) and at D8 (P<0.01) in cows that received P4i. Follicular growth rates (P<0.01) and P/AI (P<0.01) were higher in cows receiving eCG. In addition, there was a difference between the groups in the diameter of the DF on D10 (P=0.04). In study 4, the effect of prior administration of P4i to the TAI protocol on uterine diameter and expression of PGR, ESR1, ESR2 and OXTR in endometrial cells on D0 and D10 of *Bos indicus* cows in postpartum anestrus was evaluated. On D-10 the cows were divided into Control and P4i groups. Uterine diameter on D0 (P=0.10) and D10 (P=0.07) tended to be larger in the P4i group. OXTR expression tended to be higher in cows in the P4i group (P=0.08). In addition, the difference in ESR1 expression from D-10 to D0, a greater increase in expression was observed in cows from the P4i group (P>0.05). Furthermore, it was observed that the difference in ESR2 expression from D-10 to D10 was lower in cows in the P4i group (P=0.05). It is concluded that the administration of long-acting progesterone 10 days prior to the ovulation synchronization protocol increases the follicular diameter on D0 and D8 and increases the fertility of beef cows. Furthermore, prior exposure increased uterine diameter and modified expression of ESR1, ESR2 and OXTR in the ovulation synchronization protocol. However, prior exposure to progesterone is not an alternative to replacing eCG in the FTAI protocol.

**Keywords:** Endometrium. Conception. Follicle. TAI.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Artigo 1

- Figura 1** Experimental design. .... 50
- Circulating progesterone (P4) concentrations (mean±SEM) in *Bos indicus* (Nelore) primiparous cows receiving or not 150 mg of injectable long acting progesterone intramuscularly.....51

### Artigo 2

- Figura 1** Experimental design. .... 68

### Artigo 3

- Figura 1** Delineamento experimental do Experimento 1..... 84
- Figura 2** Delineamento experimental do Experimento 1..... 85
- Figura 3** Efeito da substituição da eCG no D8 do protocolo de IATF pela exposição prévia de progesterona injetável ao protocolo de IATF na taxa de concepção de vacas Nelore lactantes..... 86

### Artigo 4

- Figura 1** Delineamento experimental..... 103
- Figura 2** Efeito da administração de 150mg de progesterona injetável de longa ação 10 dias prévios ao início do protocolo de sincronização da ovulação no diâmetro uterino de vacas nelore paridas em anestro..... 104
- Figura 3** Efeito da administração de 150mg de progesterona injetável de longa ação 10 dias prévios ao início do protocolo de sincronização da ovulação na expressão de receptores de progesterona (PGR) no endométrio de vacas nelore paridas em anestro..... 105
- Figura 4** Efeito da administração de 150mg de progesterona injetável de longa ação 10 dias prévios ao início do protocolo de sincronização da ovulação na expressão de receptores de estrógeno tipo  $\alpha$

(ESR1) no endométrio de vacas nelore paridas em anestro.....106

**Figura 5** Efeito da administração de 150mg de progesterona injetável de longa ação 10 dias prévios ao início do protocolo de sincronização da ovulação na expressão de receptores de estrógeno tipo  $\beta$  (ESR2) no endométrio de vacas nelore paridas em anestro..... 107

**Figura 6** Efeito da administração de 150mg de progesterona injetável de longa ação 10 dias prévios ao início do protocolo de sincronização da ovulação na expressão de receptores de ocitocina (OXTR) no endométrio de vacas nelore paridas em anestro.....108

## LISTA DE TABELAS

### Artigo 1

- Tabela 1** Effects of exposure to progesterone previous to TAI protocol on follicular growth, CL diameter and ovulation rate of anestrous suckled Nelore cows (n=420)..... 47
- Tabela 2** Effects of exposure to progesterone previous to TAI protocol, parity, and BCS on P/AI of suckled Nelore cows (n=681) submitted to estradiol/progesterone-based TAI protocols..... 48
- Tabela 3** Effects of exposure to progesterone previous to TAI protocol according to parity or to BCS on P/AI of suckled Nelore cows (n=681)..... 49

### Artigo 2

- Tabela 1** Effects of exposure to progesterone prior to the TAI protocol on the follicular diameter, follicular growth and ovulation rate of anestrous suckled *Bos taurus* cows (n=401)..... 66
- Tabela 2** Effects of exposure to progesterone prior to the TAI protocol, occurrence estrous, and BCS on P/AI of suckled *Bos taurus* cows (n=576) submitted to estradiol/progesterone-based TAI protocols..... 67

### Artigo 3

- Tabela 1** Efeito da substituição da eCG pela exposição prévia de progesterona à IATF na dinâmica folicular de vacas *Bos indicus* lactantes..... 82
- Tabela 2** Efeito da substituição da eCG pela exposição prévia de progesterona à IATF na taxa de concepção de vacas *Bos indicus* lactantes..... 83

### Artigo 4

- Tabela 1** Sequência de primers de genes alvo e referência analisados utilizando qPCR..... 102

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

3 $\beta$ HSD	Enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase
Ø	Diâmetro
µg	Microgramas
BCS	<i>Body condition score</i>
BE	Benzoato de estradiol
CI	<i>Confidence interval</i>
CL	Corpo lúteo
CYP450	Citocromo P450
D	Dia
EB	<i>Estradiol benzoate</i>
EC	<i>Estradiol Cypionate</i>
ECC	Escore de condição corporal
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
EPM	Erro padrão da média
ESR	Receptor de estrógeno
ESR1	Receptor de estrógeno tipo 1
ESR2	Receptor de estrógeno tipo 2
FD	Maior folículo
FSH	Hormônio folículo estimulante
G	Gramas
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
i.m.	Intramuscular
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IC	Intervalo de confiança
INSR	Receptor de insulina
LF	<i>Largest follicle</i>
LH	Hormônio luteinizante
mg	Miligramas

MHz	Megahertz
mL	Microlitros
mm	Milímetro
N	Número amostral
Ng	Nanogramas
OR	<i>Odds ratio</i>
P	Significância
P4	Progesterona
P4i	Progesterona injetável
PGF	Prostaglandina F2 $\alpha$
P /IA	Taxa de concepção
P/AI	<i>Conception rate</i>
PGR	Receptor de progesterona
PTGFR	Receptor de prostaglandina F2 $\alpha$
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SEM	<i>Standard error mean</i>
StAR	Proteína reguladora aguda esteroidogênica
TAI	<i>Timed artificial insemination</i>
UI	Unidades internacionais
US	Ultrassom
vs	Versus

## Sumário

PRIMEIRA PARTE .....	16
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	17
3. HIPÓTESE .....	17
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
4.1. Produção de progesterona .....	18
4.2. Ciclo estral da vaca .....	19
4.3. Ciclo estral de curta duração .....	20
4.4. Progesterona e estradiol na modulação uterina .....	22
Referências .....	24
SEGUNDA PARTE – ARTIGO .....	30
ARTIGO 1 - Exposição prévia a progesterona ao protocolo de sincronização da ovulação aumenta o diâmetro folicular e a taxa de prenhez de vacas <i>Bos indicus</i> lactantes.....	30
Abstract.....	32
1. Introduction .....	33
2. Materials and methods.....	34
3. Results .....	37
4. Discussion.....	38
Competing Interests.....	41
Acknowledgments .....	41
References .....	42
ARTIGO 2 – Exposure to progesterone before the protocol of ovulation synchronization increases the follicular diameter and the fertility of suckled <i>Bos taurus</i> cows .....	52
Abstract.....	53
1. Introduction .....	54

2. Material and Methods.....	55
3. Results .....	58
4. Discussion .....	58
Competing Interests .....	60
Acknowledgments .....	60
References .....	61
Artigo 3 - Exposição prévia à progesterona injetável ao protocolo de sincronização da ovulação não substitui a eCG em protocolo de sincronização da ovulação. ....	69
Resumo .....	70
1. Introdução.....	72
2. Material e Métodos.....	72
3. Resultados .....	75
4. Discussão.....	76
Conflitos de interesse .....	78
Agradecimentos .....	78
Referências .....	79
Artigo 4 - Exposição prévia à progesterona injetável ao protocolo de sincronização da ovulação modula o útero no momento da IATF em vacas <i>Bos indicus</i> lactantes em anestro .....	87
Resumo .....	88
1.Introdução .....	90
2.Material e Métodos.....	91
3. Resultados.....	93
4.Discussão .....	94
Conflitos de interesse .....	96
Agradecimentos .....	96
Referências .....	97



## PRIMEIRA PARTE

### 1. INTRODUÇÃO

Em rebanhos de corte a eficiência financeira está relacionada com a eficiência reprodutiva. Dessa maneira, vacas de corte devem produzir um bezerro a cada 12 meses, e para que isso ocorra, o intervalo do parto à concepção não pode ultrapassar 90 dias. No entanto, vacas de corte criadas em sistemas extensivos ficam em anestro pós-parto por aproximadamente 120 dias. Assim, os protocolos de sincronização da ovulação estão bem consolidados e são utilizados a fim de induzir o retorno precoce a ciclicidade após o parto (BARUSELLI et al., 2004). No entanto, a eficiência de sincronização é variável, sendo menores em vacas com baixo escore corporal no início do protocolo (SALES et al., 2016).

Após o parto, o anestro prolongado em vacas de corte reduz a eficiência reprodutiva do rebanho (MONTIEL; AHUJA, 2005). O mecanismo hormonal relacionado a baixa pulsatilidade de LH neste período é resultado de fatores como: estresse nutricional (DISKIN et al., 2003), categoria animal (primípara versus múltipara) (GRIMARD et al., 1995) e a presença do bezerro (WILLIAMS et al., 1983). Tais fatores afetam o crescimento folicular final, resultando em padrões de crescimento folicular sem subsequente ovulação (YAVAS; WALTON, 2000). Em vacas com demanda energética comprometida, devido à baixa oferta de nutrientes em sistemas de criação extensiva, observa-se o bloqueio na secreção de GnRH e, conseqüentemente, de LH (SCHILLO, 1992). Tal bloqueio no eixo hipotalâmico-hipofisário ocorre pelo *feedback* negativo proveniente do aumento das concentrações de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e neuropeptídeo Y produzidos pela mobilização das reservas de gordura corporal (MCSHANE et al., 1993; DICOSTANZO; WILLIAMS; KEISLER, 1999). Além disso, fêmeas bovinas em balanço energético negativo apresentam baixas concentrações séricas de glicose, principal metabólito energético utilizado pelo sistema nervoso central (GAZAL et al., 1998). Associado a esse fator, a presença do bezerro desencadeia a liberação de opioides endógenos que suprimem a liberação de GnRH/LH (WILLIAMS et al., 1983; MALVEN et al., 1986; WILLIAMS et al., 1996). Nesse contexto, novas estratégias hormonais têm sido desenvolvidas para aumentar a pulsatilidade de LH e, conseqüentemente, a eficiência dos protocolos de sincronização da ovulação (SIMÕES et al., 2018).

Estudos recentes vêm demonstrando que um período de exposição mais prolongado à progesterona durante os protocolos de sincronização da ovulação aumenta o diâmetro folicular no momento da remoção do dispositivo de progesterona (SIMÕES et al., 2018). Esse

maior período de exposição à progesterona estimula o desenvolvimento folicular pela ação direta desse esteroide no hipotálamo por meio de estímulo não genômico que reduz a sensibilidade das células hipotalâmicas ao estrógeno (SKINNER et al., 1998). Dessa forma, a progesterona estimula a secreção de GnRH e aumenta a pulsatilidade de LH (RHODES et al., 2002). Além disso, as concentrações de progesterona durante o desenvolvimento folicular podem alterar a morfologia das células endometriais (SHAHAM-ALBALANCY et al., 1997). Durante o ciclo estral o endométrio é influenciado principalmente pelos hormônios esteroides (progesterona e estrógeno) para que ocorra o reconhecimento materno da gestação, alongação do concepto, secreção de nutrientes e fatores de crescimento para o desenvolvimento do concepto (GEISERT et al., 1993; GRAY et al., 2002). Tais mudanças interferem na expressão de receptores de ocitocina, progesterona e estrógeno durante o ciclo estral.

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da administração de 150mg de progesterona injetável de longa ação (Sincrogest injetável, Ouro Fino, Brasil) previamente ao protocolo de sincronização da ovulação na fertilidade e na dinâmica folicular de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* em anestro, no diâmetro uterino e na expressão de receptores (OXTR, PGR, ESR1 e ESR2) no endométrio uterino de vacas Nelore (*Bos indicus*) em anestro pós-parto. Além disso, avaliou-se o efeito da exposição prévia à progesterona em substituição a eCG em protocolos de sincronização da ovulação em vacas *Bos indicus* lactantes.

## **3. HIPÓTESE**

A hipótese do estudo é que a administração prévia de progesterona injetável de longa ação previamente ao protocolo de sincronização da ovulação aumenta a fertilidade de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus*. Além disso, a exposição prévia de progesterona ao protocolo de IATF substitui a eCG em protocolos de sincronização da ovulação em vacas *Bos indicus* lactantes. Em adição, o padrão de expressão de receptores uterinos (OXTR, PGR, ESR1 e ESR2) é modificado com a administração prévia de progesterona ao protocolo de sincronização da ovulação.

## **4. REFERENCIAL TEÓRICO**

#### 4.1. Produção de progesterona

A progesterona (P4) é um hormônio esteroide, lipossolúvel e derivada do colesterol. Em bovinos, a principal fonte de colesterol para a síntese de progesterona são as lipoproteínas de alta densidade [HDL; (RAJAPAKSHA et al., 1997)]. Dessa forma, o HDL é convertido em progesterona no corpo lúteo (CL), córtex da adrenal e pela placenta. No CL, onde ocorre a maior produção de P4 em bovinos, ela é sintetizada em sua maioria (80% da P4 circulante) pelas células luteais grandes, que são derivadas das células da granulosa do folículo pré-ovulatório (DIAZ et al., 2002), e pouco dependentes da frequência de pulsos do hormônio luteinizante (LH) para sintetizar a progesterona (WILT BANK et al., 2012).

Durante a síntese de progesterona nos ruminantes, o colesterol é convertido em pregnenolona no interior das mitocôndrias. Por sua vez, a pregnenolona é convertida em progesterona no retículo endoplasmático liso (NISWENDER, 2002). No entanto, o colesterol é uma molécula hidrofóbica e essa característica dificulta sua difusão no citoplasma das células, por esse ser um ambiente hidrofílico. Em adição, o colesterol possui uma região hidrofílica simples, devido a um grupo hidroxila na terceira posição, e o restante da molécula com composição hidrofóbica (DE MEYER; SMIT, 2009). Tal característica dificulta a movimentação do colesterol na bicamada lipídica da parede mitocondrial. Dessa forma, o principal fator limitante na síntese de progesterona é o transporte do colesterol para o interior da mitocôndria (DE MEYER; SMIT, 2009).

Na conversão de colesterol para progesterona primeiramente é necessário que ocorra o transporte do colesterol do sistema circulatório para o interior da mitocôndria. Esse transporte é mediado pela produção de uma proteína de transporte denominada de proteína reguladora aguda esteroideogênica [StAR; (STOCCO; CLARK, 1996)]. No interior da mitocôndria, a enzima P450 de clivagem de colesterol em cadeia catalisa a conversão de colesterol em pregnenolona. Nesse processo, ocorrem três etapas de oxidação com hidroxilação nas posições 20 e 22 e então clivagem entre esses dois carbonos. Dessa forma, a pregnenolona, por possuir dois resíduos hidrofílicos, se torna menos instável nas membranas e mais móvel no citoplasma da célula. Assim, a pregnenolona se difunde da mitocôndria para o retículo endoplasmático liso, onde é convertida em progesterona pela enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase (3 $\beta$ HSD). Por sua vez, a progesterona se difunde para as células luteais e para corrente sanguínea para ser transportada para os tecidos alvos (REKAWIECKI et al., 2008).

A progesterona é responsável direta ou indiretamente pela modulação de funções reprodutivas como: crescimento folicular, nutrição inicial do embrião (MANN; LAMMING, 2001), bloqueio da expressão do estro e da ovulação por *feedback* negativo no hipotálamo

(COLAZO et al., 2008). Em adição, em um ciclo estral normal a produção de P4 ocorre após a ovulação de um folículo dominante e luteinização das células da granulosa e da teca. Dessa forma, as concentrações plasmáticas de progesterona durante a fase progesterônica são variáveis durante um ciclo estral normal, podendo ser influenciadas por fatores como nutrição, tamanho de folículo ovulatório e tamanho do CL (SARTORI et al., 2016).

#### **4.2.Ciclo estral da vaca**

Fêmeas bovinas, após atingirem a puberdade, são caracterizadas por terem estros periodicamente ao longo do ano até que ocorra a gestação, ou seja, são caracterizadas como poliéstricas. O intervalo entre dois estros nos bovinos ocorre a cada 21 dias (FIGUEIREDO et al., 1997). Além disso, o desenvolvimento folicular no ciclo estral ocorre no formato de ondas foliculares, com a presença de duas a três ondas foliculares por ciclo estral (GINTHER et al., 1997). No entanto, fatores como nutrição e presença do bezerro, podem aumentar o período de retorno a ciclicidade pós-parto (BARUSELLI et al., 2004), por influenciarem indiretamente na liberação pulsátil de LH (DISKIN et al., 2003), mas não na quantidade de ondas foliculares, ou seja, mesmo não tendo ovulação o padrão de crescimento folicular continua sendo no formato de ondas. Em adição, é reportado que o primeiro ciclo estral pós-parto de 10 a 57,1% das vacas de corte é de curta duração, ou seja, com luteólise ocorrendo por volta do sétimo dia (NÚÑEZ-OLIVERA et al., 2014; NÚÑEZ-OLIVERA et al., 2020).

O ciclo estral de bovinos é caracterizado por duas fases: a fase folicular, que é dividida em proestro e estro. E a fase progesterônica que se inicia após o estro e é dividida em metaestro e diestro. A fase folicular é caracterizada pelo rápido desenvolvimento do folículo, aumento da liberação de estrógeno folicular, redução dos níveis de progesterona e pelo pico de LH. Dessa forma, com o desenvolvimento folicular ocorre a síntese de estrógeno pelo folículo nas células da granulosa por ação do hormônio folículo estimulante (FSH) e nas células da teca por ação do LH (ODUWOLE;HUHTANIEMI; MISRAHI, 2021). Com o declínio da progesterona e o aumento gradativo das concentrações de estrógeno, a amplitude e a frequência de pulsos de LH aumentam e favorecem o desenvolvimento folicular até a ovulação (MCCRACKEN;CUSTER; LAMSA, 1999).

A fase progesterônica é caracterizada pela formação do CL e por altas concentrações de progesterona. Nessa fase, há desenvolvimento folicular com seleção, emergência, divergência e atresia folicular. Dessa forma, alguns autores relatam que oócitos que se desenvolvem na fase progesterônica, ou seja, sob a influência de altas concentrações de progesterona, têm maior fertilidade (WILTBANK et al., 2011). Assim, a maior fertilidade de

oócitos que se desenvolveram em um ambiente com progesterona está relacionada com a maior competência de desenvolvimento. Visto que, é nesse período que o oócito tem maiores influências sobre a competência oocitária (SIRARD, 2016). Assim, adequadas concentrações de progesterona estimulam a frequência de pulsos de LH (ROCHE, 2006), promovendo um ambiente adequado para o desenvolvimento de um folículo com um oócito de maior competência de desenvolvimento (SIRARD et al., 2006; SIRARD, 2016).

Caso não ocorra a fertilização do oócito liberado no metaestro e desenvolvimento de um embrião capaz de produzir quantidades suficientes de Interferon-tau que sinalize para o organismo materno sua presença, por volta do 16º dia do ciclo estral ocorre a produção de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  pelo endométrio e consequentemente lise do CL (MCCRACKEN; CUSTER; LAMSA, 1999).

### **4.3.Ciclo estral de curta duração**

No ciclo estral de bovinos, a luteólise ocorre por volta do 16º dia, com a liberação de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  (PGF) pelo endométrio uterino. Dessa maneira, a luteólise é resultante da liberação pulsátil de PGF pelo endométrio uterino em resposta a ligação da ocitocina aos seus novos receptores no endométrio uterino (MANN; LAMMING, 2000). No entanto, em animais com ciclo curto esse episódio de liberação de prostaglandina ocorre antes do décimo quarto dia do ciclo estral (INSKEEP, 2004). Dessa maneira, o ciclo curto em bovinos é resultado da liberação precoce de PGF pelo útero (TAPONEN et al., 2002), podendo essa liberação ocorrer após sete dias da ovulação (NÚÑEZ-OLIVERA *et al.*, 2014).

Os ciclos curtos ocorrem principalmente em novilhas que atingiram a puberdade (primeira ovulação), ou em vacas na primeira ovulação pós-parto (TAPONEN *et al.*, 2002), pois comumente esses animais não tiveram um ciclo estral precedido de uma fase progesterônica. Além disso, em vacas de leite é possível que a progesterona produzida pelo CL da gestação tenha efeito no endométrio uterino até 20 dias pós-parto, pois como verificado por Savio; Boland e Roche (1990), em vacas de leite a incidência de ciclo curto é menor em vacas com o desenvolvimento do folículo dominante e ovulação antes do 20º dia pós-parto. Dessa forma, um primer de progesterona antes da primeira ovulação na puberdade e/ou primeira ovulação pós-parto reduz a incidência de ciclos curtos (TAPONEN *et al.*, 2002). O mecanismo de ação do primer de progesterona na redução de incidência de ciclo curto não é tão elucidado, mas está relacionado com uma redução no número de receptores de estradiol no hipotálamo, que permite uma maior liberação pulsátil de LH, que por sua vez estimula o

crescimento folicular e, como consequência, se tem maior produção de estradiol (RHODES et al., 2003).

O mecanismo pelo qual ocorre o ciclo curto está relacionado com a liberação de PGF antes do 16º dia do ciclo estral, mediada pela liberação precoce de ocitocina. Dessa maneira, no dia 5 do ciclo estral, a concentração de receptores de progesterona no endométrio uterino é menor e a concentração de receptores de ocitocina é maior em vacas com ciclo curto do que em vacas com ciclo estral normal (ZOLLERS et al., 1993). Assim, com a perda de dominância dos receptores de progesterona e aumento precoce nos receptores de ocitocina no endométrio uterino, se inicia um feedback positivo entre ocitocina e PGF e o resultado é a liberação precoce de prostaglandina F2 $\alpha$  (MANN; LAMMING, 2000). Além disso, o estradiol está relacionado de maneira indireta com a incidência de ciclos curtos em vacas, pois a duração do proestro (BRIDGES et al., 2010) e as concentrações de estradiol nesse período (MANN; LAMMING, 2000; RANTALA et al., 2014) influenciam na incidência de ciclos curtos em vacas. Sendo assim, a incidência de ciclos curtos em vacas é modulada por uma exposição prévia de progesterona e pelas concentrações de estrógeno no proestro.

### **1.1. Progesterona no crescimento e desenvolvimento folicular**

O crescimento dos folículos ovarianos é dependente no início do seu desenvolvimento do estímulo do FSH e no final do seu desenvolvimento do estímulo do LH (GINTHER et al., 1996). Dessa forma, a frequência de pulsos de LH é importante na manutenção do folículo dominante (TAFT; AHMAD; INSKEEP, 1996). Assim, um maior crescimento folicular está associado a ambientes com concentrações subluteais de progesterona (ADAMS; MATTERI; GINTHER, 1992). Dessa maneira, há uma relação entre a concentração de progesterona e a frequência de pulsos de LH. Assim, a frequência de pulsos de LH é inversamente proporcional à concentração de progesterona (REVAH; BUTLER, 1996; RHODES et al., 2002; RHODES *et al.*, 2003). Além disso, as concentrações de P4 modulam as concentrações de estradiol 17 $\beta$ , pois segundo Bergfeld et al. (1996), a frequência de pulsos de LH (4,1 pulsos/6h) e os níveis de estradiol 17 $\beta$  (12,7 pg/mL) foram maiores em vacas tratadas com baixas concentrações de P4 (1,3 ng/mL) do que nas tratadas com altas concentrações de P4 (4,6 ng/mL), cujos pulsos de LH e níveis de estradiol 17 $\beta$  foram, respectivamente, 1,3 pulsos/6h e 3,5 pg/mL. Em adição, a progesterona em altas concentrações atua no hipotálamo por meio de uma ação não genômica reduzindo a sensibilidade das células hipotálamicas ao estrógeno (SKINNER et al., 1998). Sendo assim, é necessária uma menor quantidade de estrógeno para que se tenha liberação pulsátil de GnRH e consequentemente de LH.

