



LUCAS ARAUJO LEMOS

**DIFERENTES ESTRATÉGIAS HORMONAIS EM
PROTOCOLOS DE IATF SEM A UTILIZAÇÃO DE
ESTRÓGENO NA FERTILIDADE DE VACAS *Bos indicus***

**LAVRAS – MG
2025**

LUCAS ARAUJO LEMOS

DIFERENTES ESTRATÉGIAS HORMONAIS EM PROTOCOLOS DE IATF SEM A UTILIZAÇÃO DE ESTRÓGENO NA FERTILIDADE DE VACAS *Bos indicus*

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

Prof. Dr. José Nélio de Sousa Sales

Orientador

**LAVRAS – MG
2025**

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

Lemos, Lucas Araujo.

Diferentes estratégias hormonais em protocolos de IATF sem a
utilização de estrógeno na fertilidade de vacas / Lucas Araujo

Lemos. - 2024.

54 p. : il.

Orientador(a): José Nélio de Sousa Sales.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Fertilidade. 2. Nelore. 3. Estrógeno. I. Sales, José Nélio de
Sousa. II. Título.

LUCAS ARAUJO LEMOS

**DIFERENTES ESTRATÉGIAS HORMONAIIS EM PROTOCOLOS DE IATF SEM A
UTILIZAÇÃO DE ESTRÓGENO NA FERTILIDADE DE VACAS *Bos indicus***

**DIFFERENT HORMONAL STRATEGIES IN TAI PROTOCOLS WITHOUT THE
USE OF ESTROGEN IN THE FERTILITY OF *Bos indicus* COWS**

Dissertação 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 Mestre.

APROVADA em 29 de novembro de 2024

Dr. Bernardo Garziera Gasperin – Universidade Federal de Pelotas

Dr. José Camisão de Souza – Universidade Federal de Lavras

Prof. Dr. José Nélio de Sousa Sales

Orientador

**LAVRAS – MG
2025**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, e ter me dado força durante toda trajetória.

Aos meus queridos pais, Paulo e Viviane, por nunca medirem esforços para que eu pudesse ir em busca dos meus sonhos. Obrigado por todo apoio, por toda luta, compreensão, orações e principalmente por todo amor.

Aos meus avós, Antônio e Myrian, por serem meu exemplo de vida e superação, e terem me ajudado e incentivado a conquistar meus objetivos.

À minha namorada Gabriela, minha companheira, que sempre me apoiou e aprendeu a conviver com as viagens para experimentos. Obrigado pelo amor e compreensão.

À Universidade Federal de Lavras por todo conhecimento transmitido por excelentes professores e técnicos. Em especial, ao meu professor orientador José Nélio de Sousa Sales, pelo acolhimento, ensinamentos e oportunidades que me permitiram concluir esta etapa, e ao professor José Camisão de Souza, que me acompanhou desde o início da vida acadêmica, transmitindo muito conhecimento. Aos meus colegas de pós-graduação, Laís, Luiz, Matheus, Rafael e Léo, e aos colegas estagiários, agradeço a amizade e todo apoio e ajuda na realização desse e tantos outros experimentos.

Às fazendas que disponibilizaram seus animais, colaboradores e estrutura para a realização desse estudo. Aos laboratórios e veterinários parceiros que apoiaram na execução desse estudo.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, durante o mestrado.

Por fim, agradeço a todos que acreditaram em mim, serei sempre grato a vocês por essa grande conquista.

RESUMO

No Brasil, os protocolos de sincronização utilizam a associação de progesterona (P4) com estradiol (E2) obtendo resultados satisfatórios em vacas *Bos indicus*. Entretanto, os ésteres de E2 usados nos protocolos de IATF são proibidos em países