Em questão de qualidade oocitária do folículo em desenvolvimento, estudos demonstram que folículos que se desenvolvem sob concentrações elevadas de progesterona possuem maior fertilidade (BISINOTTO;CHEBEL; SANTOS, 2010; WILTBANK *et al.*, 2011). No entanto, oócitos provenientes de folículos expostos a um prolongado período de exposição a concentrações subluteais de progesterona (folículos persistentes) têm a meiose ativada prematuramente. A ativação prematura ocorre devido ao maior período de exposição do oócito a baixas frequências de pulsos de LH (REVAH; BUTLER, 1996).

#### **4.4. Progesterona e estradiol na modulação uterina**

Durante os estágios que antecedem (proestro/estro) e sucedem (metaestro/diestro inicial) a ovulação em bovinos, importantes mudanças nas concentrações circulantes de hormônios sexuais ocorrem e definem o perfil endócrino periovulatório e a expressão de receptores (BAUERSACHS *et al.*, 2005) de estrógeno (ESR), progesterona (PGR) e ocitocina (OXTR). Dessa forma, a distribuição desses receptores no útero é importante para o estabelecimento da gestação em vacas (GONELLA-DIAZA *et al.*, 2015). Os hormônios esteroides sexuais bem como a expressão dos seus receptores e receptores de ocitocina podem afetar as funções endometriais, a produção de prostaglandinas e consequentemente afetar o ambiente uterino, o desenvolvimento embrionário e o estabelecimento da gestação (OKUMU *et al.*, 2010).

A fertilidade em vacas está relacionada com as concentrações de estrógeno durante o proestro e também com as concentrações de progesterona no diestro (JINKS *et al.*, 2013). Dessa forma, alguns autores observaram que vacas com maior período de proestro e com maiores concentrações de estradiol tiveram maior fertilidade (MESQUITA *et al.*, 2014; MADOZ *et al.*, 2021). Assim, no dia seis após a ovulação, vacas que possuem um maior diâmetro folicular no proestro, e consequentemente maior CL no diestro, apresentam maior expressão de receptores de estrógeno tipo 2 (ESR2) e de receptores de ocitocina (OXTR) no endométrio. No entanto, a expressão de receptores de estrógeno tipo 1 (ESR1) e de progesterona (PGR) no diestro inicial não é influenciada pelo diâmetro folicular no proestro (MESQUITA *et al.*, 2014). Além disso, vacas que possuem maior folículo ovulatório têm um aumento na expressão de genes relacionados ao remodelamento da matriz extracelular, proliferação celular e secreção de fatores de crescimento (GONELLA-DIAZA *et al.*, 2015). Em adição, vacas com maior folículo ovulatório apresentaram maior abundância de transcritos relacionados ao transporte de aminoácidos (SLC1A4, SLC6A1, SLC6A14, SLC7A4, SLC7A7, SLC7A8, SLC38A1, SLC38A7 e SLC43A) no dia sete após a

administração do indutor de ovulação (BINELLI et al., 2017). Dessa forma, a maior concentração de estradiol no proestro irá modular o ambiente uterino para que se tenha um melhor ambiente para o concepto.

Em decorrência de um maior folículo ovulatório é formado um CL de maior diâmetro (PUGLIESI et al., 2016), que conseqüentemente produz mais progesterona. Sendo assim, maior concentração de P4 é benéfica para o desenvolvimento embrionário inicial, por estimular maior produção de Interferon-tau pelo embrião e, conseqüentemente, melhorar o ambiente uterino para o estabelecimento da gestação (DEMETRIO et al., 2007; FILANT; SPENCER, 2014). Além disso, a progesterona tem a função de modular a expressão de receptores relacionados à produção de PGF pelo útero, visto que a ocorrência de ciclo estral de curta duração é maior em vacas que não foram expostas previamente a progesterona (TAPONEN *et al.*, 2002). Em adição, a expressão de OXTR é maior no dia cinco após ovulação em vacas com ciclo estral de curta duração (ZOLLERS *et al.*, 1993). Em adição, a administração de 300 mg de progesterona de longa ação no diestro inicial aumenta as concentrações de progesterona no diestro, porém aumenta também a porcentagem de vacas com luteólise precoce e a expressão de OXTR e de ESR1 no 16º dia após a ovulação (BATISTA et al., 2019). Portanto, uma dosagem excessiva de progesterona exógena no diestro inicial pode ser prejudicial para a formação do CL, reconhecimento materno da gestação e ativar prematuramente os mecanismos uterinos relacionados à secreção de PGF. No entanto, em vacas de leite a maior concentração de progesterona durante o desenvolvimento folicular melhora a fertilidade (BISINOTTO; CHEBEL; SANTOS, 2010; WILTBANK *et al.*, 2011). Segundo CERRI et al. (2011), reduzida concentração de progesterona durante o desenvolvimento do folículo ovulatório altera a composição do fluido folicular (menor concentração de IGF-1) e prematuramente aumenta a expressão de ESR1 e conseqüentemente, antecipa a liberação de PGF no ciclo estral subsequente. Nesse contexto, as concentrações dos hormônios esteroides durante o desenvolvimento do folículo ovulatório, proestro e diestro inicial são importantes fatores que impactam na modulação do ambiente uterino.



## REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; GINTHER, O. J. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 96, n. 2, p. 627-40, 1992.
- BARUSELLI, P. S. 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.
- BATISTA, E. O. S. et al. Supplemental progesterone induces temporal changes in luteal development and endometrial transcription in beef cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 68, p. 126-134, 2019.
- BAUERSACHS, S. et al. Gene expression profiling of bovine endometrium during the oestrous cycle: detection of molecular pathways involved in functional changes. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 889-908, 2005.
- BERGFELD, E. G. et al. Changing dose of progesterone results in sudden changes in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of 17 beta-estradiol in bovine females. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 3, p. 546-53, 1996.
- BINELLI, M. et al. Programação da receptividade uterina e fertilidade em vacas de corte Uterine receptivity and fertility programming in beef cows. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, p. 121-129, 2017.
- BISINOTTO, R. S.; CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E. Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 8, p. 3578-87, 2010.
- BRIDGES, G. A. et al. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 117, n. 3-4, p. 208-15, 2010.
- CERRI, R. L. et al. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and uterine responses. **Journal of Dairy Science** i, v. 94, n. 7, p. 3352-65, 2011.
- COLAZO, M. G. et al. Effects of plasma progesterone concentrations on LH release and ovulation in beef cattle given GnRH. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 34, n. 1, p. 109-17, 2008.
- DICOSTANZO, A.; WILLIAMS, J. E.; KEISLER, D. H. Effects of short- or long-term infusions of acetate or propionate on luteinizing hormone, insulin, and metabolite concentrations in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 11, p. 3050-6, 1999.

- DE MEYER, F.; SMIT, B. Effect of cholesterol on the structure of a phospholipid bilayer. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 106, n. 10, p. 3654-8, 2009.
- DEMETRIO, D. G. B. et al. Factors Affecting Conception Rates Following Artificial Insemination or Embryo Transfer in Lactating Holstein Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 11, p. 5073-5082, 2007.
- DIAZ, F. J. et al. Regulation of progesterone and prostaglandin F<sub>2</sub>α production in the CL. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 191, n. 1, p. 65-80, 2002.
- DISKIN, M. G. et al. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3, p. 345-370, 2003.
- FIGUEIREDO, R. A. et al. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1489-505, 1997.
- FILANT, J.; SPENCER, T. E. Uterine glands: biological roles in conceptus implantation, uterine receptivity and decidualization. **International Journal of Developmental Biology**, v. 58, n. 2-4, p. 107-16, 2014.
- GAZAL, O. S. et al. Gonadotropin-releasing hormone secretion into third-ventricle cerebrospinal fluid of cattle: correspondence with the tonic and surge release of luteinizing hormone and its tonic inhibition by suckling and neuropeptide Y. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 3, p. 676-83, 1998.
- GEISERT, R. D. et al. Changes in oestrogen receptor protein, mRNA expression and localization in the endometrium of cyclic and pregnant gilts. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, n. 3, p. 247-60, 1993.
- GINTHER, O. J. et al. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v. 48, n. 1, p. 75-87, 1997.
- GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1187-94, 1996.
- GONELLA-DIAZA, A. M. et al. Size of the Ovulatory Follicle Dictates Spatial Differences in the Oviductal Transcriptome in Cattle. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0145321, 2015.
- GRAY, C. A. et al. Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. **Reproduction**, v. 124, n. 2, p. 289-300, 2002.
- GRIMARD, B. et al. Influence of postpartum energy restriction on energy status, plasma LH and oestradiol secretion and follicular development in suckled beef cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 104, n. 1, p. 173-9, 1995.

- INSKEEP, E. K. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. **Journal of Animal Science**, v. 82 E-Suppl, p. E24-39, 2004.
- JINKS, E. M. et al. Preovulatory estradiol and the establishment and maintenance of pregnancy in suckled beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 3, p. 1176-85, 2013.
- MADOZ, L. V. et al. Association between progesterone concentration and endometrial gene expression in dairy cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 74, p. 106481, 2021.
- MALVEN, P. V. et al. Relationships among concentrations of four opioid neuropeptides and luteinizing hormone-releasing hormone in neural tissues of beef cows following early weaning. **Journal of Animal Science**, v. 62, n. 3, p. 723-33, 1986.
- MANN, G. E.; LAMMING, G. E. The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrous cycle in the cow. **Animal Reproduction Science**, v. 64, n. 3-4, p. 171-80, 2000.
- MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, v. 121, n. 1, p. 175-80, 2001.
- MCCRACKEN, J. A.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 263-323, 1999.
- MCSHANE, T. M. et al. Influence of food restriction on neuropeptide-Y, proopiomelanocortin, and luteinizing hormone-releasing hormone gene expression in sheep hypothalami. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 4, p. 831-9, 1993.
- MESQUITA, F. S. et al. Manipulation of the periovulatory sex steroidal milieu affects endometrial but not luteal gene expression in early diestrus Nelore cows. **Theriogenology**, v. 81, n. 6, p. 861-9, 2014.
- MONTIEL, F.; AHUJA, C. Body condition and suckling as factors influencing the duration of postpartum anestrus in cattle: a review. **Animal Reproduction Science**, v. 85, n. 1-2, p. 1-26, 2005.
- NISWENDER, G. D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. **Reproduction**, v. 123, n. 3, p. 333-9, 2002.
- NÚÑEZ-OLIVERA, R. et al. Effect of equine chorionic gonadotropin (eCG) administration and proestrus length on ovarian response, uterine functionality and pregnancy rate in beef heifers inseminated at a fixed-time. **Theriogenology**, v. 151, p. 16-27, 2020.

- NÚÑEZ-OLIVERA, R. et al. Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol' based treatment in postpartum anestrous beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 146, n. 3-4, p. 111-6, 2014.
- ODUWOLE, O. O.; HUHTANIEMI, I. T.; MISRAHI, M. The Roles of Luteinizing Hormone, Follicle-Stimulating Hormone and Testosterone in Spermatogenesis and Folliculogenesis Revisited. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 22, n. 23, 2021.
- OKUMU, L. A. et al. The effect of elevated progesterone and pregnancy status on mRNA expression and localisation of progesterone and oestrogen receptors in the bovine uterus. **Reproduction**, v. 140, n. 1, p. 143-53, 2010.
- PUGLIESI, G. et al. Improved fertility in suckled beef cows ovulating large follicles or supplemented with long-acting progesterone after timed-AI. **Theriogenology**, v. 85, n. 7, p. 1239-48, 2016.
- RAJAPAKSHA, W. R. A. K. J. S. et al. Sequence of the bovine HDL-receptor (SR-BI) cDNA and changes in receptor mRNA expression during granulosa cell luteinization in vivo and in vitro. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 134, n. 1, p. 59-67, 1997.
- RANTALA, M. H. et al. Endometrial expression of progesterone, estrogen, and oxytocin receptors and of 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase and cyclooxygenase II 2 and 5 days after ovulation in induced short and normal estrous cycles in dairy cows. **Theriogenology**, v. 81, n. 9, p. 1181-8, 2014.
- REKAWIECKI, R. et al. Regulation of progesterone synthesis and action in bovine corpus luteum. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 59 Suppl 9, p. 75-89, 2008.
- REVAH, I.; BUTLER, W. R. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, n. 1, p. 39-47, 1996.
- RHODES, F. M. et al. Effect of treatment with progesterone and oestradiol benzoate on ovarian follicular turnover in postpartum anoestrous cows and cows which have resumed oestrous cycles. **Animal Reproduction Science**, v. 69, n. 3-4, p. 139-50, 2002.
- RHODES, F. M. et al. Invited Review: Treatment of Cows with an Extended Postpartum Anestrous Interval. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 6, p. 1876-1894, 2003.
- ROCHE, J. F. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. **Animal Reproduction Science**, v. 96, n. 3-4, p. 282-96, 2006.
- SALES, J. N. et al. Effects of eCG are more pronounced in primiparous than multiparous Bos indicus cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 86, n. 9, p. 2290-2295, 2016.

- SARTORI, R. et al. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 32-40, 2016.
- SAVIO, J. D.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in post-partum dairy cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, n. 2, p. 581-91, 1990.
- SCHILLO, K. K. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. **Journal of Animal Science** i, v. 70, n. 4, p. 1271-82, 1992.
- SHAHAM-ALBALANCY, A. et al. Delayed effect of progesterone on endometrial morphology in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 48, n. 2-4, p. 159-74, 1997.
- SIMÕES, L. M. S. et al. Exposure to progesterone previous to the protocol of ovulation synchronization increases the follicular diameter and the fertility of suckled *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 116, p. 28-33, 2018.
- SIRARD, M. A. Somatic environment and germinal differentiation in antral follicle: The effect of FSH withdrawal and basal LH on oocyte competence acquisition in cattle. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 54-61, 2016.
- SIRARD, M. A. et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126-36, 2006.
- SKINNER, D. C. et al. The negative feedback actions of progesterone on gonadotropin-releasing hormone secretion are transduced by the classical progesterone receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 95, n. 18, p. 10978-83, 1998.
- STOCCO, D. M.; CLARK, B. J. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 3, p. 221-44, 1996.
- TAFT, R.; AHMAD, N.; INSKEEP, E. K. Exogenous pulses of luteinizing hormone cause persistence of the largest bovine ovarian follicle. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 12, p. 2985-91, 1996.
- TAPONEN, J. et al. Short estrous cycles and estrous signs after premature ovulations induced with cloprostenol and gonadotropin-releasing hormone in cyclic dairy cows. **Theriogenology**, v. 58, n. 7, p. 1291-302, 2002.
- WILLIAMS, G. L. et al. Mechanisms regulating suckling-mediated anovulation in the cow. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1, p. 289-297, 1996.
- WILLIAMS, G. L. et al. Coincident secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in early postpartum beef cows: effects of suckling and low-level increases of systemic progesterone. **Biology of Reproduction**, v. 29, n. 2, p. 362-73, 1983.

WILTBANK, M. C. et al. Comparison of endocrine and cellular mechanisms regulating the corpus luteum of primates and ruminants. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 242-259, 2012.

WILTBANK, M. C. et al. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 1, p. 238-43, 2011.

YAVAS, Y.; WALTON, J. S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. **Theriogenology**, v. 54, n. 1, p. 25-55, 2000.

ZOLLERS, W. G., JR. et al. Concentrations of progesterone and oxytocin receptors in endometrium of postpartum cows expected to have a short or normal oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, n. 2, p. 329-37, 1993.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGO**

**ARTIGO 1 - Exposição prévia a progesterona ao protocolo de sincronização da ovulação aumenta o diâmetro folicular e a taxa de prenhez de vacas *Bos indicus* lactantes**

*Artigo*

*publicado*

*na*

*Theriogenology*

**Exposure to progesterone previous to the protocol of ovulation synchronization increases the follicular diameter and the fertility of suckled *Bos indicus* cows**

L. M. S. Simões<sup>A\*</sup>, R. E. Orlandi<sup>A</sup>, J. P. M. Massoneto<sup>B</sup>, L. A. Scandiuzzi Jr<sup>B</sup>, B. G. Freitas<sup>C</sup>,  
M. R. Bastos<sup>C</sup>, J. C. Souza<sup>D</sup>, J. N. S. Sales<sup>A</sup>

<sup>A</sup>Department of Veterinary Medicine, UFLA, Lavras, MG, Brazil

<sup>B</sup>Água Preta Farm, Cocalinho, MT, Brazil

<sup>C</sup>Ouro Fino Saúde Animal, Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>D</sup>Department of Animal Science, UFLA, Lavras, MG, Brazil

\*Correponding autor: Phone: +55 11 98440-4159; E-mail address:  
[luizmanoelss@hotmail.com](mailto:luizmanoelss@hotmail.com) or [znlogan@yahoo.com.br](mailto:znlogan@yahoo.com.br) (L. M. S. Simões)



## Abstract

The objective was to evaluate the effect of injectable progesterone previous to the timed artificial insemination (TAI) protocol on follicular growth, ovulation and pregnancy rate of suckled *Bos indicus* cows. In experiment 1, 10 days before the beginning to TAI protocol (D-10), 431 suckled-anestrus Nelore cows (249 multiparous and 182 primiparous), were allocated to one of three treatments groups (control, P4i and P4iGnRH). At this moment, cows in the P4i and P4iGnRH group received 150 mg of injectable progesterone intramuscularly (Sincrogest injetável®, Ouro Fino, Brazil). On Day 0 (D0), all cows were synchronized using an estradiol/progesterone-based TAI protocol. Simultaneously, in the P4iGnRH group, cows received 10 µg of Busereline intramuscularly (Sincroforte®, Ouro Fino, Brazil). Ultrasound exams were performed to evaluate the diameter of the largest follicle (D0, D8 and D10), ovulation rate and diameter of the corpus luteum (D24). In experiment 2, 681 suckled Nelore cows (356 multiparous and 325 primiparous) were synchronized using an estradiol/progesterone-based TAI protocol and received treatments similar to experiment 1. TAI was performed 48 hours after removal of the progesterone (P4) device. Pregnancy diagnosis was 30 d after TAI. In experiment 3, blood samples were collected to evaluate the progesterone concentration for 168 hours after administration of injectable progesterone intramuscularly. Statistical analyses were performed by GLIMMIX procedure of SAS. In experiment 1, the diameter of the largest follicle (LF) on D10 ( $P=0.21$ ), follicular growth rate ( $P=0.34$ ) and ovulation rate ( $P=0.62$ ) were similar among experimental groups. However, there was difference among groups for the LF on D0 [Control ( $10.9\pm 0.2$  mm)<sup>b</sup>, P4i ( $12.7\pm 0.3$  mm)<sup>a</sup> and P4iGnRH ( $12.6\pm 0.3$  mm)<sup>a</sup>;  $P=0.001$ ], LF on D8 [Control ( $9.7\pm 0.2$  mm)<sup>b</sup>, P4i ( $10.4\pm 0.2$  mm)<sup>a</sup> and P4iGnRH ( $9.9\pm 0.2$  mm)<sup>ab</sup>;  $P=0.05$ ], presence of the CL on D8 [Control 0% (0/136)<sup>b</sup>, P4i 0% (0/140)<sup>b</sup> and P4iGnRH 26.4% (38/144)<sup>a</sup>;  $P=0.001$ ], diameter of the CL on D24 [Control ( $19.7\pm 0.4$  mm)<sup>ab</sup>, P4i ( $20.1\pm 0.4$  mm)<sup>a</sup> and P4iGnRH ( $18.5\pm 0.4$  mm)<sup>b</sup>;  $P=0.001$ ] and pregnancy rate [Control 35.0% (78/223)<sup>b</sup>, P4i 45.9% (105/229)<sup>a</sup> and P4iGnRH 40.6% (93/229)<sup>ab</sup>;  $P=0.01$ ]. The circulating concentration of P4 remained above 1.5 ng/mL until 168 hours after the P4i treatment. In conclusion, the injectable progesterone previous to the TAI protocol increased diameter of the LF on D0 and D8 without interfering on the ovulation rate. Furthermore, such exposure increases the pregnancy rate in suckled Nelore cows.

**Keywords:** anestrus, LH, TAI

## 1. Introduction

The majority of bovine herds in tropical and subtropical areas are composed of *Bos indicus* because of their greater adaptability to the high temperature and humidity, as well as, to the yearly variability in the feed supply [1]. However, the post-partum anestrus period in *Bos indicus* cows maintained in these conditions is long [2], affecting negatively the herd productive and reproductive indexes [3].

Post-partum anestrus is characterized by a normal initial follicular development sustained by FSH release, reduction of the final growth of the dominant follicle and, consequent, absence of ovulation [4]. Such changes in the final follicular growth are due to decrease LH pulsatility after the follicular divergence. Thus, in order for the reestablishment of normal ovarian function, hourly LH pulses are necessary [5]. Some factors contribute to this LH pulsatility reduction and longer post-partum anestrus such as: nutritional stress [6], parity (primiparous versus multiparous) [7] and the presence of the calf [8]. In underfed cows due to the seasonal low supply, a blockage of GnRH secretion and, consequently, of LH release [9] is observed. The reduction in the GnRH secretion occurs as a consequence of the hypothalamic negative feedback promoted by the increased neuropeptide Y concentration [10] and NEFA produced by the mobilization of body fat reserves [11]. Moreover, cows in negative energy balance have high  $\beta$ -hydroxybutyrate and low glucose concentrations which reduce GnRH secretion by the hypothalamus [11, 12]. In addition to the nutritional effects, a calf presence stimulates the secretion endogenous opioid that suppresses the release of GnRH/LH [8, 13, 14]. Thus, the association of low feed supply and the presence of the calf cause expressive reduction on LH pulsatility, follicular growth and final maturation and ovulation [3]. In addition, the effects of calf presence and nutritional stress associated with the increased energy/protein demand required for the growth of primiparous cows impair final follicular growth [15]. In primiparous cows, the mobilization of body fat and the concentrations of NEFA and BHB are higher and further compromise the pulsatility and release of LH, as well as, follicular growth [16].

On the other hand, progesterone and estradiol-based-ovulation synchronization protocols are used on anestrus (postpartum anovulatory waves) *Bos indicus* postpartum cows with adequate results (50% pregnancy rates) [17, 18]. The positive effects of ovulation synchronization protocols in anestrus cows are due to, mainly, the exogenous progesterone stimulus (intravaginal device) on GnRH secretion and LH pulsatility [19], which enables the ovulation of a pre-ovulatory follicle in the early post-partum period [1]. Progesterone reduces the number of estradiol receptors in the hypothalamus interfering with the negative feedback

caused by this hormone on GnRH secretion [20-22]. In addition, the increase of progesterone is essential for the maximum expression of the positive feedback effect of estradiol in inducing the preovulatory GnRH surge in ewes [23]. This effect of progesterone on the response to estradiol occurs due to alterations in the amount and site (mediobasal hypothalamus) of estrogen receptors in the hypothalamus [24]. Progesterone treatment increases estrogen receptors in the regions most sensitive to the effect of estradiol on LH secretion [23, 25]. Moreover, progesterone increases the sensitivity of estrogen alpha receptors in a region of the hypothalamus that is critical for inducing the GnRH surge [26]. However, high concentrations of progesterone for periods longer than 10 days result in the development of larger and longer lasting follicles compared to the natural patterns of growth [27]. Cows with sub-luteal progesterone concentrations develop follicular persistence due to the absence of a pre-ovulatory luteinizing hormone (LH) peak [28]. Thus, persistent follicular oocytes become degenerate due to premature activation [29, 30].

Currently, progesterone and estradiol-based-ovulation synchronization protocols are well established [31, 32]. However, the efficiency of these protocols is around 85% [33], being lower in cows with low BCS at the beginning of the protocol [34] and in primiparous cows due a slow final growth of the dominant follicle that results in smaller follicles at TAI [18]. Thus, in cows not responding to the TAI, the period of exposure to progesterone during the TAI protocol may not be sufficient to increase LH pulsatility necessary for ovulation. In this sense, the objective was to evaluate the possible effect of injectable progesterone previous to the progesterone and estradiol-based-ovulation synchronization protocol on final follicular growth, ovulation and pregnancy rate in suckled *Bos indicus* cows. The hypothesis was that exposure to progesterone before the TAI protocol increases its fertility outcome.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Experiment 1 – Follicular growth in anestrous suckled Nelore cows (Bos indicus)*

#### *2.1.1. Animals and management*

The experiment was conducted in a commercial farm located in northwestern Brazil from February to March 2017. Suckled multiparous (n=249) and primiparous (n=182) Nelore cows with  $2.72 \pm 0.01$  body condition score (BCS) at the onset of the synchronization protocol (multiparous =  $2.66 \pm 0.01$  and primiparous =  $2.79 \pm 0.02$ ; scale, 1 to 5; where 1 =

very thin and 5 = very fat) [35] were used. Cows were maintained on *Brachiaria humidicola* pastures and allowed free access to water and a mineral mix.

### 2.1.2. Experimental design

All cows were allocated to experimental groups between 30 and 50 days postpartum. On Day -10 (D-10), cows were allocated to one of three groups (Control, P4i and P4iGnRH). At this moment, cows in the P4i and P4iGnRH groups received a single dose of 150 mg of long acting progesterone intramuscularly (Sincrogest injetável®, Ouro Fino, Brazil). On Day 0 (D0), all cows were synchronized using an estradiol/progesterone-based TAI protocol and cows received an intravaginal device containing 1 g of progesterone (Sincrogest®, Ouro Fino, Brazil) plus the administration of 2 mg of estradiol benzoate intramuscularly (Sincrodiol®, Ouro Fino, Brazil). Simultaneously, in the P4iGnRH group, cows received 10 µg of Busereline intramuscularly (Sincroforte®, Ouro Fino, Brazil). Eight days later (D8), the device was removed and 500µg of cloprostenol (Sincrocio®, Ouro Fino, Brazil), 300 IU of eCG (SincroeCG®, Ouro Fino, Brazil) and 1 mg of estradiol cypionate intramuscularly (SincroCP®, Ouro Fino, Brazil) were administered. The experimental design is depicted in Figure 1.

On Day -10 and 0, ultrasound examinations were performed (Mindray DP-2200VET, 5-MHz linear transducer, China) in all cows to available presence of the corpus luteum (CL). Cows without visible CL structures on Days -10 and 0 (n=420; multiparous = 244 and primiparous = 176) were considered in anestrus (postpartum anovulatory waves) and then enrolled in the trial. Moreover, ultrasound examinations were performed to measure the diameter of the largest follicle (LF) on Day 0 and to measure the diameter of the LF and the presence of the CL on Days 8 and 10. The final follicular growth rate was calculated based on the difference in LF diameters between Days 8 and 10 divided by two. The percentage of cows ovulating was determined by the presence of the CL 14 days after TAI (D24).

## 2.2. Experiment 2 – Pregnancy per AI in suckled Nelore cows (*Bos indicus*)

### 2.2.1. Animal and management

The experiment was conducted in a commercial farm located in the northwest Brazil, from February to June 2017. A total of 681 suckled multiparous (n = 356) and primiparous (n = 325) Nelore cows, 30 to 60 days postpartum presenting at the onset of the synchronization protocol with a  $2.71 \pm 0.01$  BCS (scale, 1 to 5; where 1 = very thin and 5 = very fat) [35] were

used. Cows were maintained on *Brachiaria humidicola* pasture and allowed free access to water and a mineral mix.

### *2.2.2. Experimental design*

Postpartum suckled cows were allocated into treatment groups according to calving date. All cows were synchronized using an estradiol/progesterone-based TAI protocol and treatments were similar to those described in Section 2.1.2 (experiment 1). In this experiment, the TAI protocol was performed 48 hours after removal of the P4 device. Frozen semen straws of each of the three batch of one sire were homogeneously distributed between experimental groups. All inseminations were performed by the same technician, who had no previous knowledge of cow treatment allocation. Pregnancy exams were conducted by transrectal ultrasonography (Mindray DP-2200VET, 5-MHz linear transducer, China) 30 days after TAI.

## *2.3. Experiment 3 - Circulating P4 profiles*

### *2.3.1. Animals and management*

Experiment 3 was conducted on a commercial farm in state of Mato Grosso, Brazil. Data collection was performed during the spring-summer (November-March) breeding season. Nelore primiparous cows ( $n = 30$ ) with a  $3.27 \pm 0.07$  BCS (scale, 1 to 5; where 1 = very thin and 5 = very fat) [35] were used. Cows were maintained on *Brachiaria humidicola* pastures and allowed free access to water and a mineral mix.

### *2.3.2. Experimental design*

All cows were synchronized using an estradiol/progesterone-based TAI protocol similar to those described in Section 2.1.2 (experiment 1). After synchronization TAI protocol (36 hours after removal of the P4 device), cows were allocated to one of two groups (Control and P4i). At this moment, cows in the Control group received 1 mL of oil vehicle intramuscularly and cows in the P4i group received 150 mg of injectable long acting progesterone intramuscularly (Sincrogest injetável®, Ouro Fino, Brazil).

### *2.3.3. Blood sampling and P4 assay*

Blood samples were collected by jugular venipuncture using evacuated heparinized tubes on timing 0 (before treatment), 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 hours after treatment.

Samples were refrigerated (4 °C) for approximately 1 h, and were then centrifuged (3000 X g for 10 min) and stored at -20 °C until assayed for P4. Serum P4 concentrations were determined using an antibody-coated-tube RIA kit (Coat-A-Count ®, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). The intra-assay coefficient of variation was 4.9%, and assay sensitivity was 0.006 ng/mL.

#### *2.4. Statistical analyses*

Statistical analyses were performed using the Statistical Analysis System for Windows. In experiment 1, the variables evaluated were diameter of the largest follicle on Days 0, 8 and 10, presence of CL on D8, follicular growth rate, ovulation rate and diameter of the CL on D24 and model including treatment (Control, P4i and P4iGnRH), BCS at the first day of the synchronization protocol, parity (multiparous and primiparous) and interactions. Continuous data were tested for normality of the residues and analyzed by the UNIVARIATE procedure (transformed when necessary) and subject to the Bartlett test to assess the homogeneity of variances. The GLIMMIX procedure was used to determine significant differences between groups. All values are expressed as mean  $\pm$  SEM. The presence of CL on D8 and ovulation rate were analyzed using the GLIMMIX procedure as a binomial distribution and expressed as percentages (%). In Experiment 2, the variables initially included in the models for analysis of P/AI were treatment (Control, P4i and P4iGnRH), BCS at the first day of the synchronization protocol, parity (multiparous and primiparous) and interactions. Data were analyzed by a multivariate logistic regression using the LOGISTIC procedure. Variables were removed by backward elimination, based on the Wald statistics criterion when  $P > 0.20$ . Variables included in the final model for analysis of P/AI were treatment, BCS and parity. Adjusted odds ratio (AOR) and 95% confidence interval (CI) were generated during the logistic regression. Results are presented as proportions and AOR. The P/AI was analyzed using the GLIMMIX procedure. The P4 concentrations were analyzed by repeated measures using the MIXED procedure. Significant differences were indicated by the probability of  $P \leq 0.05$ .

### **3. Results**

#### *3.1. Experiment 1 - Follicular growth in anestrous suckled Nelore cows (Bos indicus)*

Cows with a CL at first (Day -10; n = 8; which represented 1.8% of the cows) and second (Day 0; n = 3; which represented 0.7% of the cows) ultrasonic examinations were not

enrolled in the trial. There was no interaction between treatment and explanatory variables, such as BCS ( $P>0.05$ ) and parity ( $P>0.05$ ) on the variables of follicular dynamic. Diameter of the LF on D10 ( $P=0.21$ ), follicular growth between Days 8 and 10 ( $P=0.34$ ), and ovulation rate ( $P=0.62$ ) did not differ between treatments. However, the diameter of the LF on D0 ( $P=0.01$ ) was greater in cows that received injectable progesterone on D-10 (Table 1). In addition, LF diameter on D8 ( $P=0.05$ ) and CL diameter on D24 ( $P=0.01$ ) was greater in cows of P4i group compared to Control group and P4iGnRH, respectively. The P4iGnRH group had a greater number of CLs on Day 8 (26.9 %; Table 1).

### *3.2. Experiment 2 - Pregnancy per AI in suckled Nelore cows (Bos indicus)*

There was no interaction between treatment and explanatory variables, such as BCS ( $P=0.21$ ) and parity ( $P=0.78$ ) on P/AI. There were significant effects of treatment ( $P=0.01$ ), BCS ( $P=0.01$ ) and parity ( $P=0.01$ ) on P/AI (Tables 2 and 3). The P/AI of P4i was 1.68 times higher than the Control group and similar between P4i and P4iGnRH groups and P4iGnRH and control groups. The P/AI was greater in multiparous cows and increased BCS on the first day of the synchronization protocol was associated with increases in P/AI.

### *3.3 Experiment 3 - Circulating P4 profiles*

The maximum P4 concentrations ( $2.1 \pm 0.5$  on Control group and  $3.8 \pm 0.6$  on P4i group;  $P=0.01$ ) were different between the experimental groups. Moreover, there was an interaction between treatment and time (Figure 2). On the P4i group an increase in the circulating progesterone concentration in the first measurement 24 hours after the treatment was observed. Afterwards, a gradual decrease in the circulating P4 concentrations until 168 hours was noted. Nonetheless, the circulating P4 concentrations remained above 1.5 ng/mL up to 7 days. In contrast, the circulating concentration of P4 in the Control group did not vary (plateau) until 120 hours and remained below 1.0 ng/mL. Lastly, P4 concentrations gradually increased due to the formation of a new CL.

## **4. Discussion**

The administration of 150 mg of progesterone 10 days before the TAI protocol increased the follicular diameter at the initiation of the ovulation synchronization protocol (D0), on the day of progesterone device removal (D8) and P/AI. However, these results were not observed in cows receiving GnRH on D0 of the synchronization protocol. In addition, the administration of 150 mg of progesterone maintained the P4 concentration above 1.5 ng/mL

for 7 days, demonstrating that the treatment was effective in increasing P4 concentration. Moreover, GnRH at the onset of TAI protocol increased the proportion of cows with CLs at progesterone device removal. Thus, the hypothesis that the previous progesterone exposure to a progesterone and estradiol-based ovulation synchronization protocol would increase its efficiency in suckled *Bos indicus* cows was accepted.

According to Montiel and Ahuja [3] *Bos indicus* cows have prolonged post-partum anestrus, due mainly to the ovulation failure of the dominant follicle [36] and to low LH pulse frequency [1]. Nutrition, suckling and calf presence are the main factor interfering with GnRH synthesis and release [4]. Undernutrition and the maternal offspring bond influence negatively LH release during post-partum by promoting the release of metabolites and hormones, which will produce a negative feedback blocking hypothalamic GnRH [13, 37].

The circulating concentration of progesterone may control LH pulsatility [21, 38, 39], follicular growth [40] and ovulatory response [41] in cows. Some authors observed that progesterone stimulates LH pulsatility by reducing hypothalamic estradiol receptors and, consequently, the estrogenic negative feedback over GnRH secretion [21]. Thus, progesterone allows greater GnRH secretion and LH pulsatility [42] and, consequently, greater follicular growth [40, 43].

In the present study, previous progesterone administration increased follicular diameter at the removal of the progesterone device probably by the increase in LH pulsatility, as observed in *Bos taurus* cows [44]. However, in cows receiving GnRH, the follicular diameter at P4 device removal was similar to that of the control group in response to the formation of corpus luteum originated from the ovulation of persistent follicles (26%) formed by the previous progesterone exposure. Persistent follicles possess a greater number of LH receptors in the granulosa and theca cells [45], maintaining the ovulatory response to the LH peak [46]. Thus, in some cows of the P4iGnRH group, a CL was formed which associated with the P4 device increased its concentration in the circulation and, consequently, reduced follicular growth. Previous study, the insertion of a P4 device decreased the follicular growth rate in heifers with an active CL due to the higher circulating P4-concentration [40]. Additionally, in cows previously treated with progesterone a greater follicular diameter was observed at the initiation of the ovulation synchronization protocol because the injected progesterone induced the development of larger follicles than the natural pattern for a longer period of time by blocking the occurrence of ovulations [27]. However, the final follicular growth, the diameter of the dominant follicle at TAI and the ovulation rate were not influenced by the previous treatment with progesterone. The pulsatility of anestrus *Bos*



*indicus* cows is low and compromises the final follicular growth [1]. Presently, in TAI protocols eCG is used as a LH support in promoting the final follicular growth and increasing ovulation rates, especially in anestrous primiparous cows or low BCS [17, 18]. Thus, eCG given on the day of P4 device removal, may have interfered with the results of follicular growth and ovulation rate, benefitting control cows, due to the extra gonadotrophic support made available to the follicle.

Progesterone administration previous to the TAI protocol increased 1.68 times the hazard of suckled *Bos indicus* cows to become pregnant during the protocol to synchronize ovulation. Similar results were observed in *Bos taurus* cows receiving intravaginal progesterone before the TAI protocol [44]. During follicular development, granulosa cells of the largest follicle acquire LH receptors and its growth becomes dependent on the stimulus of this gonadotrophin, and not only from FSH [47]. During the period of LH dependence, the rapid increase in developmental potential of the oocyte is important for its competence acquisition [48]. Hence, the adequate secretion of basal LH between follicular divergence and the pre-ovulatory peak of this gonadotrophin is important for the development and maintenance of oocyte quality. Moreover, the low LH pulsatility during this phase observed in deep anestrous cows may impact negatively oocyte quality [49]. Thus, the higher fertility of cows receiving progesterone before the TAI protocol may be a result of better oocyte quality acquired during its development, as a function of adequate LH pulsatility in response to the progesterone.

The category and BCS significantly affected pregnancy rates, as we have previously reported [18]. The difference between parity performances is probably due to a greater energy/protein demand for growth in primiparous cows associated with first lactation requirements and reduced dry matter intake capacity [15]. Body condition scores lower than 2.5 (1 to 5 scale) led to lower TAI pregnancy rates in beef cows [41]. The negative feedback of estradiol on gonadotrophin release is more pronounced in cows with negative energy balance [34]. Therefore, a low BCS at the first day of the synchronization protocol has been correlated with a lower response to TAI [17], lowering fertility [31].

Considering follicular growth and fertility results of cows previously exposed to progesterone, it is concluded that the administration intramuscularly of 150 mg of progesterone 10 days before the TAI protocol increases the diameter of the largest follicle on the day of P4-device removal and the pregnancy rates of lactating *Bos indicus* cows.

**Competing Interests**

None of the authors have any conflict of interest to declare.

**Acknowledgments**

The authors are grateful to Água Preta Farm for allowing the use of their animals and facilities for this study. This research was supported by Ouro Fino Agronegócio (São Paulo, Brazil) and CAPES.

## References

- [1] Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bó GA. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci.* 2004;82-83:479-86.
- [2] Ruiz-Cortes ZT, Olivera-Angel M. Ovarian follicular dynamics in suckled zebu (*Bos indicus*) cows monitored by real time ultrasonography. *Anim Reprod Sci.* 1999;54:211-20.
- [3] Montiel F, Ahuja C. Body condition and suckling as factors influencing the duration of postpartum anestrus in cattle: a review. *Anim Reprod Sci.* 2005;85:1-26.
- [4] Yavas Y, Walton JS. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. *Theriogenology.* 2000;54:25-55.
- [5] Jolly P, McDougall S, A Fitzpatrick L, Macmillan K, W Entwistle K. Physiological effects of undernutrition on postpartum anoestrus in cows. *J Reprod Fertil.* 1995;49:477-92.
- [6] Diskin MG, Mackey DR, Roche JF, Sreenan JM. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci.* 2003;78:345-70.
- [7] Grimard B, Humblot P, Ponter AA, Mialot JP, Sauvant D, Thibier M. Influence of postpartum energy restriction on energy status, plasma LH and oestradiol secretion and follicular development in suckled beef cows. *J Reprod Fertil.* 1995;104:173-9.
- [8] Williams GL, Talavera F, Petersen BJ, Kirsch JD, Tilton JE. Coincident secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in early postpartum beef cows: effects of suckling and low-level increases of systemic progesterone. *Biol Reprod.* 1983;29:362-73.
- [9] Schillo KK. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *J Anim Sci.* 1992;70:1271-82.
- [10] McShane TM, Petersen SL, McCrone S, Keisler DH. Influence of food restriction on neuropeptide-Y, proopiomelanocortin, and luteinizing hormone-releasing hormone gene expression in sheep hypothalami. *Biol Reprod.* 1993;49:831-9.
- [11] DiCostanzo A, Williams JE, Keisler DH. Effects of short- or long-term infusions of acetate or propionate on luteinizing hormone, insulin, and metabolite concentrations in beef heifers. *J Anim Sci.* 1999;77:3050-6.
- [12] Mulliniks JT, Kemp ME, Endecott RL, Cox SH, Roberts AJ, Waterman RC, et al. Does beta-hydroxybutyrate concentration influence conception date in young postpartum range beef cows? *J Anim Sci.* 2013;91:2902-9.
- [13] Williams GL, Gazal OS, Vega GAG, Stanko RL. Mechanisms regulating suckling-mediated anovulation in the cow. *Anim Reprod Sci.* 1996;42:289-97.

- [14] Malven PV, Parfet JR, Gregg DW, Allrich RD, Moss GE. Relationships among concentrations of four opioid neuropeptides and luteinizing hormone-releasing hormone in neural tissues of beef cows following early weaning. *J Anim Sci.* 1986;62:723-33.
- [15] Remond B, Cisse M, Ollier A, Chilliard Y. Slow release somatotropin in dairy heifers and cows fed two levels of energy concentrate. 1. Performance and body condition. *J Dairy Sci.* 1991;74:1370-81.
- [16] Whitaker DA, Goodger WJ, Garcia M, Perera BM, Wittwer F. Use of metabolic profiles in dairy cattle in tropical and subtropical countries on smallholder dairy farms. *Prev Vet Med.* 1999;38:119-31.
- [17] Sales JN, Crepaldi GA, Girotto RW, Souza AH, Baruselli PS. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. *Anim Reprod Sci.* 2011;124:12-8.
- [18] Sales JN, Bottino MP, Silva LA, Girotto RW, Massoneto JP, Souza JC, et al. Effects of eCG are more pronounced in primiparous than multiparous *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology.* 2016;86:2290-5.
- [19] Rhodes FM, Burke CR, Clark BA, Day ML, Macmillan KL. Effect of treatment with progesterone and oestradiol benzoate on ovarian follicular turnover in postpartum anoestrous cows and cows which have resumed oestrous cycles. *Anim Reprod Sci.* 2002;69:139-50.
- [20] Ireland JJ, Roche JF. Development of Antral Follicles in Cattle after Prostaglandin-Induced Luteolysis: Changes in Serum Hormones, Steroids in Follicular Fluid, and Gonadotropin Receptors. *Endocrinology.* 1982;111:2077-86.
- [21] Day ML. Hormonal induction of estrous cycles in anoestrous *Bos taurus* beef cows. *Anim Reprod Sci.* 2004;82-83:487-94.
- [22] Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH, Ginther OJ. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil.* 1992;94:177-88.
- [23] Caraty A, Skinner DC. Progesterone priming is essential for the full expression of the positive feedback effect of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology.* 1999;140:165-70.
- [24] Blache D, Batailler M, Fabre-Nys C. Oestrogen Receptors in the Preoptico-Hypothalamic Continuum: Immunohistochemical Study of the Distribution and Cell Density During Induced Oestrous Cycle in Ovariectomized Ewe. *J Neuroendocrinol.* 1994;6:329-39.

- [25] Blache D, Fabre-Nys CJ, Venier G. Ventromedial hypothalamus as a target for oestradiol action on proceptivity, receptivity and luteinizing hormone surge of the ewe. *Brain Res* 1991;546:241-9.
- [26] Gümen A, Wiltbank MC. An Alteration in the Hypothalamic Action of Estradiol Due to Lack of Progesterone Exposure Can Cause Follicular Cysts in Cattle. *Biol Reprod.* 2002;66:1689-95.
- [27] Diaz PU, Stangaferro ML, Gareis NC, Silvia WJ, Matiller V, Salvetti NR, et al. Characterization of persistent follicles induced by prolonged treatment with progesterone in dairy cows: an experimental model for the study of ovarian follicular cysts. *Theriogenology.* 2015;84:1149-60.
- [28] Short RE, Randel RD, Staigmiller RB, Bellows RA. Factors affecting estrogen-induced LH release in the cow. *Biol Reprod.* 1979;21:683-9.
- [29] Revah I, Butler WR. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J Reprod Fertil.* 1996;106:39-47.
- [30] Ahmad N, Beam SW, Butler WR, Deaver DR, Duby RT, Elder DR, et al. Relationship of fertility to patterns of ovarian follicular development and associated hormonal profiles in dairy cows and heifers. *J Anim Sci.* 1996;74:1943-52.
- [31] Sales JN, Carvalho JB, Crepaldi GA, Cipriano RS, Jacomini JO, Maio JR, et al. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology.* 2012;78:510-6.
- [32] Baruselli PS, Ferreira RM, Colli MHA, Elliff FM, Sá Filho MFd, Vieira LM, et al. Timed artificial insemination: current challenges and recent advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. *Anim Reprod.* 2017;14:558-61.
- [33] Sa Filho MF, Santos JE, Ferreira RM, Sales JN, Baruselli PS. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. *Theriogenology.* 2011;76:455-63.
- [34] Sa Filho OG, Meneghetti M, Peres RF, Lamb GC, Vasconcelos JL. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology.* 2009;72:210-8.
- [35] Ayres H, Ferreira RM, de Souza Torres-Júnior JR, Demétrio CGB, de Lima CG, Baruselli PS. Validation of body condition score as a predictor of subcutaneous fat in Nelore (*Bos indicus*) cows. *Livestock Sci.* 2009;123:175-9.

- [36] Murphy MG, Boland MP, Roche JF. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. *J Reprod Fertil.* 1990;90:523-33.
- [37] Rasby RJ, Wettemann RP, Harms PG, Lusby KS, Wagner JJ. GnRH in the infundibular stalk-median eminence is related to percentage body fat in carcasses of beef cows. *Domest Anim Endocrinol.* 1992;9:71-76.
- [38] Kinder JE, Kojima FN, Bergfeld EG, Wehrman ME, Fike KE. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. *J Animal Sci.* 1996;74:1424-40.
- [39] Cipriano RS, Carvalho BA, Marangoni NR, Nogueira GP. LH and FSH concentration and follicular development in Nellore heifers submitted to fixed-time artificial insemination protocols with different progesterone concentrations. *Anim Reprod Sci.* 2011;127:16-22.
- [40] Carvalho JBP, Carvalho NAT, Reis EL, Nichi M, Souza AH, Baruselli PS. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus*×*Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology.* 2008;69:167-75.
- [41] Bó GA, Baruselli PS, Martínez MF. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci.* 2003;78:307-26.
- [42] Dias FCF, Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ, Adams GP, Singh J. Progesterone concentration, estradiol pretreatment, and dose of gonadotropin-releasing hormone affect gonadotropin-releasing hormone-mediated luteinizing hormone release in beef heifers. *Domest Anim Endocrinol.* 2010;39:155-62.
- [43] Pfeifer LF, Mapletoft RJ, Kastelic JP, Small JA, Adams GP, Dionello NJ, et al. Effects of low versus physiologic plasma progesterone concentrations on ovarian follicular development and fertility in beef cattle. *Theriogenology.* 2009;72:1237-50.
- [44] Bilbao MG, Massara N, Ramos S, Zapata LO, Farcey MF, Pessoa J, et al. Extending the duration of treatment with progesterone and equine chorionic gonadotropin improves fertility in suckled beef cows with low body condition score subjected to timed artificial insemination. *Theriogenology.* 2016;86:536-44.
- [45] Cupp A, Garcia-Winder M, Zamudio A, Mariscal V, Wehrman M, Kojima N, et al. Two concentrations of progesterone (P4) in circulation have a differential effect on pattern of ovarian follicular development in the cow. *Biol Reprod.* 1992;44:64.
- [46] Lucy MC, Thatcher WW, MacMillan KL. Ultrasonic identification of follicular populations and return to estrus in early postpartum dairy cows given intravaginal progesterone for 15 days. *Theriogenology.* 1990;34:325-40.

- [47] Ginther OJ. The theory of follicle selection in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*. 2016;57:85-99.
- [48] Sirard MA. Somatic environment and germinal differentiation in antral follicle: The effect of FSH withdrawal and basal LH on oocyte competence acquisition in cattle. *Theriogenology*. 2016;86:54-61.
- [49] Labrecque R, Vigneault C, Blondin P, Sirard MA. Gene expression analysis of bovine oocytes at optimal coasting time combined with GnRH antagonist during the no-FSH period. *Theriogenology*. 2014;81:1092-100.

**Table 1**

Effects of exposure to progesterone previous to TAI protocol on follicular growth, CL diameter and ovulation rate of anestrus suckled Nelore cows (n=420).

	Control	P4i	P4iGnRH	<i>P</i>
N° of animals	136	140	144	
Ø of LF on Day 0 (mm)	10.9±0.2 <sup>b</sup>	12.7±0.3 <sup>a</sup>	12.6±0.4 <sup>a</sup>	0.001
Ø of LF on Day 8 (mm)	9.7±0.2 <sup>b</sup>	10.4±0.2 <sup>a</sup>	9.9±0.2 <sup>ab</sup>	0.05
Ø of LF on Day 10 (mm)	12.6±0.3	13.0±0.3	12.6±0.3	0.21
Follicular growth rate (mm/day)	1.4±0.1	1.4±0.1	1.3±0.1	0.34
Ovulation rate (%)	78.2 (104/133)	80.3 (110/137)	75.2 (106/141)	0.62
CL presence on Day 8 (%)	0.0 (0/136) <sup>b</sup>	0.0 (0/140) <sup>b</sup>	26.4 (38/144) <sup>a</sup>	0.001
Ø of CL on Day 24 (mm)	19.7±0.4 <sup>ab</sup>	20.1±0.4 <sup>a</sup>	18.5±0.4 <sup>b</sup>	0.001

Ø-diameter, LF-largest follicle, CL-corpora luteum, TAI- timed artificial protocol. Continuous data expressed in mean±SEM. <sup>a-b</sup>Means within a row with different superscripts are different ( $P \leq 0.05$ ).



**Table 2**

Effects of exposure to progesterone previous to TAI protocol, parity, and BCS on P/AI of suckled Nelore cows (n=681) submitted to estradiol/progesterone-based TAI protocols.

	P/AI, % (n/n)	Adjusted OR (95% CI) <sup>a</sup>	<i>P</i>
<b>Treatments</b>			
Control	34.9 (78/223) <sup>b</sup>	Referent <sup>b</sup>	0.01
P4i	45.9 (105/229) <sup>a</sup>	1.68 (1.15-2.48)	
P4iGnRH	40.6 (93/229) <sup>ab</sup>	1.26 (0.89-1.82)	
<b>Parity</b>			
Primiparous	33.9 (110/325)	Referent <sup>b</sup>	0.001
Multiparous	46.6 (166/356)	1.96 (1.42-2.72)	
<b>BCS</b>			
<2.75	33.3 (35/105)	Referent <sup>b</sup>	0.002
≥2.75	41.8 (241/576)	1.92 (1.21-3.05)	

BCS-body condition score. <sup>a</sup>OR, odds ratio; CI, confidence interval.

<sup>b</sup>Referent, reference group for adjusted risk ratio.

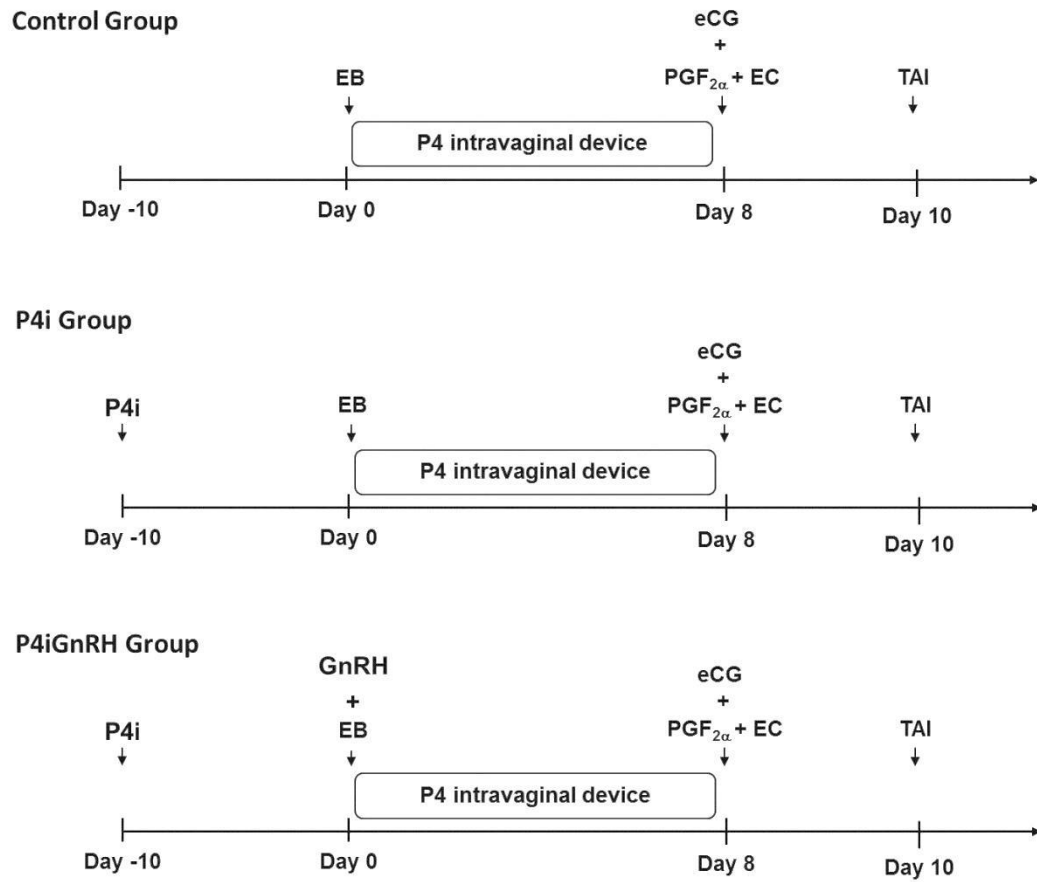
<sup>a-b</sup>Means within a column with different superscripts are different ( $P \leq 0.05$ ).

**Table 3**

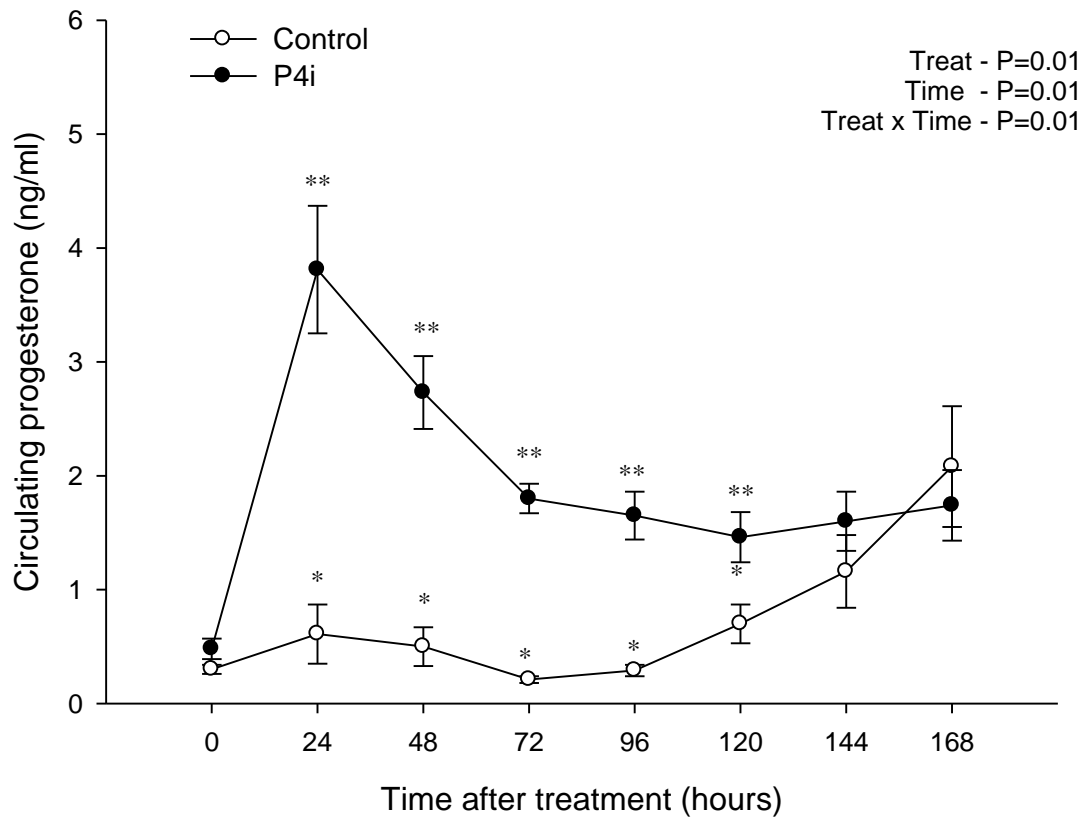
Effects of exposure to progesterone previous to TAI protocol according to parity or to BCS on P/AI of suckled Nelore cows (n=681).

	Control	P4i	P4iGnRH	<i>P</i> *
Parity				0.78
Primiparous	28.4 (29/102)	39.6 (44/111)	33.1 (37/112)	
Multiparous	40.5 (49/121)	51.7 (61/118)	47.9 (56/117)	
BCS				0.21
<2.75	14.8 (4/27)	45.0 (18/40)	34.2 (13/38)	
≥2.75	37.8 (74/196)	46.0 (87/189)	41.9 (80/191)	

BCS-body condition score. \* P-value of interaction between treatment and explanatory variables (parity and BCS).



**Figure 1.** Experimental design. EB - estradiol benzoate, EC - estradiol cypionate, P4 - progesterone, P4i - injectable progesterone, GnRH - busereline.



**Figure 2.** Circulating progesterone (P4) concentrations (mean±SEM) in *Bos indicus* (Nelore) primiparous cows receiving or not 150 mg of injectable long acting progesterone intramuscularly.

**ARTIGO 2 – Exposure to progesterone before the protocol of ovulation synchronization increases the follicular diameter and the fertility of suckled *Bos taurus* cows**

*Artigo formatado segundo as normas da revista Theriogenology*

## Abstract

The objective was to evaluate the effect of injectable progesterone prior to the timed artificial insemination (TAI) protocol on follicular growth, ovulation, and pregnancy rate of suckled *Bos taurus* cows. In experiment 1, the effect of P4i prior to the TAI on follicular dynamics was evaluated in 401 suckled *Bos taurus* cows, at 30–90 days postpartum, with a mean BCS of  $2.75 \pm 0.01$ . In experiment 2, the effect of P4i prior to the FTAI on the pregnancy rate (P/AI) was evaluated in 576 suckled *Bos taurus* cows, at 30–60 days postpartum, with a mean BCS of  $2.69 \pm 0.01$ . On D-10 of both experiments, cows were divided into two experimental groups (Control and P4i). Control cows received 2mg of estradiol benzoate and a progesterone intravaginal device on day 0 (D0). On day 8 (D8), the progesterone device was removed and the cows received 500 $\mu$ g of Cloprostenol, 400 IU of eCG (SincroeCG®, Ouro Fino, Brazil), and 1 mg of estradiol cypionate. In the P4i Group, cows received 150mg of injectable progesterone intramuscularly (Sincrogest Injetável®, Ouro Fino, Brazil) on D-10 and were submitted to the same synchronization protocol as the control group. The TAI was performed 48 hours after the removal of the progesterone device. In experiment 1, ultrasound exams were performed on days 0, 8, 10 and 12 to evaluate the diameter of the largest follicle, follicular growth, ovulation, and double ovulation rates. In experiment 2, pregnancy diagnosis was performed 30 days after the TAI to evaluate the pregnancy rate. Statistical analyses were performed by the GLIMMIX procedure of SAS®. In experiment 1, the diameters of the largest follicles on D0 (Control  $11.6 \pm 0.2$  vs P4i  $13.3 \pm 0.3$ ;  $P = 0.01$ ) and on D8 (Control  $11.3 \pm 0.2$  vs P4i  $11.8 \pm 0.2$ ;  $P = 0.08$ ) were greater in P4i. However, follicular growth was greater in control cows (Control  $1.33 \pm 0.1$  vs. P4i  $1.16 \pm 1.1$ ;  $P = 0.10$ ). In addition, the diameter of the largest follicle on D10 ( $P = 0.84$ ), ovulation ( $P = 0.40$ ) and double ovulation rates ( $P = 0.23$ ) were similar among the experimental groups. In experiment 2, the pregnancy rate was higher in the P4i group [Control 45.6% (259) vs P4i 54.8% (259);  $P = 0.03$ ]. In conclusion, injectable progesterone previously to the TAI protocol increased the diameter of the largest follicles (D0 and D8) and the pregnancy rate in *Bos taurus* suckled beef cows.

**Keywords:** TAI, conception rate, anestrous

## 1. Introduction

In beef cattle systems, greater productivity is directly associated with the reproductive efficiency of the herd. Protocols of synchronization of ovulation, thus, are well consolidated and are used to induce earlier post-partum cyclicity [1]. However, the efficiency of synchronization is variable and usually lower in cows below ideal body condition scores and in the primiparous category [2].

After parturition, the prolonged anestrus period in beef cows reduces the herd reproductive efficiency [3]. The hormonal mechanism related to the low LH pulsatility during this period and commonly is the result of nutritional stress [4], parity (primiparous versus multiparous) [5] and the calf's presence [6]. Such factors may affect the final follicular growth, resulting in patterns of follicular growth that do not lead to ovulation [7]. In cows with compromised energy status due to the low nutrient offer in extensive production systems, a block in the secretion of GnRH and, consequently, of LH is observed [8]. This blockage in the hypophyseal-hypothalamic axis occurs as a consequence of the negative feedback originating from the increases in the non-sterified fatty acid concentrations and of the neuropeptide Y produced by the mobilization of body fat [9, 10]. Moreover, cows under negative energy balance have lower glucose concentrations, which is the major energy metabolite used by the central nervous system [11]. Concomitantly with this scenario, the presence of the calf ensues the liberation of endogenous opioids, suppressing the release of GnRH and LH [6, 12, 13]. In this context, novel hormonal strategies are being developed in order to increase LH pulsatility and, consequently, the efficiency of protocols of ovulation synchronization [14].

Recently, the protocols based on the association of progesterone and estradiol have demonstrated satisfactory results, with pregnancy rates of around 50% [2, 15]. In such protocols, the stimulus by the exogenous progesterone to the GnRH and LH pulsatility [16] leads to the ovulation of a pre-ovulatory follicle in the majority of cows, reducing the prolonged post-partum anestrus period [1]. The action mechanism of progesterone is mediated by the response to estradiol as a result of the alterations in the amount and localization of its receptors in the hypothalamus [17] and by the increase in LH receptors in the granulosa and theca cells of the pre-ovulatory follicle with elevation of the intrafollicular/seric estradiol concentrations [16, 18]. The main advantage,

therefore, of synchronization of ovulation protocols that use progesterone is to anticipate the first ovulation in anestrus cows [19]. However, the efficiency of synchronization is around 85% [20], being lower in cows with low BCS at the initiation of the protocol [21]. Thus, the period of exposure to progesterone during the FTI protocol, in cows that do not respond to the synchronization, may be insufficient to increase the required LH pulsatility for adequate follicular growth and ovulation [14]. In these animals, smaller than ideal follicles compromise the results of ovulation synchronization protocols [22, 23]. Additionally, short luteal phases were observed in cows submitted to the first post-partum ovulation synchronization [24], possibly due to an inadequate period of exposure to progesterone [25]. Recently, the exposition to progesterone for ten days prior to the initiation of the synchronization protocol increased the follicular diameter at the onset of the protocol and the pregnancy risk 1.7 times in suckled *Bos indicus* cows [14]. Considering the facts reviewed, the objective was to evaluate the effect of injectable progesterone previously to the estradiol/progesterone-based-protocol of ovulation synchronization on the final follicular growth, ovulation, and pregnancy rates in suckled *Bos taurus* beef cows. We hypothesized that the exposition to progesterone before the FTI protocol increases the fertility of anestrus *Bos taurus* cows submitted to the synchronization of ovulation.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Experiment 1 - Follicular growth in anestrus suckled (*Bos taurus*) cows

#### 2.1.1. Animals and facilities

The trial was conducted on two commercial farms in Southern Brazil. Multiparous suckled *Bos taurus* cows (Angus and angus crossbreed) in anestrus (n = 401), with a mean body condition score (BCS) of  $2.75 \pm 0.01$  (1-5 scale; [25]) were used. Cows were kept in continuous grazing (native grass) and had free access to water and mineral mix.

#### 2.1.2. Experimental design

Ten days (D-10) before the initiation of the ovulation synchronization protocol, the animals were allocated randomly to one of two experimental groups (Control and P4i). (Ouro Fino, Brazil; Sincrogest injetavel®). On D-10, cows in the P4i group received a single dose of 150mg of long-acting progesterone intramuscularly (IM). On



day 0 (D0), all cows received an intravaginal device containing 1g of progesterone (Sincrogest®, Ouro Fino, Brazil) and 2mg of estradiol benzoate IM (Sincrodiol®, Ouro Fino, Brazil). Eight days later (D8), the intravaginal device was removed and 500µg of cloprostenol (Sincrocio®, Ouro Fino), 1 mg of estradiol cypionate (SincroCP®, Ouro Fino, Brasil) and 400 UI of eCG (SincroeCG®, Ouro Fino, Brasil) were given IM (Figure1).

Ultrasound exams (Mindray DP-2200VET, 5 MHz linear transducer, China) were performed on D-10 and D0 to evaluate the presence of a corpus luteum (CL). Only cows without a visible CL were considered anestrous and included in the experiment. Additionally, on D0, D8 and D10, the diameter of the largest follicle (LF) was recorded by ultrasonography. The final follicular growth rate was calculated by the difference in the diameters of the largest follicle between D8 and D10. The ovulation rate was determined on D12 of the experimental period and was determined by the absence of the LF present on D10.

## *2.2. Experiment 2 - Pregnancy per AI in suckled Bos taurus cows*

### *2.2.1. Animals and facilities*

The trial was conducted on two commercial farms in Southern Brazil. We used anestrous multiparous suckled *Bos taurus* cows (n = 576) with a mean body condition score (BCS) of  $2.69 \pm 0.01$  (1-5 scale) [26] and 30-90 days post-partum. Cows were kept in continuous grazing (native grass) and had free access to water and mineral mix.

### *2.2.2. Experimental design*

Cows were allocated randomly to one of two experimental groups (control and P4i). Cows in the P4i group received a single IM dose of 150mg of long-acting progesterone (Sincrogest injetavel®, Ouro Fino, Brazil) ten days before the start of the ovulation synchronization protocol (D-10). On D10, all cows were synchronized with an estradiol/progesterone-based ovulation synchronization protocol and submitted to the treatments described in section 2.1.2 (experiment 1). The fixed-time artificial insemination was done 48 hours after the removal of the intravaginal device. The artificial insemination (AI) was done by a single technician, unaware of the treatment allocation of the cows. A commercial frozen-thawed sperm with known fertility was distributed evenly among the experimental groups. The pregnancy diagnosis was done

by transrectal ultrasonography (Mindray DP-2200VET, 5 MHz linear transducer, China) 30 days after the TAI (D40).

### *2.2.3. Detection of estrus*

Concurrent with the removal of the intravaginal device (D8), the tail-head (n = 515) was marked with chalk (Raidl-Maxi, RAIDEX GmbH, Dettingen/Erms, Germany). Estrus was deemed to have occurred by the total or partial (90%) removal of any chalk mark remnants at TAI.

### *2.3. Statistical analyses*

Statistical analyses were performed using the Statistical Analysis System for Windows. In experiment 1, the variables evaluated were diameter of the LF on D0, D8 and D10, follicular growth, ovulation and double ovulation rates and the model included treatment (Control and P4i), BCS at the first day of the synchronization protocol and interactions. Continuous data were tested for normality of the residues and analyzed by the UNIVARIATE procedure (transformed when necessary) and subject to the Bartlett test to assess the homogeneity of variances. The GLIMMIX procedure was used to determine significant differences between groups. All values are expressed as means  $\pm$  SEM. Rates were analyzed using the GLIMMIX procedure as binomial distributions and expressed as percentages (%). In Experiment 2, the variables initially included in the model for analysis of P/AI were treatment (Control and P4i), BCS at the first day of the synchronization protocol, occurrence of estrous, bull and interactions. Data were analyzed by a multivariate logistic regression using the LOGISTIC procedure. Variables were removed by backward elimination, based on the Wald statistics criterion when  $P > 0.20$ . Variables included in the final model for analysis of P/AI were treatment, BCS and occurrence of estrous. Adjusted odds ratio (AOR) and 95% confidence interval (CI) were generated during the logistic regression. Results are presented as proportions and AOR. The P/AI was analyzed using the GLIMMIX procedure. Significant differences were indicated by the probability of  $P \leq 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Experiment 1 - Follicular growth in anestrous suckled (*Bos taurus*) cows

Treatments had similar LF diameter on Day 10 ( $P = 0.84$ ), follicular growth between Days 8 and 10 ( $P = 0.14$ ), ovulation ( $P = 0.40$ ), and double ovulation rates ( $P = 0.23$ ). However, diameters of the LF on Day 0 ( $P = 0.01$ ) and on Day 8 were greater ( $P = 0.06$ ) in cows receiving injectable progesterone on D-10 (Table 1).

#### 3.2. Experiment 2 - Pregnancy per AI in suckled *Bos taurus* cows

There was no interaction between treatment and BCS ( $P = 0.32$ ) on P/AI. There were significant effects of treatment ( $P = 0.03$ ), estrous expression ( $P = 0.0001$ ), and BCS ( $P = 0.01$ ) on P/AI (Table 2). The P/AI of P4i was 1.48 times higher than the control group.

### 4. Discussion

The administration of 150 mg of long-acting progesterone 10 days before the beginning of an ovulation synchronization protocol increases the follicular diameter at the onset of the TAI protocol, at the moment of the progesterone intravaginal device removal, and the gestation rate of suckled *Bos taurus* cows. Thus, the hypothesis that progesterone administration prior to ovulation synchronization improves fertility in suckled *Bos taurus* cows was accepted.

The greater follicular diameter at the start of the ovulation synchronization protocol in cows previously treated with long-acting progesterone observed may be associated with the formation of persistent follicles. Thus, follicles exposed to progesterone during prolonged periods become persistent because of an LH pre-ovulatory peak blockage at the hypophyseal level promoted by the circulating progesterone [27]. Furthermore, prolonged progesterone exposure may increase the frequency of LH pulses in anestrous cows [28, 29], allowing for greater follicular development. Accordingly, progesterone reduces the concentration of hypothalamic estradiol receptors [29], and consequently, GnRH and LH pulsatility [28, 30]. Additionally, follicles exposed to a longer progesterone environment possess higher LH-receptor concentrations in the granulosa and theca cells [25], increasing the follicular steroidogenic capacity and development. Thus, as demonstrated in other studies of previous progesterone exposure [14, 30], the diameter of the follicle at

intravaginal device removal was larger in cows receiving progesterone. Exposure to progesterone prior to the TAI protocol had no effect on the follicular diameter at TAI and on the follicular growth between D8 and the TAI. These findings may be correlated to the positive effects of eCG on synchronization protocols since eCG is a molecule with high affinity for LH receptors [31].

The pregnancy rate was 1.48 times higher in cows treated with 150mg of long-acting progesterone 10 days before D0 of the TAI protocol. Similar results were reported in *Bos indicus* cows [14] previously exposed to long-acting progesterone and in *Bos taurus* cows [30] receiving an intravaginal progesterone device 10 days before the TAI protocol. These findings demonstrate that a prolonged exposure to progesterone has a positive impact on the fertility of beef cows. In early postpartum, approximately 20% of beef cows have earlier luteolysis, around 14 days after the first ovulation [32]. Early luteolysis (short cycle) is correlated to the concentrations of estrogen and oxytocin receptors in the endometrium [33]. In cows not previously exposed to progesterone in the immediately preceding estrus cycle (first post-partum ovulation or a pre-pubertal heifer entering puberty), an earlier expression (10–13 days after ovulation) and an increase in estrogen and oxytocin receptors in the endometrium result in an early prostaglandin F<sub>2α</sub>. Cows exposed to progesterone previously to the first post-partum ovulation have a lower incidence of short cycles [34]. Additionally, longer periods of exposure to progesterone may increase LH pulsatility and, consequently, follicular growth, pre-ovulatory follicle diameter, and the concentration of estradiol. Thus, cows with greater estradiol concentrations have lower concentration of endometrial oxytocin receptors at the beginning of the luteal phase, which reduces the incidence of short cycles [33]. In the same manner, the greater fertility of cows previously exposed to progesterone may be correlated to lower short cycle incidence and greater concentrations of estradiol during proestrus (largest follicle on D8), which improves the uterine environment favoring conception and early embryo development.

In the current study, the higher fertility observed in cows expressing estrus during the FTI protocol and of adequate BCS has also been demonstrated by other authors [14, 23, 35, 36]. Estrus expression alters the gene expression profile in the endometrium, improving gamete transport for fertilization and embryo development [37]. Additionally, lower BCS-cows have reduced follicular diameter at progesterone device removal, lower estrus expression, and lower pregnancy rates after the synchronization of ovulation [22, 38, 39]. In smaller follicles, the proestrus estradiol

concentration is lower, CLs are smaller, and the diestrus progesterone concentrations are also lower [22]. Such factors negatively impact the preparation of the uterine environment for the fertilization events, the maintenance, and the establishment of pregnancy [23, 37].

In conclusion, the administration of long-acting progesterone 10 days before the start of the ovulation synchronization protocol increases the diameter of the largest follicle at the removal of the progesterone device and the pregnancy rate of suckled *Bos taurus* cows.

### **Competing Interests**

None of the authors have any conflict of interest to declare.

### **Acknowledgments**

The authors are grateful to Pangare and Ressaco Farms for allowing the use of their animals and facilities for this study. This research was supported by Ouro Fino Agronegócio (São Paulo, Brazil), ZN Consultoria e Pesquisa, CAPES and FAPEMIG.

## References

- [1] Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bó GA. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Animal reproduction science*. 2004;82-83:479-86.<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.025>
- [2] Sales JN, Bottino MP, Silva LA, Giroto RW, Massoneto JP, Souza JC, et al. Effects of eCG are more pronounced in primiparous than multiparous *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology*. 2016;86:2290-5.<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.07.023>
- [3] Montiel F, Ahuja C. Body condition and suckling as factors influencing the duration of postpartum anestrus in cattle: a review. *Animal reproduction science*. 2005;85:1-26.<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.11.001>
- [4] Diskin MG, Mackey DR, Roche JF, Sreenan JM. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Animal reproduction science*. 2003;78:345-70.[https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(03\)00099-x](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(03)00099-x)
- [5] Grimard B, Humblot P, Ponter AA, Mialot JP, Sauvant D, Thibier M. Influence of postpartum energy restriction on energy status, plasma LH and oestradiol secretion and follicular development in suckled beef cows. *J Reprod Fertil*. 1995;104:173-9.<https://doi.org/10.1530/jrf.0.1040173>
- [6] Williams GL, Talavera F, Petersen BJ, Kirsch JD, Tilton JE. Coincident secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in early postpartum beef cows: effects of suckling and low-level increases of systemic progesterone. *Biology of reproduction*. 1983;29:362-73.<https://doi.org/10.1095/biolreprod29.2.362>
- [7] Yavas Y, Walton JS. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. *Theriogenology*. 2000;54:25-55.[https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(00\)00323-x](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(00)00323-x)
- [8] Schillo KK. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *J Anim Sci*. 1992;70:1271-82.<https://doi.org/10.2527/1992.7041271x>
- [9] DiCostanzo A, Williams JE, Keisler DH. Effects of short- or long-term infusions of acetate or propionate on luteinizing hormone, insulin, and metabolite concentrations in beef heifers. *J Anim Sci*. 1999;77:3050-6.<https://doi.org/10.2527/1999.77113050x>
- [10] McShane TM, Petersen SL, McCrone S, Keisler DH. Influence of food restriction on neuropeptide-Y, proopiomelanocortin, and luteinizing hormone-releasing hormone gene expression in sheep hypothalami. *Biology of reproduction*. 1993;49:831-9.<https://doi.org/10.1095/biolreprod49.4.831>

- [11] Gazal OS, Leshin LS, Stanko RL, Thomas MG, Keisler DH, Anderson LL, et al. Gonadotropin-releasing hormone secretion into third-ventricle cerebrospinal fluid of cattle: correspondence with the tonic and surge release of luteinizing hormone and its tonic inhibition by suckling and neuropeptide Y. *Biology of reproduction*. 1998;59:676-83.<https://doi.org/10.1095/biolreprod59.3.676>
- [12] Malven PV, Parfet JR, Gregg DW, Allrich RD, Moss GE. Relationships among concentrations of four opioid neuropeptides and luteinizing hormone-releasing hormone in neural tissues of beef cows following early weaning. *J Anim Sci*. 1986;62:723-33.<https://doi.org/10.2527/jas1986.623723x>
- [13] Williams GL, Gazal OS, Vega GAG, Stanko RL. Mechanisms regulating suckling-mediated anovulation in the cow. *Animal reproduction science*. 1996;42:289-97.[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01531-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01531-X)
- [14] Simões LMS, Orlandi RE, Massoneto JPM, Scandiuzzi LA, Jr., Freitas BG, Bastos MR, et al. Exposure to progesterone previous to the protocol of ovulation synchronization increases the follicular diameter and the fertility of suckled *Bos indicus* cows. *Theriogenology*. 2018;116:28-33.<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.04.031>
- [15] Sales JN, Crepaldi GA, Giroto RW, Souza AH, Baruselli PS. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. *Animal reproduction science*. 2011;124:12-8.<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.007>
- [16] Rhodes FM, Burke CR, Clark BA, Day ML, Macmillan KL. Effect of treatment with progesterone and oestradiol benzoate on ovarian follicular turnover in postpartum anoestrous cows and cows which have resumed oestrous cycles. *Animal reproduction science*. 2002;69:139-50.[https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(01\)00141-5](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(01)00141-5)
- [17] Blache D, Batailler M, Fabre-Nys C. Oestrogen receptors in the preoptico-hypothalamic continuum: immunohistochemical study of the distribution and cell density during induced oestrous cycle in ovariectomized ewe. *J Neuroendocrinol*. 1994;6:329-39.<https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.1994.tb00590.x>
- [18] Gümen A, Wiltbank MC. An alteration in the hypothalamic action of estradiol due to lack of progesterone exposure can cause follicular cysts in cattle. *Biology of reproduction*. 2002;66:1689-95.<https://doi.org/10.1095/biolreprod66.6.1689>
- [19] Bó GA, Baruselli PS, Martínez MF. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal reproduction science*. 2003;78:307-26.[https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(03\)00097-6](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(03)00097-6)

- [20] MF SF, Santos JE, Ferreira RM, Sales JN, Baruselli PS. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. *Theriogenology*. 2011;76:455-63.<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.022>
- [21] OG SF, Meneghetti M, Peres RF, Lamb GC, Vasconcelos JL. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology*. 2009;72:210-8.<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.02.008>
- [22] Pugliesi G, Santos FB, Lopes E, Nogueira É, Maio JR, Binelli M. Improved fertility in suckled beef cows ovulating large follicles or supplemented with long-acting progesterone after timed-AI. *Theriogenology*. 2016;85:1239-48.<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.12.006>
- [23] MF SF, Gonella-Diaza AM, Sponchiado M, Mendanha MF, Pugliesi G, Ramos RDS, et al. Impact of hormonal modulation at proestrus on ovarian responses and uterine gene expression of suckled anestrous beef cows. 2017;8:79.<https://doi.org/10.1186/s40104-017-0211-3>
- [24] Núñez-Olivera R, de Castro T, García-Pintos C, Bó G, Piaggio J, Menchaca A. Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol' based treatment in postpartum anestrous beef cattle. *Animal reproduction science*. 2014;146:111-6.<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.02.017>
- [25] Inskeep EK, Braden TD, Lewis PE, Garcia-Winder M, Niswender GD. Receptors for luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in largest follicles of postpartum beef cows. *Biology of reproduction*. 1988;38:587-91.<https://doi.org/10.1095/biolreprod38.3.587>
- [26] Ayres H, Ferreira RM, Torres-Junior JR, Demetrio CG, Sa Filho MF, Gimenes LU, et al. Inferences of body energy reserves on conception rate of suckled Zebu beef cows subjected to timed artificial insemination followed by natural mating. *Theriogenology*. 2014;82:529-36.<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.04.026>
- [27] Diaz PU, Stangaferro ML, Gareis NC, Silvia WJ, Matiller V, Salvetti NR, et al. Characterization of persistent follicles induced by prolonged treatment with progesterone in dairy cows: an experimental model for the study of ovarian follicular cysts. *Theriogenology*. 2015;84:1149-60.<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.06.015>
- [28] Dias FCF, Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ, Adams GP, Singh J. Progesterone concentration, estradiol pretreatment, and dose of gonadotropin-releasing hormone affect gonadotropin-releasing hormone-mediated luteinizing hormone release in beef heifers.



- Domestic Animal Endocrinology. 2010;39:155-62.<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2010.04.002>
- [29] Day ML. Hormonal induction of estrous cycles in anestrous *Bos taurus* beef cows. Animal reproduction science. 2004;82-83:487-94.<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.002>
- [30] Bilbao MG, Massara N, Ramos S, Zapata LO, Farcey MF, Pessoa J, et al. Extending the duration of treatment with progesterone and equine chorionic gonadotropin improves fertility in suckled beef cows with low body condition score subjected to timed artificial insemination. Theriogenology. 2016;86:536-44.<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.02.003>
- [31] De Rensis F, López-Gatius F. Use of equine chorionic gonadotropin to control reproduction of the dairy cow: a review. Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene. 2014;49:177-82.<https://doi.org/10.1111/rda.12268>
- [32] Inskip EK. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. J Anim Sci. 2004;82 E-Suppl:E24-39.[https://doi.org/10.2527/2004.8213\\_supplE24x](https://doi.org/10.2527/2004.8213_supplE24x)
- [33] Mann GE, Lamming GE. The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrous cycle in the cow. Animal reproduction science. 2000;64:171-80.[https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00205-0](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00205-0)
- [34] Taponen J, Kulcsár M, Katila T, Kátai L, Huszenicza G, Rodríguez-Martínez H. Short estrous cycles and estrous signs after premature ovulations induced with cloprostenol and gonadotropin-releasing hormone in cyclic dairy cows. Theriogenology. 2002;58:1291-302.[https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)00957-3](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00957-3)
- [35] Bosolasco D, Nuñez-Olivera R, de Brun V, Meikle A, Menchaca A. Estradiol cypionate administered at the end of a progesterone-based protocol for FTAI induces ovulation and improves postovulatory luteal function and uterine environment in anestrous beef cows. Theriogenology. 2021;162:74-83.<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.01.003>
- [36] Bottino MP, Simões LMS, Silva L, Giroto RW, Scandiuzzi LA, Jr., Massoneto JPM, et al. Effects of eCG and FSH in timed artificial insemination treatment regimens on estrous expression and pregnancy rates in primiparous and multiparous *Bos indicus* cows. Animal reproduction science. 2021;228:106751.<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106751>
- [37] Davoodi S, Cooke RF, Fernandes AC, Cappellozza BI, Vasconcelos JL, Cerri RL. Expression of estrus modifies the gene expression profile in reproductive tissues on Day 19 of

gestation in beef cows. *Theriogenology*. 2016;85:645-55.<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.002>

[38] Thatcher WW, Moreira F, Santos JEP, Mattos RC, Lopes FL, Pancarci SM, et al. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology*. 2001;55:75-89.[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00447-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00447-7)

[39] Vasconcelos JL, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank MC. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*. 2001;56:307-14.[https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00565-9](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00565-9)

**Table 1**

Effects of exposure to progesterone prior to the TAI protocol on the follicular diameter, follicular growth and ovulation rate of anestrous suckled *Bos taurus* cows (n=401).

	Control	P4i	<i>P</i>
N° of animals	201	200	
Ø of LF (mm)			
Day 0	11.6±0.2	13.3±0.3	0.01
Day 8	11.3±0.2	11.8±0.2	0.08
Day 10	13.9±0.3	13.9±0.3	0.84
Follicular growth rate (mm/day)	1.34±0.1	1.20±0.1	0.14
Ovulation rate (%)	73.8 (76/103)	77.7 (80/103)	0.40
Double Ovulation Rate (%)	3.9 (4/102)	1.0 (1/100)	0.23

Ø-diameter, LF-largest follicle, TAI- timed artificial protocol. Continuous data expressed in means±SEM and binomial data expressed in percentage (%).

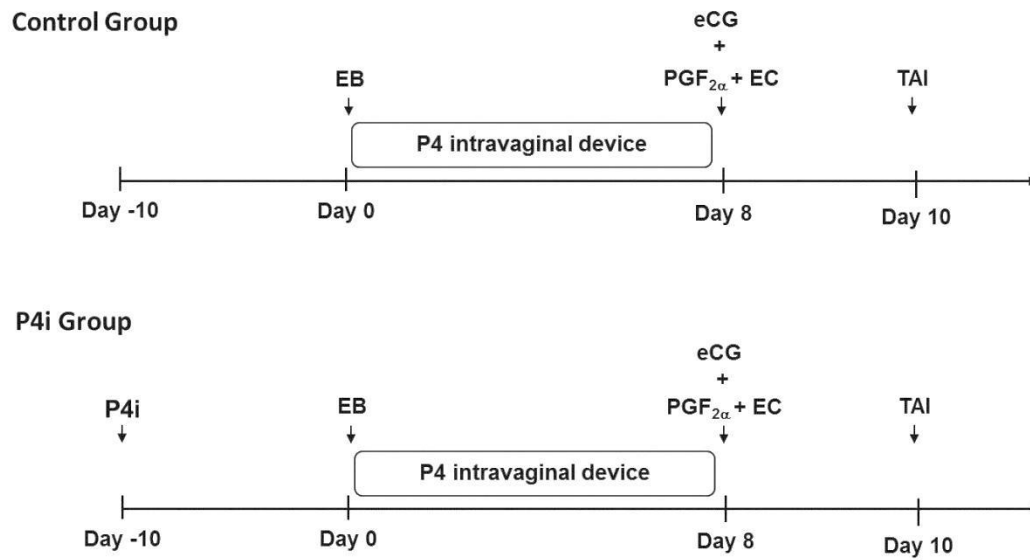
**Table 2**

Effects of exposure to progesterone prior to the TAI protocol, occurrence estrous, and BCS on P/AI of suckled *Bos taurus* cows (n=576) submitted to estradiol/progesterone-based TAI protocols.

	P/AI, % (n/n)	Adjusted OR (95% CI) <sup>a</sup>	<i>P</i>
<b>Treatments</b>			
Control	46.2 (133/288)	Referent <sup>b</sup>	0.03
P4i	55.6 (160/288)	1.48 (1.03-2.12)	
<b>Estrus occurrence</b>			
No estrous	25.0 (27/108)	Referent <sup>b</sup>	0.0001
Estrous	56.5 (230/407)	3.95 (2.44-6.38)	
<b>BCS</b>			
<2.75	45.7 (80/175)	Referent <sup>b</sup>	0.10
≥2.75	53.1 (213/401)	1.35 (0.94-1.92)	

BCS-body condition score. <sup>a</sup>OR, odds ratio; CI, confidence interval.

<sup>b</sup>Referent, reference group for adjusted risk ratio.



**Figure 1.** Experimental design. EB - estradiol benzoate, EC - estradiol cypionate, P4 - progesterone, P4i - injectable progesterone

**Artigo 3 - Exposição prévia à progesterona injetável ao protocolo de sincronização da ovulação não substitui a eCG em protocolo de sincronização da ovulação.**

*Artigo escrito nas normas da revista Theriogenology*

## Resumo

O objetivo foi avaliar o efeito da substituição de eCG por progesterona injetável antes do protocolo de IATF na dinâmica folicular e P/IA de 446 vacas Nelore lactantes. No experimento 1, dez dias antes do protocolo de IATF (D-10), as vacas foram alocadas em esquema fatorial 2x2 para receber (P4i e P4ieCG) ou não (Controle e eCG) 150mg de progesterona injetável (Sincrogest injetável, Ouro Fino, Brasil) no D-10 e receber (eCG e P4ieCG) ou não (Controle e P4i) 300UI de eCG (SincroeCG®, Ouro Fino, Brasil) no D8 do protocolo de IATF. Todas as vacas em dia aleatório do ciclo estral (D0), receberam a administração de 2mg de benzoato de estradiol e a inserção de um dispositivo intravaginal de progesterona. No dia 8 (D8), o dispositivo de progesterona foi retirado e administrado 500µg de cloprostenol e 1mg de cipionato de estradiol. A IATF foi realizada 48 horas após a retirada do dispositivo de progesterona. Exames ultrassonográficos foram realizados em D0, D8 e D10 para avaliar o diâmetro do maior folículo (DF) e o crescimento folicular. No experimento 2, avaliou-se o efeito da progesterona injetável antes do protocolo de IATF sobre a taxa de prenhez (P/IA) em 568 vacas Nelore com cria ao pé. No D-10, as vacas foram divididas em dois grupos experimentais (eCG e P4ieCG). As vacas eCG receberam 2mg de benzoato de estradiol e um dispositivo intravaginal de progesterona no dia 0 (D0). No dia 8 (D8), o dispositivo de progesterona foi removido e as vacas receberam 500µg de cloprostenol, 300 UI de eCG (SincroeCG®, Ouro Fino, Brasil) e 1mg de cipionato de estradiol. No Grupo P4ieCG, as vacas receberam 150mg de progesterona injetável (Sincrogest Injetável®, Ouro Fino, Brasil) no D-10 e foram submetidas no D0 ao mesmo protocolo de sincronização do grupo eCG. A IATF foi realizada 48 horas após a remoção do dispositivo de progesterona. Os diagnósticos de gestação nos 2 experimentos foram realizados 30 dias após a IATF. As análises estatísticas foram realizadas pelo procedimento GLIMMIX do SAS. No experimento 1, houve efeitos de interação entre progesterona injetável e eCG para o diâmetro do maior folículo no D10 (Controle 10,2±0,3c; P4i 10,3±0,2c; eCG 11,2±0,3b; P4ieCG 12,3±0,2a; P=0,04) . O diâmetro do maior folículo em D0 (P<0,01) e D8 (P<0,01) foi maior nas vacas que receberam progesterona injetável antes do protocolo de IATF. Além disso, não houve efeito da progesterona injetável em todas as outras variáveis estudadas. O crescimento folicular (P<0,01) e P/IA [No-eCG 25,5% (56/220); eCG 52,7% (119/226); P=0,001] foram maiores nas vacas que receberam eCG e não diferiu entre as vacas que receberam ou não progesterona [No-P4i 36,7% (81/221); P4i 41,8% (94/225); P=0,40]. No experimento 2, a P/IA nas vacas que receberam progesterona injetável antes do protocolo de IATF foi maior [eCG 48,1% (137/285) vs P4ieCG 57,2% (162/283); P=0,03]. Em conclusão, a pré-exposição

à progesterona injetável ao protocolo de IATF aumenta o diâmetro do maior folículo (D0, D8 e D10) e a taxa de prenhez de vacas *Bos indicus* lactantes. No entanto, em vacas *Bos indicus* lactantes, a pré-exposição à progesterona injetável não é adequada para substituir a eCG em protocolos de IATF.

**Palavras-chave:** Progesterona, eCG, concepção, diâmetro folicular



## 1. Introdução

O anestro pós-parto em vacas *Bos indicus* pode ser prologando por aproximadamente 120 dias após o parto. Durante o anestro pós parto, apesar de haver desenvolvimento folicular, não observa-se crescimento folicular final e ovulação do folículo dominante, devido a baixa pulsatilidade de LH ocasionada por fatores como a subnutrição [1] e a presença de bezerros [2]. No entanto, em protocolos de sincronização da ovulação aproximadamente 83% das vacas ovulam após o término do protocolo [3]. Esses resultados são possíveis devido a utilização da gonadotrofina coriônica equina (eCG) no momento da remoção do dispositivo de progesterona com a finalidade de promover o suporte de LH para o crescimento folicular final [3, 4]. Sendo assim, a taxa de crescimento folicular final e a taxa de ovulação são superiores em vacas que recebem a administração de eCG no dia da remoção do dispositivo de progesterona [3]. No entanto, a eCG é uma molécula de origem animal pouco estável com os processos de produção, extração e purificação muito complicados, por ser produzida a partir do soro de éguas prenhes [5]. Além disso, atualmente existem questionamentos quanto ao bem-estar das fêmeas equinas gestantes utilizadas para obter a matéria prima necessária para a produção comercial da eCG.

Estudos recentes vêm demonstrando que um período de exposição mais prolongado à progesterona durante os protocolos de sincronização da ovulação aumenta o diâmetro folicular no momento da remoção do dispositivo de progesterona [6]. Esse maior período de exposição à progesterona estimula o desenvolvimento folicular pela ação direta desse esteróide no hipotálamo, por meio de estímulo não genômico que reduz a sensibilidade das células hipotalâmicas ao estrógeno [7]. Dessa forma, a progesterona estimula a secreção de GnRH e aumenta a pulsatilidade de LH [8].

Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da substituição da eCG no momento da remoção do dispositivo intravaginal de progesterona pela exposição prévia à progesterona injetável ao protocolo de IATF no crescimento folicular final e na taxa de prenhez de vacas *Bos indicus* lactantes. A hipótese do estudo, é que a exposição à progesterona prévia ao protocolo de IATF é capaz de substituir a eCG em programas de sincronização da ovulação em vacas *Bos indicus* lactantes.

## 2. Material e Métodos

## 2.2. Experiment 1- Efeito da substituição da eCG pela exposição prévia de progesterona

### 2.1.1. Animais e instalações

O experimento foi conduzido em uma fazenda comercial localizada no noroeste do Brasil. Vacas Nelore lactantes (n = 446) com  $2,63 \pm 0,01$  escore de condição corporal (ECC) no início do protocolo de sincronização (escala de 1 a 5; onde 1 = muito magra e 5 = muito gorda) [9] foram utilizadas. As vacas foram mantidas em pastagens de *Brachiaria humidicola* e tiveram livre acesso à água e à mistura mineral.

### 2.1.2. Delineamento experimental

Todas as vacas foram alocadas nos grupos experimentais entre 30 e 50 dias pós-parto. No Dia -10 (D-10), as vacas foram alocadas em esquema fatorial 2x2 para receber ou não 150mg de progesterona de longa ação por via intramuscular (Sincrogest injetável, Ouro Fino, Brasil) no D-10 e receberam ou não 300UI de eCG (SincroeCG, Ouro Fino, Brasil) na retirada do dispositivo de progesterona (D8) do protocolo de IATF (grupos Controle, eCG, P4i e P4ieCG). Neste momento (D-10), 150mg de progesterona de longa ação foi administrado nas vacas dos grupos P4i e P4ieCG. No Dia 0 (D0), todas as vacas foram sincronizadas usando um protocolo de IATF baseado em estradiol/progesterona e as vacas receberam um dispositivo intravaginal contendo 1g de progesterona (Sincrogest, Ouro Fino, Brasil) mais a administração de 2mg de benzoato de estradiol por via intramuscular (Sincrodiol, Ouro Fino, Brasil). Oito dias depois (D8), o dispositivo foi removido e foram administrados 500 $\mu$ g de cloprostenol (Sincrocio, Ouro Fino, Brasil) e 1mg de cipionato de estradiol por via intramuscular (SincroCP, Ouro Fino, Brasil). Além disso, no D8, vacas dos grupos eCG e P4ieCG receberam uma dose única de 300UI de eCG por via intramuscular. A IATF foi realizada 48h após a retirada do dispositivo de progesterona em todas as vacas (Figura 1). Todas as inseminações foram realizadas pelo mesmo técnico, que não tinha conhecimento prévio da alocação do tratamento das vacas.

### 2.1.3. Exames ultrassonográficos

Exames ultrassonográficos foram realizados para mensurar o diâmetro do maior folículo nos dias 0, 8 e 10 do período experimental (Figura 1). O crescimento folicular final foi calculado com base na diferença do maior diâmetro folicular entre os dias 8 e

10 dividido por dois. Os diagnósticos de gestação foram realizados por ultrassonografia transretal (Mindray DP-2200VET, transdutor linear de 5 MHz, China) 30 dias após a IATF.

## *2.2. Experimento 2- Efeito da exposição prévia de progesterona na taxa de concepção*

### *2.2.1. Animais e instalações*

O experimento foi conduzido em uma fazenda comercial localizada no noroeste do Brasil. Um total de 568 vacas Nelore lactantes, com 30 a 60 dias pós-parto no início do protocolo de sincronização da ovulação e com ECC de  $2,68 \pm 0,01$  (escala, 1 a 5; onde 1 = muito magra e 5 = muito gorda) [9] foram utilizadas. As vacas foram mantidas em pastagem de *Brachiaria humidicola* e tiveram livre acesso à água e à mistura mineral.

### *2.2.2. Delineamento experimental*

No Dia -10 (D-10), as vacas foram alocadas em um dos dois grupos experimentais (eCG e P4ieCG). Neste momento, as vacas do grupo P4ieCG receberam uma dose única de 150mg de progesterona de longa ação por via intramuscular (Sincrogest injetável®, Ouro Fino, Brasil). No Dia 0 (D0), todas as vacas foram sincronizadas usando um protocolo de IATF à base de estradiol/progesterona e as vacas receberam um dispositivo intravaginal contendo 1g de progesterona (Sincrogest®, Ouro Fino, Brasil) mais a administração de 2mg de benzoato de estradiol por via intramuscular (Sincrodiol®, Ouro Fino, Brasil). Oito dias depois (D8), o dispositivo foi removido e 500µg de cloprostenol (Sincrocio®, Ouro Fino, Brasil), 300UI de eCG (SincroeCG®, Ouro Fino, Brasil) e 1mg de cipionato de estradiol (SincroCP®, Ouro Fino, Brasil) por via intramuscular foram administrados. Neste experimento, a IATF foi realizada 48 horas após a retirada do dispositivo de progesterona. Todas as inseminações foram realizadas pelo mesmo técnico, que não tinha conhecimento prévio da alocação do tratamento das vacas. Os diagnósticos de gestação foram realizados por ultrassonografia transretal (Mindray DP-2200VET, transdutor linear de 5MHz, China) 30 dias após a IATF. O desenho experimental está representado na Figura 2.

### *2.3. Análise estatística*

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Statistical Analysis System (SAS) for Windows. As variáveis contínuas (Experimento 1 - diâmetro do maior folículo nos Dias 0, 8 e 10, crescimento folicular final e modelo incluindo os tratamentos (Controle, eCG, P4i e P4ieCG), ECC no primeiro dia do protocolo de sincronização e interações. Os dados contínuos foram testados quanto à normalidade dos resíduos e analisados pelo procedimento UNIVARIATE (transformados quando necessário) e submetidos ao teste de Bartlett para avaliar a homogeneidade das variâncias. O procedimento GLIMMIX foi usado para determinar diferenças significativas entre os grupos. Todos os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM. Para dados binomiais (P/IA) nos experimentos 1 e 2, as variáveis inicialmente incluídas nos modelos foram tratamento, touro e ECC no primeiro dia do protocolo de sincronização e suas interações. Os dados foram analisados por regressão logística multivariada usando o procedimento LOGISTIC do SAS. As variáveis foram removidas com base no critério estatístico de Wald quando  $P > 0,20$ . Variáveis incluídas no modelo final para a análise de P/IA foram tratamento e ECC. O odds ratio ajustado (ORA) e o intervalo de confiança de 95% (IC) foram gerados durante a regressão logística. Os resultados são apresentados como proporções e ORA. A P/IA foi analisada pelo procedimento GLIMMIX do SAS. Diferenças significativas foram indicadas pela probabilidade de  $P \leq 0,05$ .

## **3. Resultados**

### *3.1. Experimento 1- Efeito da substituição da eCG pela exposição prévia de progesterona*

O diâmetro do maior folículo no D0 ( $P = 0,001$ ) e D8 ( $P = 0,006$ ) foi maior em vacas que receberam a administração de progesterona injetável no D-10 (grupos P4i e P4ieCG; Tabela 1). Além disso, existiu um efeito de interação entre progesterona injetável no D-10 e eCG no D8 para diâmetro do maior folículo no D10 ( $P = 0,04$ ), no qual verificou-se que o diâmetro folicular no D10 aumentou em vacas que receberam eCG e não alterou em vacas que receberam a administração de progesterona injetável no D-10. Em adição, o crescimento folicular final ( $P = 0,001$ , Tabela 1) foi maior em vacas que receberam eCG no D8 (eCG and P4ieCG; Tabela 2).

Não existiu efeito de interação entre progesterona injetável no D-10 e eCG no D8 para P/IA ( $P = 0,36$ ). A P/IA não diferiu entre os grupos sem P4i (Controle and eCG) e com P4i (P4i e P4ieCG;  $P = 0,33$ ; Tabela 2) e foi maior nas vacas que receberam eCG no D8 (eCG e P4ieCG;  $P = 0,0001$ ; Tabela 2). Apesar de não ter havido interação P4i\*eCG, verificou-se tendência ( $P = 0,10$ ) de maior P/IA nas vacas que receberam progesterona injetável e eCG em comparação as vacas que receberam somente eCG no dia da retirada do dispositivo de progesterona (Figura 3).

### 3.2. Experimento 2- Efeito da exposição prévia de progesterona na taxa de concepção

Não existiu efeito de interação entre tratamento e ECC ( $P = 0,76$ ) na P/IA e efeito de ECC ( $P = 0,19$ ) na P/IA (Tabela 2). No entanto, a P/IA das vacas do grupo P4ieCG foi 1,45 vezes maior que a das vacas do grupo eCG ( $P = 0,03$ ; Tabela 2).

## 4. Discussão

Para nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo que avalia a substituição da eCG em protocolos de sincronização da ovulação a base de P4/E2 pela exposição prévia de progesterona injetável em vacas *Bos indicus* lactantes. No presente estudo, vacas que receberam a administração de 150mg de progesterona injetável 10 dias prévios ao início do protocolo de sincronização da ovulação tiveram maior folículo no D0 e no momento da remoção do dispositivo de progesterona. No entanto, o crescimento folicular final e a taxa de prenhez foram maiores nas vacas que receberam a administração de 300UI de eCG no momento da remoção do dispositivo de progesterona. Dessa forma, a exposição prévia de progesterona injetável ao protocolo de sincronização da ovulação não é capaz de substituir a eCG em protocolos de sincronização da ovulação em vacas *Bos indicus* lactantes. Sendo assim, a hipótese do estudo foi rejeitada. No entanto, a fertilidade de vacas *Bos indicus* foi maior quando se associou progesterona injetável com a administração de eCG (Experimento 2) semelhante ao observado em vacas *Bos indicus* [6] e em vacas *Bos taurus* [9].

A exposição prévia de progesterona ao protocolo de IATF tem sido uma alternativa para aumentar a taxa de concepção de vacas *Bos indicus* [6] e de vacas *Bos taurus* com baixo ECC [9]. Nesses estudos, foram observados um maior diâmetro folicular no momento da remoção do dispositivo de progesterona e no momento da IATF. Além disso, a exposição prévia a progesterona teve efeito na P/IA somente em vacas com

baixo ECC [9]. No presente estudo, a exposição prévia de progesterona injetável ao protocolo de IATF aumentou o diâmetro folicular no início do protocolo de sincronização da ovulação (D0) e também no momento da remoção do dispositivo de progesterona (D8). No entanto, a progesterona injetável falhou em promover o crescimento folicular final entre a retirada do dispositivo de progesterona e a IATF. No estudo, esperava-se efeito estimulatório da progesterona injetável sobre a pulsatilidade de LH e sobre o crescimento folicular final, visto que concentrações subluteais de progesterona estimulam a liberação pulsátil de GnRH e, conseqüentemente, de LH [10]. Além disso, o tratamento com progesterona reduz o número de receptores de estrógeno no hipotálamo, e conseqüentemente, o feedback negativo na secreção de GnRH [11]. Em adição, elevadas concentrações de progesterona por mais de 10 dias levam ao desenvolvimento de grandes folículos [12]. Dessa forma, vacas com concentrações subluteais de progesterona desenvolvem persistência folicular devido à ausência de pico de LH [13].

O maior crescimento folicular entre a remoção do dispositivo de progesterona e a IATF nas vacas tratadas com eCG está associado com a alta afinidade da molécula da eCG com receptores de FSH e LH nas células foliculares [3, 14]. Durante o crescimento folicular final, os folículos são dependentes de LH para promover seu desenvolvimento [15]. Dessa forma, quando a eCG se liga ao receptor de LH ou FSH promove maior ativação dessas proteínas transmembranas das células da teca e da granulosa aumentando capacidade esteroidogênia do folículo [8, 16], e conseqüentemente, o desenvolvimento folicular final. Além disso, a eCG possui meia vida longa, e possui estimula a produção de progesterona pelo corpo lúteo por estimular a expressão de proteínas esteroidogênicas, assim como, regula expressão de genes relacionados a biossíntese de colesterol [17].

No presente estudo, o diâmetro folicular foi maior no momento da IATF em vacas que foram expostas previamente a progesterona injetável e que receberam a administração de eCG no momento da remoção do dispositivo de progesterona pelo fato de folículos expostos a ambiente progesterônico possuírem maior capacidade esteroidogênica devido ao aumento no número de receptores de LH nas células da teca e da granulosa [8, 18]. Além disso, estudos demonstraram que vacas com maior diâmetro folicular no momento da IATF tem maior fertilidade em protocolos de sincronização da ovulação [18, 19, 20] devido a maior produção de estradiol pelo folículo [20] e maior produção de progesterona no diestro [18, 19]. Assim, a associação de altas

concentrações de estradiol no proestro e maior concentração de progesterona no diestro melhora o ambiente uterino para o desenvolvimento embrionário inicial [18, 19, 20]. Assim, os efeitos positivos da associação da exposição prévia de progesterona e da administração da eCG na fertilidade de vacas podem ser explicados pelo melhor ambiente uterino, condicionado pelo maior diâmetro folicular durante o proestro e na IATF.

Em conclusão, em protocolos de sincronização da ovulação a base de progesterona e estradiol em vacas *Bos indicus*, a eCG não pode ser substituída pela exposição prévia de progesterona injetável. No entanto, a associação entre exposição prévia de progesterona injetável e eCG pode ser uma alternativa para melhorar o desenvolvimento folicular final e conseqüentemente, a fertilidade de vacas de corte submetidas a protocolos de sincronização da ovulação.

#### **Conflitos de interesse**

Nenhum dos autores tem qualquer conflito de interesse para declarar.

#### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a fazenda Água Preta por permitir o uso de seus animais e instalações para este estudo. Essa pesquisa foi financiada pela Ouro Fino Agronegócio (São Paulo, Brasil), CAPES e FAPEMIG.

## Referências

- [1] Hess B, Lake SL, Scholljegerdes EJ, Weston TR, Nayigihugu V, Molle JDC, et al. Nutritional controls of beef cow reproduction. *J Anim Sci.* 2005;83:E90-E106
- [2] Williams GL, Gazal OS, Vega GAG, Stanko RL. Mechanisms regulating suckling-mediated anovulation in the cow. *Animal reproduction science.* 1996;42:289-97.[https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01531-X](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01531-X)
- [3] Bottino MP, Simões LMS, Silva L, Giroto RW, Scanduzzi LA, Jr., Massoneto JPM, et al. Effects of eCG and FSH in timed artificial insemination treatment regimens on estrous expression and pregnancy rates in primiparous and multiparous *Bos indicus* cows. *Animal reproduction science.* 2021;228:106751.<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106751>
- [4] Sales JN, Bottino MP, Silva LA, Giroto RW, Massoneto JP, Souza JC, et al. Effects of eCG are more pronounced in primiparous than multiparous *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology.* 2016;86:2290-5.<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.07.023>
- [5] Wilsher S, Allen WR. Factors influencing equine chorionic gonadotrophin production in the mare. *Equine veterinary journal.* 2011;43:430-8.<https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.00309.x>
- [6] Simões LMS, Lima EA, Santos APC, Orlandi RE, Bottino MP, Marinho PHA, et al. Effects of the administration of short-acting progesterone and intravaginal progesterone device permanence on follicular dynamics and pregnancy rate of resynchronized *Bos indicus* heifers 14 days after TAI *Animal Reproduction.* 2018;15:331
- [7] Skinner DC, Evans NP, Delaleu B, Goodman RL, Bouchard P, Caraty A. The negative feedback actions of progesterone on gonadotropin-releasing hormone secretion are transduced by the classical progesterone receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1998;95:10978-83.<https://doi.org/10.1073/pnas.95.18.10978>
- [8] Rhodes FM, Burke CR, Clark BA, Day ML, Macmillan KL. Effect of treatment with progesterone and oestradiol benzoate on ovarian follicular turnover in postpartum anoestrous cows and cows which have resumed oestrous cycles. *Animal reproduction science.* 2002;69:139-50
- [9] Bilbao MG, Massara N, Ramos S, Zapata LO, Farcey MF, Pessoa J, et al. Extending the duration of treatment with progesterone and equine chorionic gonadotropin improves fertility in suckled beef cows with low body condition score subjected to timed artificial insemination. *Theriogenology.* 2016;86:536-44.<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.02.003>



- [10] Short RE, Randel RD, Staigmiller RB, Bellows RA. Factors affecting estrogen-induced LH release in the cow. *Biology of reproduction*. 1979;21:683-9
- [11] Day ML. Hormonal induction of estrous cycles in anestrous *Bos taurus* beef cows. *Animal reproduction science*. 2004;82-83:487-94.<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.002>
- [12] Diaz PU, Stangaferro ML, Gareis NC, Silvia WJ, Matiller V, Salvetti NR, et al. Characterization of persistent follicles induced by prolonged treatment with progesterone in dairy cows: an experimental model for the study of ovarian follicular cysts. *Theriogenology*. 2015;84:1149-60.<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.06.015>
- [13] Short RE, Randel RD, Staigmiller RB, Bellows RA. Factors affecting estrogen-induced LH release in the cow. *Biol Reprod*. 1979;21:683-9.
- [14] De Rensis F, López-Gatius F. Use of equine chorionic gonadotropin to control reproduction of the dairy cow: a review. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*. 2014;49:177-82.<https://doi.org/10.1111/rda.12268>
- [15] Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of reproduction*. 1996;55:1187-94.<https://doi.org/10.1095/biolreprod55.6.1187>
- [16] Gümen A, Wiltbank MC. An alteration in the hypothalamic action of estradiol due to lack of progesterone exposure can cause follicular cysts in cattle. *Biology of reproduction*. 2002;66:1689-95.<https://doi.org/10.1095/biolreprod66.6.1689>
- [17] Rigoglio NN, Fátima LA, Hanassaka JY, Pinto GL, Machado ASD, Gimenes LU, et al. Equine chorionic gonadotropin alters luteal cell morphologic features related to progesterone synthesis. *Theriogenology*. 2013;79:673-9.<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.11.023>
- [18] Pugliesi G, Santos FB, Lopes E, Nogueira É, Maio JR, Binelli M. Improved fertility in suckled beef cows ovulating large follicles or supplemented with long-acting progesterone after timed-AI. *Theriogenology*. 2016;85:1239-48.<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.12.006>
- [19] Núñez-Olivera R, Bó GA, Menchaca A. Association between length of proestrus, follicular size, estrus behavior, and pregnancy rate in beef heifers subjected to fixed-time artificial insemination. *Theriogenology*. 2022;181:1-7.<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.12.028>
- [20] Read CC, Edwards JL, Schrick FN, Rhinehart JD, Payton RR, Campagna SR, et al. Preovulatory serum estradiol concentration is positively associated with oocyte ATP and

follicular fluid metabolite abundance in lactating beef cattle.  
2022;100.<https://doi.org/10.1093/jas/skac136>

**Tabela 1**

Efeito da substituição da eCG pela exposição prévia de progesterona à IATF na dinâmica folicular de vacas *Bos indicus* lactantes.

	Controle	eCG	P4i	P4ieCG	P		
					P4i	eCG	P4i*eCG
Nº de animais	110	114	115	116			
Ø do FD (mm)							
Dia 0	9,8±0,2	10,0±0,2	12,1±0,3	12,1±0,3	0,001		
Dia 8	8,9±0,2	8,7±0,2	9,2±0,2	9,7±0,2	0,006		
Dia 10	10,2±0,3 <sup>c</sup>	11,2±0,2 <sup>b</sup>	10,3±0,3 <sup>c</sup>	12,3±0,3 <sup>a</sup>	0,03	0,001	0,04
Crescimento							
follicular							
final	0,73±0,1 <sup>b</sup>	1,21±0,1 <sup>a</sup>	0,70±0,1 <sup>b</sup>	1,34±0,1 <sup>a</sup>	0,34	0,001	0,42
(mm/dia)							

Ø-diâmetro, FD- Maior folículo, IATF- protocolo de inseminação artificial em tempo fixo.

Dados contínuos expressos por média±EPM.

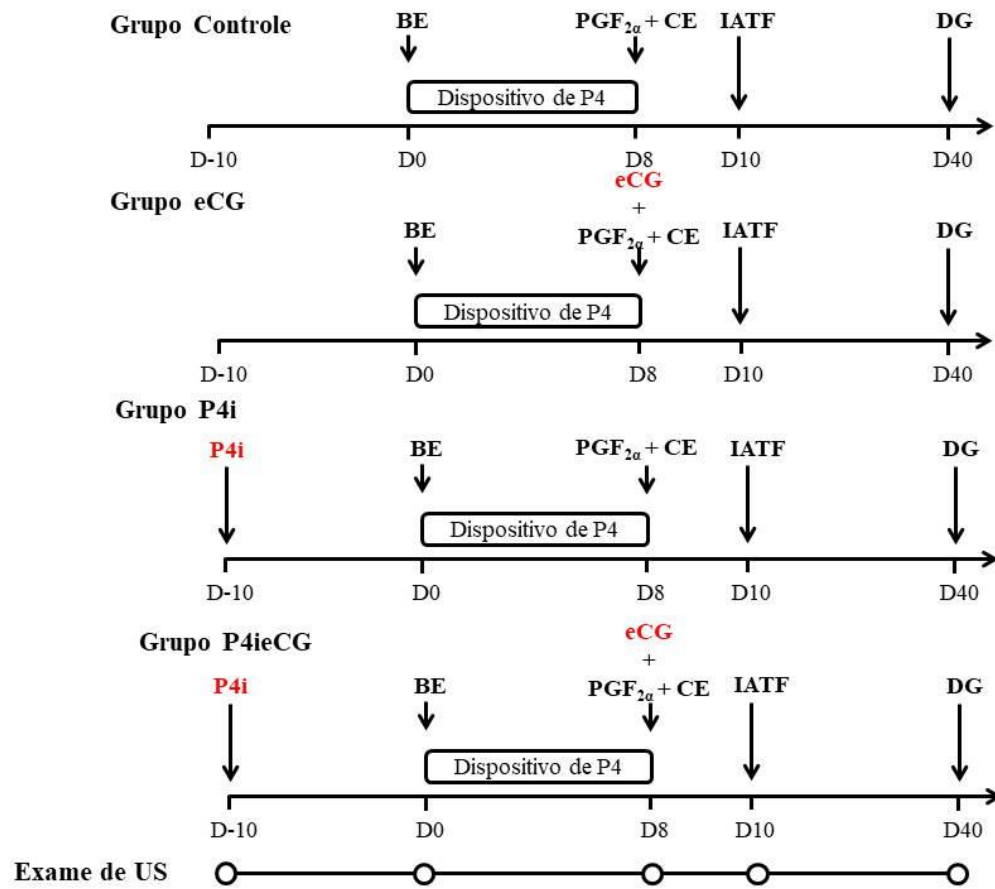
**Tabela 2**

Efeito da substituição da eCG pela exposição prévia de progesterona à IATF na taxa de concepção de vacas *Bos indicus* lactantes.

	P/IA, % (n/n)	OR ajustado (95% IC) <sup>a</sup>	<i>P</i>
Experimento 1			
P4i			
Sem P4i	36,7 (81/221)		0,33
P4i	41,8 (94/225)		
eCG on D8			
Sem eCG	25,5 (56/220)	Referência <sup>b</sup>	0,0001
eCG	52,7 (119/226)	3,30 (2,21-4,93)	
Experimento 2			
P4i			
eCG	48,1 (137/285)	Referência <sup>b</sup>	0,03
P4ieCG	57,2 (162/283)	1,45 (1,04-2,01)	

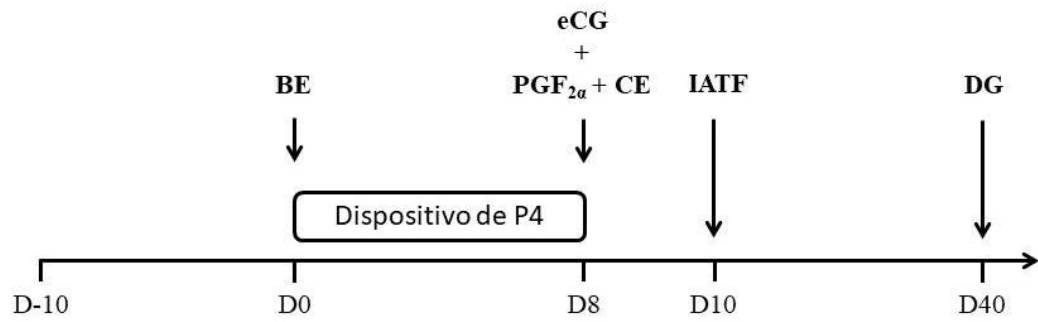
<sup>a</sup>OR, odds ratio; IC, Intervalo de confiança.

<sup>b</sup>Referência, grupo referência para odds ratio ajustado.

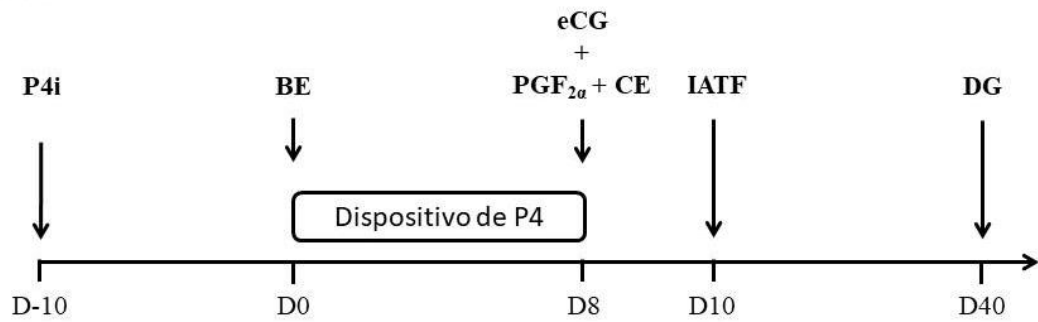


**Figura 1.** Delineamento experimental do Experimento 1.

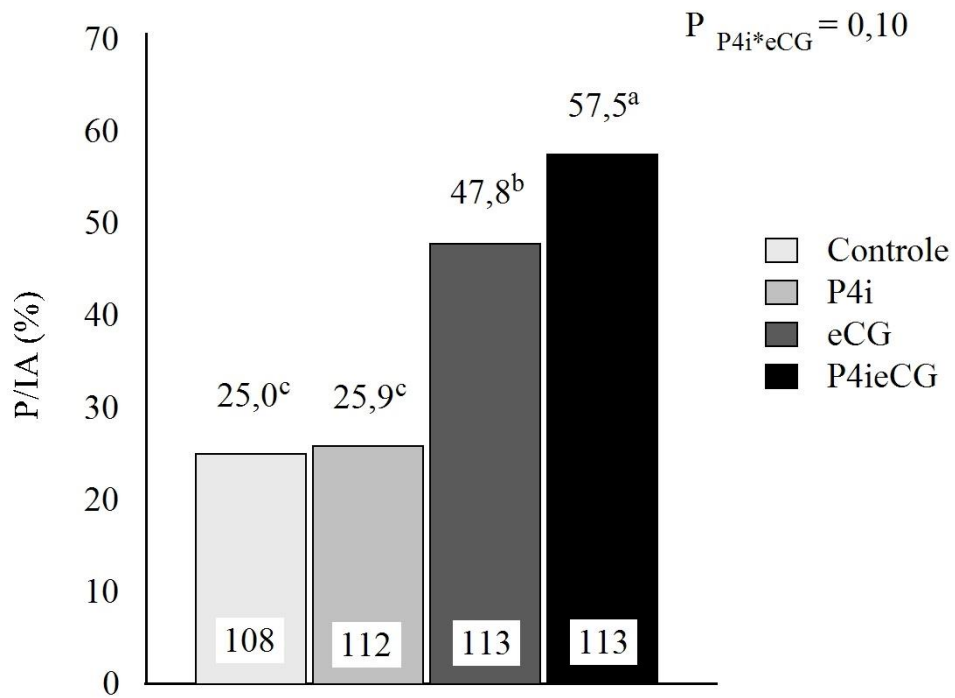
**Grupo eCG**



**Grupo P4ieCG**



**Figura 2.** Delineamento experimental do Experimento 2



**Figura 3.** Efeito da substituição da eCG no D8 do protocolo de IATF pela exposição prévia de progesterona injetável ao protocolo de IATF na taxa de concepção de vacas Nelore lactantes

**Artigo 4 - Exposição prévia à progesterona injetável ao protocolo de sincronização da ovulação modula o útero no momento da IATF em vacas *Bos indicus* lactantes em anestro**

*Artigo escrito nas normas da revista Theriogenology*



## Resumo

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da administração de 150mg de progesterona injetável de longa ação (Sincrogest injetável, Ouro Fino, Brasil) previamente ao protocolo de sincronização da ovulação no diâmetro uterino e na expressão de receptores de progesterona (PGR), de estrógeno (ESR1 e ESR2) e de ocitocina (OXTR) no endométrio uterino no início do protocolo de sincronização da ovulação e no momento da IATF de vacas Nelore (*Bos indicus*) em anestro pós-parto. Vacas Nelore (n=26), com dias pós-parto entre 30 e 60 dias e  $2,71 \pm 0,02$  de escore de condição corporal (ECC) no início do delineamento experimental, foram utilizadas. No dia -10 (D-10), vacas sem corpo lúteo foram alocadas em dois grupos experimentais (controle e P4i). Nesse momento, vacas do grupo P4i receberam a administração de 150mg de progesterona injetável de longa ação (Sincrogest Injetável, Ouro Fino, Brasil). No dia 0 (D0), todas as vacas sem a presença de corpo lúteo foram sincronizadas utilizando protocolo à base de progesterona e estradiol. Assim, vacas receberam um dispositivo intravaginal de 1g de progesterona (Sincrogest, Ouro Fino, Brasil) e administração de 2mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol, Ouro Fino, Brasil). Oito dias depois (D8), o dispositivo foi removido e 500µg de Cloprostenol Sódico (Sincrocio, Ouro Fino, Brasil), 1mg de cipionato de estradiol (SincroCP, Ouro Fino, Brasil) e 300UI de gonadotrofina coriônica equina (SincroCG, Ouro Fino, Brasil) foram administrados. Vacas foram submetidas à coleta de amostras endometriais pela técnica de cytobrush no D-10, D0 e D10 (Figure 1). O RNA foi extraído e abundância de transcritos relacionados à função uterina durante o ciclo estral PGR, ERS1, ERS2 e OXTR foram mensurados por qPCR. Exames ultrassonográficos foram realizados no D-10, D0 e D10 para a mensuração do diâmetro do corpo uterino. O diâmetro uterino no D0 (Controle = 11,1mm vs P4i = 12,5mm; P=0,10) e no D10 (Controle = 13,3mm vs P4i = 15,3mm; P=0,07) teve tendência de ser maior no grupo P4i. No D0 do período experimental, a expressão relativa de PGR (P = 0,18), ESR1 (P = 0,19), ESR2 (P = 0,26) não diferiu entre os grupos experimentais. No entanto, a expressão de OXTR teve tendência de ser maior nas vacas do grupo P4i (P = 0,08). Além disso, a expressão relativa de PGR (P = 0,71), ESR1 (P = 0,75), ESR2 (P = 0,94) e OXTR (P = 0,59) não diferiu entre os grupos experimentais no momento da IATF. No entanto, observou-se que as vacas do grupo P4i tiveram maior aumento na diferença de expressão de ESR1 do D-10 para o D0. Além disso, observou-se que a diferença de expressão de ESR2 do D-10 para a IATF (D10) foi menor nas vacas do grupo P4i (P = 0,05). Conclui-se que a exposição prévia

de progesterona ao protocolo de sincronização da ovulação modula a expressão de receptores de ocitocina e de estrógeno (ESR1 e ESR2) no endométrio uterino e aumenta o diâmetro uterino no início do protocolo de sincronização da ovulação e na IATF.

**Palavras-chave:** endométrio, ocitocina, IATF

## 1.Introdução

Vacas de corte em anestro pós-parto recente normalmente tem menor fertilidade em protocolos de sincronização da ovulação que vacas cíclicas [1] devido em parte a menor pulsatilidade de LH, menor crescimento folicular final [2] e maior ocorrência de ciclos curtos [3]. A exposição prévia de progesterona ao protocolo de IATF tem sido associada com um maior diâmetro folicular no momento da remoção do dispositivo de progesterona [4] e no momento da IATF [5]. Além disso, maior período de exposição à progesterona está associado com maior fertilidade em vacas lactantes em anestro [4]. No entanto, o mecanismo direto de interferência positiva da progesterona injetável na fertilidade ainda não são completamente entendidos.

A progesterona aumenta o número de receptores de LH nas células da teca e da granulosa [6, 7], e conseqüentemente, aumenta a síntese de estradiol pelo folículo [8] interferindo no desenvolvimento folicular. Tal efeito observado em folículos pré ovulatórios aumenta o tamanho do CL [9], as concentrações de progesterona no diestro e na expressão de receptores de estrógeno tipo 1 (ESR1), de IGF-1 (IGF-1R) e de insulina (INSR) no endométrio uterino no dia seis após a ovulação [10]. Assim, a exposição prévia de progesterona poderia melhorar a qualidade uterina por promover maiores folículos no momento da remoção do dispositivo de progesterona e da IATF em protocolos de sincronização da ovulação em vacas de corte em anestro.

Durante o ciclo estral, o endométrio é influenciado principalmente pelos hormônios esteroides (progesterona e estrógeno) para que ocorra o reconhecimento materno da gestação, alongação do concepto, secreção de nutrientes e fatores de crescimento para o desenvolvimento do concepto [11, 12]. Tais mudanças interferem na expressão de receptores de ocitocina (OXTR), progesterona (PGR) e estrógeno (ESR) durante o ciclo estral [13-15]. Além disso, vacas com baixas concentrações de progesterona durante o desenvolvimento do folículo ovulatório possuem alteração na morfologia das glândulas endometriais [16], prejudicando assim a produção de nutrientes e fatores de crescimento para o embrião. Além disso, vacas com ciclo curto possuem menor expressão de receptores de progesterona e maior expressão de receptores de ocitocina no quinto dia após a ovulação [17]. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da exposição prévia de progesterona ao protocolo de sincronização da ovulação em vacas *Bos indicus* lactantes em anestro no diâmetro do corpo uterino e na expressão gênica de receptores de progesterona, ocitocina e de estradiol tipo 1 e 2.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1. Animais e instalações*

O experimento foi conduzido em uma fazenda comercial localizada no sudeste do Brasil. Vacas Nelore paridas (n = 26) com  $2,71 \pm 0,02$  de escore de condição corporal (ECC) no início do delineamento experimental (Escala, 1 a 5; onde 1 = muito magra e 5 = muito gorda) [18] foram utilizadas. As vacas foram mantidas em piquetes de *Brachiaria brizantha* com livre acesso a água e mix mineral.

### *2.2. Delineamento Experimental*

Todas as vacas foram alocadas nos grupos experimentais entre 30 e 50 dias pós-parto. No dia -10 (D-10), vacas sem corpo lúteo foram alocadas em um dos dois grupos experimentais (controle e P4i). Nesse momento, vacas do grupo P4i receberam a administração de 150mg de progesterona injetável de longa ação (Sincrogest Injetável, Ouro Fino, Brasil). No dia 0 (D0), todas as vacas sem a presença de corpo lúteo foram sincronizadas utilizando protocolo à base de progesterona e estradiol que consistiu na inserção de um dispositivo intravaginal de 1g de progesterona (Sincrogest, Ouro Fino, Brasil) e administração de 2mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol, Ouro Fino, Brasil). Oito dias depois (D8), o dispositivo foi removido e 500µg de Cloprostenol Sódico (Sincrocio, Ouro Fino, Brasil), 1mg de cipionato de estradiol (SincroCP, Ouro Fino, Brasil) e 300UI de gonadotrofina coriônica equina (SincroeCG, Ouro Fino, Brasil) foram administrados. As vacas foram submetidas à coleta de amostras endometriais pela técnica de cytobrush no D-10, D0 e D10 (Figura 1).

### *2.3. Exames ultrassonográficos*

Exames ultrassonográficos foram realizados no D-10 e D0 para avaliação da presença de corpo lúteo nos ovários. Além disso, mensuração do diâmetro do corpo uterino foi realizada nos dias -10, 0 e 10 do período experimental por ultrassonografia transretal (Mindray DP-2200 VET, 5MHz linear transucer, China).

### *2.4. Coleta de células endometriais*

Amostras células do epitélio luminal foram coletadas no corpo uterino de cada vaca nos dias -10, 0 e 10 do período experimental (Figura 1) utilizando uma escova citológica (Disposable cytology sampling brush<sup>®</sup>; Viamed Ltd, West Yorkshire, UK)

como descrito na literatura [19]. O aparato foi inserido no corpo uterino via cérvix e o cytobrush rotacionado três vezes no sentido horário no corpo uterino para a coleta de amostras endometriais. Após esse procedimento, o cytobrush foi removido do aparato e colocado em um criotubo de 2mL contendo 1mL de reagente Trizol® (Life Technologies, California, USA) e estocado em nitrogênio líquido para posterior processamento.

### *2.5. Extração de RNA, Síntese de cDNA e qPCR*

O RNA total foi extraído de acordo com o fabricante recomendações, com modificações. Cada amostra contendo 1.000 µL de Trizol foi homogeneizada em vortéx por 5 min. Após esse procedimento, a escova citológica foi removida do criotubo, e este, foi incubado por 5 min em temperatura ambiente antes de adicionar 266 µL de clorofórmio. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 15 segundos e incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente. Após esse procedimento, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 min a 4 °C e o sobrenadante transferido para um tubo de PCR de poliestireno de 2 µL com 333 µL de álcool isopropano, o qual foi incubado por 10 min em temperatura ambiente e -80°C overnight. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à 15.000 x g por 8 min a 4 °C, e o sobrenadante removido com cuidado. Por fim, foram adicionados 600 µL de etanol a 75% ao tubo e centrifugado a 15.000 x g por 5 min à 4°C (este passo foi repetido duas vezes). O sobrenadante era removido, e o pellet foi seco em temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, 20 µL de água ultrapura foram adicionados a 55 °C (as amostras foram homogeneizadas 2 a 3 vezes durante esta etapa) por 15 min. Em seguida, as amostras foram colocadas em gelo para quantificação de RNA por Nanovue.

Após a extração do RNA, o cDNA foi sintetizado a partir de 1000 ng de RNA total (kit de síntese de cDNA de alta capacidade; Life Technologies, São Paulo, Brasil) e a abundância de transcritos foi medida usando SYBR Green qPCR, conforme descrito anteriormente (Step One Plus Real Time System; Life Tech [20]). As curvas de fusão foram obtidas por aumentos escalonados na temperatura de 60 C a 95 C, e apenas pares de primers com curva de fusão contendo um pico agudo e sem pico(s) adicionais foram mantidos nas análises (Tabela 1).

Abundâncias relativas de transcritos foram obtidas após a normalização dos valores de Cq dos genes alvo pela média geométrica da abundância de transcritos dos genes de referência gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e beta-actina

(ACTB), de acordo com a metodologia descrita na literatura [21]. Para selecionar genes de referência, a estabilidade de ACTB e GAPDH foi investigada em todas as amostras usando o suplemento GeNorm versão 3.5 do Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA [22]).

### *2.6. Análise estatística*

A análise estatística foi realizada utilizando o sistema de análises estatísticas para Windows (SAS). O diâmetro uterino e a diferença dos valores dos transcritos entre o D-10 e D0 e D10 foram testados quanto à normalidade dos resíduos pelo procedimento UNIVARIATE e submetidos ao teste de Bartlett's para avaliar a homogeneidade das variâncias (transformados quando necessário por lognormal), de tal modo que atendessem as primícias da análise de variância. O procedimento GLIMMIX foi utilizado para determinar diferença entre os grupos. Para representação gráfica, os dados foram ajustados no D-10. Todos os valores foram expressos em  $\text{media} \pm \text{EPM}$ . O nível de significância para rejeitar  $H_0$  (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que houve efeito das variáveis ou de suas interações. Para nível de significância entre 0,05 e 0,1 considerou-se tendência estatística entre as variáveis comparadas.

## **3. Resultados**

Dois animais do grupo controle foram excluídos do estudo por apresentarem corpo lúteo no D0 do período experimental. O diâmetro uterino no D0 (Controle =  $11,14 \pm 0,67\text{mm}$  vs P4i =  $12,53 \pm 0,53\text{mm}$ ;  $P=0,10$ ) e no D10 (Controle =  $13,30 \pm 0,52\text{mm}$  vs P4i =  $15,30 \pm 0,73\text{mm}$ ;  $P = 0,07$ ; Figura 2) teve tendência de ser maior no grupo P4i.

No D0 do período experimental a expressão relativa de PGR ( $P = 0,18$ ; Figura 3), ESR1 ( $P = 0,19$ ; Figura 4), ESR2 ( $P = 0,26$ ; Figura 5) não diferiram entre os grupos experimentais. No entanto, a expressão de OXTR tendeu a ser maior nas vacas do grupo P4i ( $P = 0,08$ ; Figura 6). Em adição, no dia da IATF a expressão relativa de PGR ( $P = 0,71$ ; Figura 3), ESR1 ( $P = 0,75$ ; Figura 4), ESR2 ( $P = 0,94$ ; Figura 5) e OXTR ( $P = 0,59$ ; Figura 6) não diferiram entre os grupos experimentais. Vacas do grupo P4i tiveram maior aumento na expressão de ESR1 do D-10 para o D0 do que as vacas do grupo controle. Além disso, observou-se que a diferença de expressão de ESR2 do D-10 para a IATF (D10) foi menor nas vacas do grupo P4i ( $P = 0,05$ ).

#### 4. Discussão

Esse é o primeiro estudo que avaliou a expressão de receptores de progesterona (PGR), estrógenos (ESR1 e ESR2) e ocitocina (OXTR) em vacas exposta previamente a progesterona ao protocolo de sincronização da ovulação. Além disso, avaliamos o diâmetro uterino, que segundo [23] há uma relação entre espessura de útero e fertilidade de vacas. Dessa maneira, não se observou diferença na abundância de transcritos de PGR, ESR1, ESR2 no início do protocolo de sincronização da ovulação (D0) e no momento da inseminação (D10). No entanto, a expressão de OXTR no início do protocolo de sincronização da ovulação foi maior em vacas que foram expostas previamente à progesterona. Porém no momento da inseminação a expressão foi semelhante entre os grupos experimentais. Em adição, o diâmetro uterino tendeu a ser maior no início do protocolo de sincronização da ovulação e na IATF nas vacas que receberam a administração de 150mg de progesterona injetável 10 dias prévios ao início do protocolo de IATF. Dessa forma, é possível que o aumento na fertilidade de vacas expostas previamente a progesterona [4], está relacionado com a modulação do ambiente uterino para a concepção e para o desenvolvimento embrionário inicial.

Durante o ciclo estral, a expressão de mRNA para PGR é elevada na fase luteal e as altas concentrações de progesterona inibem a expressão de receptores de estrógeno (ESR1 e ESR2) e de ocitocina (OXTR). No entanto, após um período de altas concentrações de progesterona, a progesterona downregulation os seus receptores no endométrio, e conseqüentemente se reduz o efeito inibitório da progesterona na expressão de receptores de estrógeno [13, 24, 25]. Em vacas que recebem a administração de 150mg de progesterona de longa ação as concentrações de progesterona permanecem acima de 1ng/ml por pelo menos sete dias [4]. Dessa forma, era esperada que a expressão de PGR no início do protocolo de sincronização da ovulação fosse menor em vacas expostas previamente a progesterona, devido à elevada concentração de progesterona liberada pela administração de 150mg de progesterona injetável de longa ação. No entanto, a expressão de PGR no D0 foi semelhante em vacas que receberam e não receberam a administração de 150mg de progesterona injetável. Da mesma forma, a expressão de PGR não foi influenciada pela administração de 300mg de progesterona de longa ação no diestro inicial. Porém, antecipou a abundância de transcritos de receptores de ocitocina [26].

A expressão de receptores de ocitocina no endométrio está relacionada com a síntese de prostaglandinas [27]. Com o aumento das concentrações de estrógeno produzido pelo folículo pré ovulatório, associado ao downregulation de receptores de progesterona e upregulation de ESR1, observa-se um maior estímulo para a expressão de receptores de ocitocina via ativação de ESR1 pelo estrógeno [28, 29]. Em decorrência disso, ocorre liberação de prostaglandina em pulsos para que ocorra a luteólise. Em vacas expostas a progesterona previamente ao protocolo de sincronização da ovulação, é esperado que ocorra um aumento na pulsatilidade de LH, no desenvolvimento folicular e na produção de estradiol no início do protocolo de IATF. Dessa forma, a expressão de ESR1 estimulado pelo estradiol, acelera a expressão de receptores de ocitocina no endométrio [28]. O aumento na expressão de receptores de ocitocina no endométrio estimula a liberação de ácido araquidônico, que é convertido pelas ciclooxygenases 1 e 2 em PGH<sub>2</sub>, que por sua vez é convertida em PGF<sub>2</sub> $\alpha$  [30, 31]. Dessa forma, é esperado que vacas expostas previamente a progesterona tenham uma síntese de prostaglandina no início do protocolo de IATF. A administração de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  no período de espera voluntário de vacas de leite, não tem efeito em reduzir a incidência de endometrite subclínica, porém aumentou a taxa de concepção no primeiro serviço. Além disso, em vacas de baixo escore de condição corporal, a prenhez acumulada aos 300 dias de lactação foi maior em vacas que receberam o tratamento com prostaglandina no período de espera voluntário [32]. Nesse contexto, o aumento na fertilidade de vacas que foram expostas a prostaglandina antes do ciclo estral da concepção pode ser por modificar a morfologia das glândulas endometriais, a composição do leite uterino e/ou a vasodilatação do endométrio, visto que, em suínos a prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  modula genes responsáveis pela angiogênese e pela interação materno/conceito [33] e em humanos a PGF<sub>2</sub> $\alpha$  estimula a proliferação de células endometriais [34]. Além disso, em novilhas classificadas como de alta fertilidade há uma maior expressão de receptores de prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  (PTGFR) nos embriões, demonstrando efeitos positivos da prostaglandina no desenvolvimento embrionário [35].

Além dos resultados encontrados no presente estudo relacionados à expressão de genes no endométrio, observou-se maior diâmetro uterino em vacas que receberam a administração prévia de progesterona. O diâmetro uterino pode ser influenciado pelas concentrações de progesterona e estradiol no qual observa-se maior diâmetro uterino em vacas com altas concentrações de estrógeno e baixas concentrações de progesterona [36]. Alguns autores verificaram que maior espessura do endométrio de vacas



produtoras de leite está correlacionada com maior fertilidade [23], esse aumento na espessura está relacionado com aumento do fluxo sanguíneo endometrial ocasionado principalmente pelo estradiol [37]. Nesse contexto, a maior fertilidade de vacas expostas a progesterona previamente ao protocolo de sincronização da ovulação está correlacionada com a possível maior concentração de estrógeno no início do protocolo de sincronização da ovulação, devido ao maior diâmetro folicular nesse momento [4] que modula a expressão dos receptores de estrógeno e ocitocina no início do protocolo de IATF. Tal condição, permite a produção mais eficiente de prostaglandina que pode estimular a proliferação de células endometriais [34] e/ou estimular o desenvolvimento embrionário [35]. Dessa forma, conclui-se que a exposição prévia de progesterona ao protocolo de sincronização da ovulação modula a expressão de receptores de ocitocina e de estrógeno (ESR1 e ESR2) no endométrio uterino e aumenta o diâmetro uterino no início do protocolo de sincronização da ovulação e na IATF.

#### **Conflitos de interesse**

Nenhum dos autores tem qualquer conflito de interesse para declarar.

#### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a fazenda Eldorado (Candeias-MG) por permitir o uso de seus animais e instalações para este estudo, ao Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular da USP (LFEM-USP) por permitir o uso de suas instalações para a realização das análises de qPCR. Essa pesquisa foi financiada pela Ouro Fino Agronegócio (São Paulo, Brasil), CAPES e FAPEMIG.

## Referências

- [1] Bisinotto RS, Chebel RC, Santos JE. Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. *Journal of dairy science*. 2010;93:3578-87.<https://doi.org/10.3168/jds.2010-3047>
- [2] Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bo GA. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Animal reproduction science*. 2004;82-83:479-86.<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.025>
- [3] Núñez-Olivera R, de Castro T, García-Pintos C, Bó G, Piaggio J, Menchaca A. Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol based treatment in postpartum anestrous beef cattle. *Animal reproduction science*. 2014;146:111-6.<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.02.017>
- [4] Simões LMS, Orlandi RE, Massoneto JPM, Scanduzzi LA, Jr., Freitas BG, Bastos MR, et al. Exposure to progesterone previous to the protocol of ovulation synchronization increases the follicular diameter and the fertility of suckled *Bos indicus* cows. *Theriogenology*. 2018;116:28-33.<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.04.031>
- [5] Bilbao MG, Massara N, Ramos S, Zapata LO, Farcey MF, Pessoa J, et al. Extending the duration of treatment with progesterone and equine chorionic gonadotropin improves fertility in suckled beef cows with low body condition score subjected to timed artificial insemination. *Theriogenology*. 2016;86:536-44.<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.02.003>
- [6] Whitaker DA, Goodger WJ, Garcia M, Perera BM, Wittwer F. Use of metabolic profiles in dairy cattle in tropical and subtropical countries on smallholder dairy farms. *Preventive veterinary medicine*. 1999;38:119-31
- [7] Williams GL, Talavera F, Petersen BJ, Kirsch JD, Tilton JE. Coincident secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in early postpartum beef cows: effects of suckling and low-level increases of systemic progesterone. *Biology of reproduction*. 1983;29:362-73
- [8] Savio JD, Thatcher WW, Badinga L, de la Sota RL, Wolfenson D. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *J Reprod Fertil*. 1993;97:197-203.<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0970197>
- [9] Pugliesi G, Santos FB, Lopes E, Nogueira É, Maio JR, Binelli M. Improved fertility in suckled beef cows ovulating large follicles or supplemented with long-acting

- progesterone after timed-AI. *Theriogenology*. 2016;85:1239-48.<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.12.006>
- [10] Bosolasco D, Nuñez-Olivera R, de Brun V, Meikle A, Menchaca A. Estradiol cypionate administered at the end of a progesterone-based protocol for FTAI induces ovulation and improves postovulatory luteal function and uterine environment in anestrous beef cows. *Theriogenology*. 2021;162:74-83.<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.01.003>
- [11] Geisert RD, Brenner RM, Moffatt RJ, Harney JP, Yellin T, Bazer FW. Changes in oestrogen receptor protein, mRNA expression and localization in the endometrium of cyclic and pregnant gilts. *Reproduction, fertility, and development*. 1993;5:247-60.<https://doi.org/10.1071/rd9930247>
- [12] Gray CA, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW, Spencer TE. Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2002;124:289-300
- [13] Bishop CV. Progesterone inhibition of oxytocin signaling in endometrium. *Frontiers in neuroscience*. 2013;7:138.<https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00138>
- [14] Bisinotto RS, Ribeiro ES, Greco LF, Taylor-Rodriguez D, Ealy AD, Ayres H, et al. Effects of progesterone concentrations and follicular wave during growth of the ovulatory follicle on conceptus and endometrial transcriptome in dairy cows. *Journal of dairy science*. 2022;105:889-903.<https://doi.org/10.3168/jds.2021-20193>
- [15] Domingues RR, Ginther OJ, Gomez-León VE, Wiltbank MC. Up-regulation of endometrial oxytocin receptor is associated with the timing of luteolysis in heifers with two and three follicular waves†. *Biology of reproduction*. 2020;102:316-26.<https://doi.org/10.1093/biolre/ioz165>
- [16] Shaham-Albalancy A, Nyska A, Kaim M, Rosenberg M, Folman Y, Wolfenson D. Delayed effect of progesterone on endometrial morphology in dairy cows. *Animal reproduction science*. 1997;48:159-74.[https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(97\)00037-7](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(97)00037-7)
- [17] Zollers WG, Jr., Garverick HA, Smith MF, Moffatt RJ, Salfen BE, Youngquist RS. Concentrations of progesterone and oxytocin receptors in endometrium of postpartum cows expected to have a short or normal oestrous cycle. *J Reprod Fertil*. 1993;97:329-37.<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0970329>
- [18] Ayres H, Ferreira RM, de Souza Torres-Júnior JR, Demétrio CGB, de Lima CG, Baruselli PS. Validation of body condition score as a predictor of subcutaneous fat in

- Nelore (Bos indicus) cows. *Livestock Science*. 2009;123:175-9.<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2008.11.004>
- [19] Cardoso B, Oliveira ML, Pugliesi G. Cytobrush: A tool for sequential evaluation of gene expression in bovine endometrium. 2017;52:1153-7.<https://doi.org/10.1111/rda.13037>
- [20] Mesquita FS, Pugliesi G, Scolari SC, França MR, Ramos RS, Oliveira M, et al. Manipulation of the periovulatory sex steroidal milieu affects endometrial but not luteal gene expression in early diestrus Nelore cows. *Theriogenology*. 2014;81:861-9.<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.12.022>
- [21] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001;29:e45.<https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- [22] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*. 2002;3:Research0034.<https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
- [23] Souza AH, Silva EP, Cunha AP, Gümen A, Ayres H, Brusveen DJ, et al. Ultrasonographic evaluation of endometrial thickness near timed AI as a predictor of fertility in high-producing dairy cows. *Theriogenology*. 2011;75:722-33.<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.10.013>
- [24] Robinson RS, Mann GE, Lamming GE, Wathes DC. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2001;122:965-79
- [25] Wathes DC, Hamon M. Localization of oestradiol, progesterone and oxytocin receptors in the uterus during the oestrous cycle and early pregnancy of the ewe. *The Journal of endocrinology*. 1993;138:479-92.<https://doi.org/10.1677/joe.0.1380479>
- [26] Batista EOS, Cardoso BO, Oliveira ML, Cuadros FDC, Mello BP, Sponchiado M, et al. Supplemental progesterone induces temporal changes in luteal development and endometrial transcription in beef cattle. *Domest Anim Endocrinol*. 2019;68:126-34.<https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2019.02.001>
- [27] Wallace JM, Thompson MG, Aitken RP, Cheyne MA. Oxytocin receptor concentrations, inositol phosphate turnover and prostaglandin release by endometrium from ewes induced to ovulate during the early post-partum period. *The Journal of endocrinology*. 1993;136:17-25.<https://doi.org/10.1677/joe.0.1360017>

- [28] Leung ST, Wathes DC. Oestradiol regulation of oxytocin receptor expression in cyclic bovine endometrium. *J Reprod Fertil.* 2000;119:287-92
- [29] Spencer TE, Bazer FW. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biology of reproduction.* 1995;53:1527-43.<https://doi.org/10.1095/biolreprod53.6.1527>
- [30] Madore E, Harvey N, Parent J, Chapdelaine P, Arosh JA, Fortier MA. An aldose reductase with 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity is most likely the enzyme responsible for the production of prostaglandin f2 alpha in the bovine endometrium. *The Journal of biological chemistry.* 2003;278:11205-12.<https://doi.org/10.1074/jbc.M208318200>
- [31] Parent J, Villeneuve C, Fortier MA. Evaluation of the contribution of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 to the production of PGE2 and PGF2 alpha in epithelial cells from bovine endometrium. *Reproduction (Cambridge, England).* 2003;126:539-47.<https://doi.org/10.1530/rep.0.1260539>
- [32] Galvão KN, Frajblat M, Brittin SB, Butler WR, Guard CL, Gilbert RO. Effect of prostaglandin F2alpha on subclinical endometritis and fertility in dairy cows. *Journal of dairy science.* 2009;92:4906-13.<https://doi.org/10.3168/jds.2008-1984>
- [33] Kaczynski P, Kowalewski MP, Waclawik A. Prostaglandin F2 $\alpha$  promotes angiogenesis and embryo-maternal interactions during implantation. *Reproduction (Cambridge, England).* 2016;151:539-52.<https://doi.org/10.1530/rep-15-0496>
- [34] Milne SA, Jabbour HN. Prostaglandin (PG) F(2alpha) receptor expression and signaling in human endometrium: role of PGF(2alpha) in epithelial cell proliferation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2003;88:1825-32.<https://doi.org/10.1210/jc.2002-021368>
- [35] Moraes JGN, Behura SK, Geary TW, Spencer TE. Analysis of the uterine lumen in fertility-classified heifers: I. Glucose, prostaglandins, and lipids†. *Biology of reproduction.* 2020;102:456-74.<https://doi.org/10.1093/biolre/ioz191>
- [36] Motta JCL, Madureira G, Silva LO, Alves R, Silvestri M, Drum JN, et al. Interactions of circulating estradiol and progesterone on changes in endometrial area and pituitary responsiveness to GnRH†. *Biology of reproduction.* 2020;103:643-53.<https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa065>
- [37] Killam AP, Rosenfeld CR, Battaglia FC, Makowski EL, Meschia G. Effect of estrogens on the uterine blood flow of oophorectomized ewes. *American journal of*

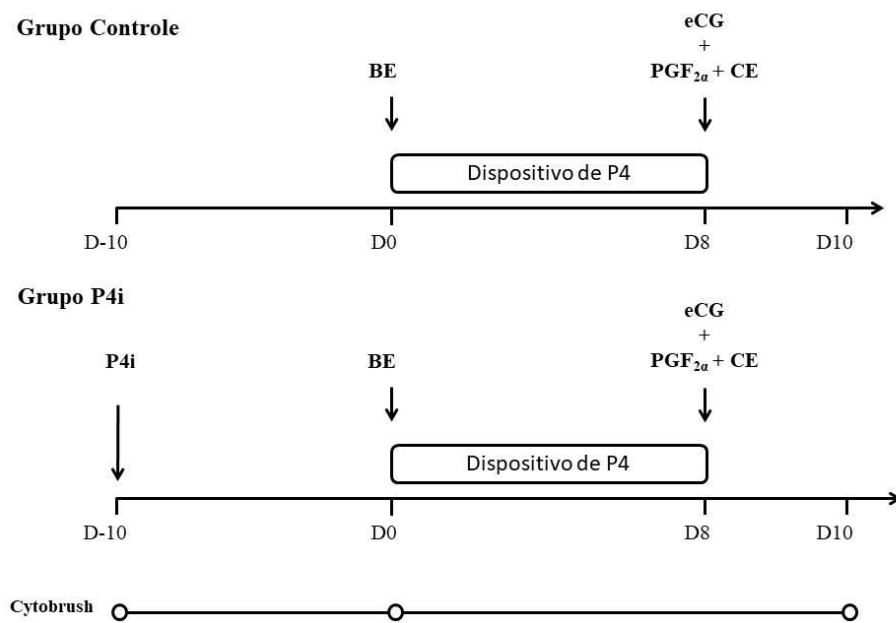
obstetrics and gynecology. 1973;115:1045-52.[https://doi.org/10.1016/0002-9378\(73\)90552-8](https://doi.org/10.1016/0002-9378(73)90552-8)

**Tabela 1**

Sequência de primers de genes alvo e referência analisados utilizando qPCR.

Abreviação	Gene	Sequência do <i>primer</i>	ID do GenBank	Tamanho do amplificador
PGR	Receptor de progesterona	F: GCCGCAGGTCTACCAGCCCT A R:GTTATGCTGTCCTTCCATT GCCCTT	NM_0112053 56.1	199
ESR1	Receptor de estrógeno $\alpha$	F: CAGGCACATGAGCAACAAA G R: TCCAGCAGGTCGTAGAG	XM_0026903 43.1	82
ESR2	Receptor de estrógeno $\beta$	F: GTAGAGAGCCGCATGAAT AC R: CAATGGATGGCTAAAGGAG AGA	NM_174051. 3	161
GAPDH	Gliceraldeído -3-fosfato desidrogenase	F: GCCATCAATGACCCCTTCAT R: TGCCGTGGGTGGAATCA	NM_0010340 34.2	69
OXTR	Receptor de ocitocina	F: AAGATGACCTTCATCGTCGT G R: CGTGAAGAGCATGTAGATC CAG	NM_174134. 2	177

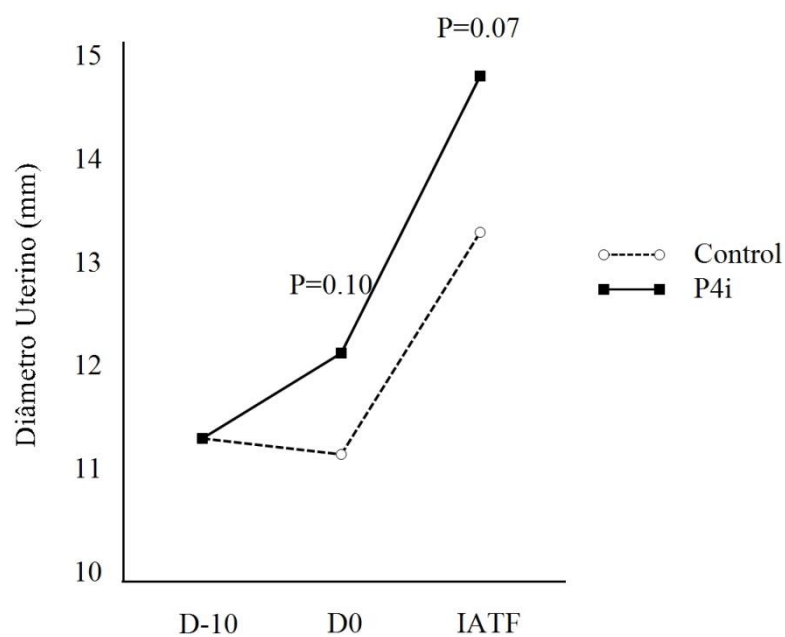
Abreviações: F: sequência iniciadora; R: sequência reversa



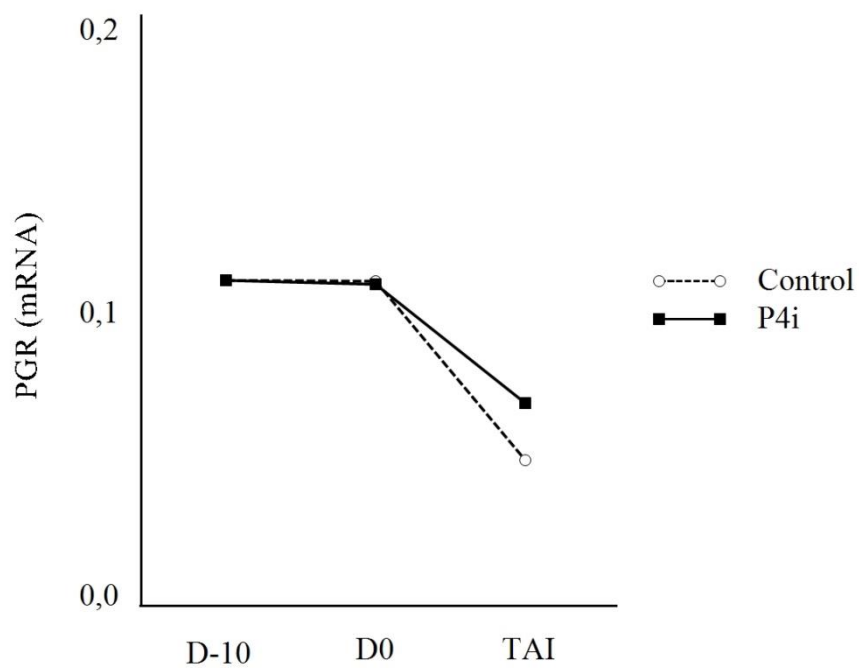
**Figura 1** – Delineamento experimental.

BE – Benzato de estradiol; PGF<sub>2α</sub> – Prostaglandina F2α; CE – Cipionato de estradiol;  
 eCG – Gonadotrofina coriônica equina.

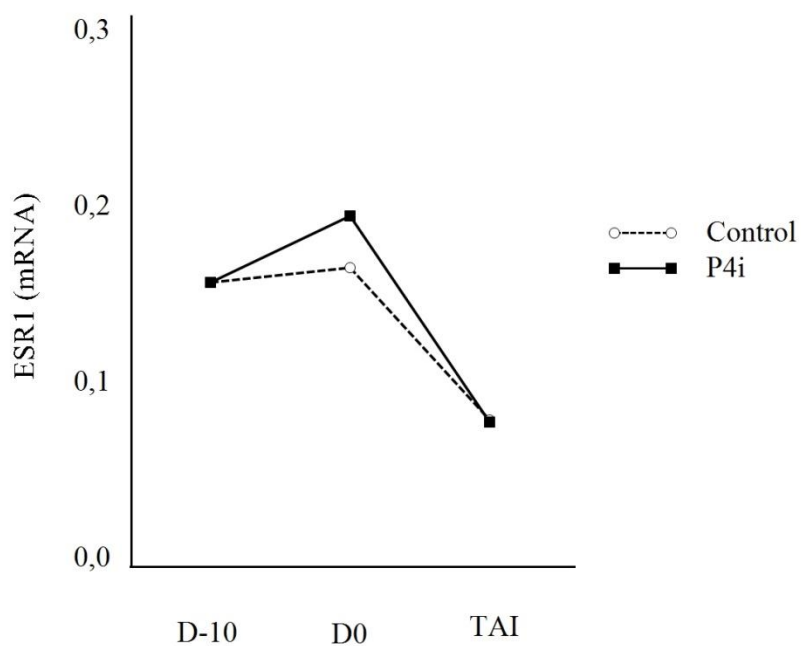




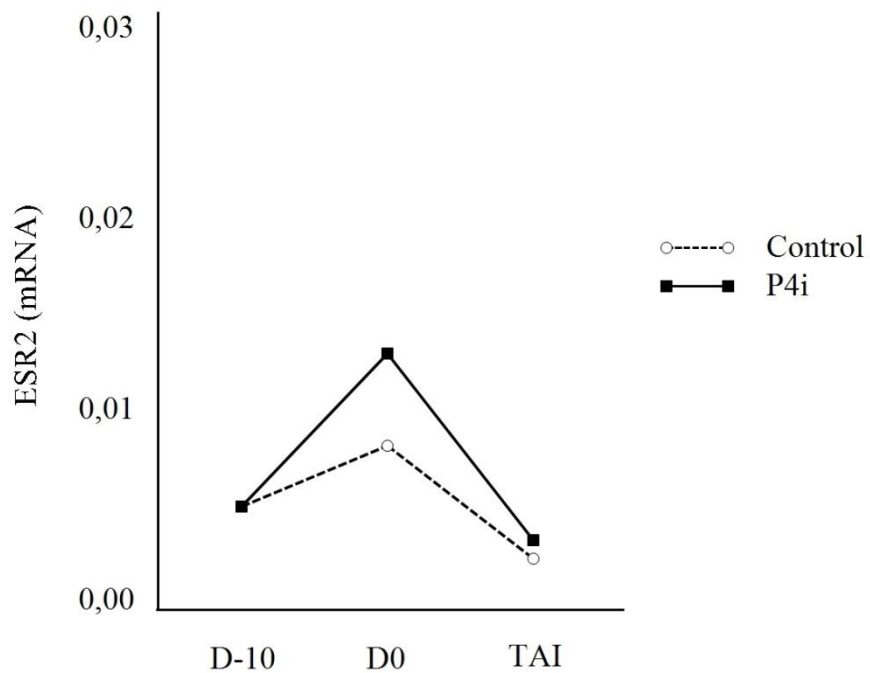
**Figura 2** – Efeito da administração de 150mg de progesterona injetável de longa ação 10 dias prévios ao início do protocolo de sincronização da ovulação no diâmetro uterino de vacas nelore em anestro pós-parto



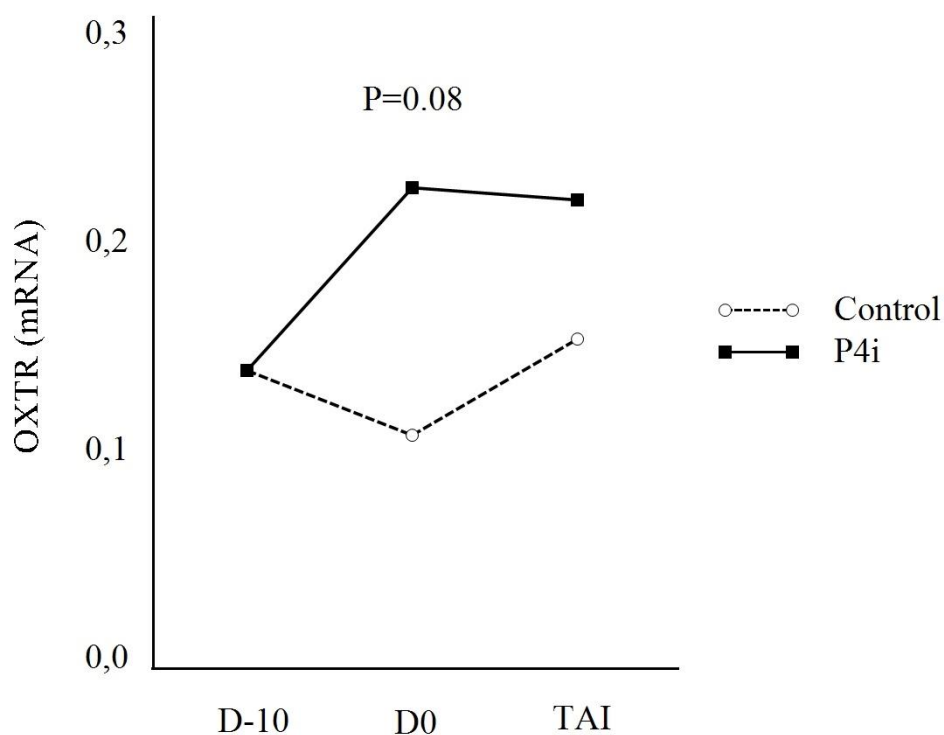
**Figura 3** - Efeito da administração de 150mg de progesterona injetável de longa ação 10 dias prévios ao início do protocolo de sincronização da ovulação na expressão de receptores de progesterona (PGR) no endométrio de vacas nelore em anestro pós-parto.



**Figura 4** – Efeito da administração de 150mg de progesterona injetável de longa ação 10 dias prévios ao início do protocolo de sincronização da ovulação na expressão de receptores de estrógeno tipo  $\alpha$  (ESR1) no endométrio de vacas nelore em anestro pós-parto.



**Figura 5** – Efeito da administração de 150mg de progesterona injetável de longa ação 10 dias prévios ao início do protocolo de sincronização da ovulação na expressão de receptores de estrógeno tipo  $\beta$  (ESR2) no endométrio de vacas nelore em anestro pós-parto



**Figura 6** - Efeito da administração de 150mg de progesterona injetável de longa ação 10 dias prévios ao início do protocolo de sincronização da ovulação na expressão de receptores de ocitocina (OXTR) no endométrio de vacas nelore em anestro pós-parto.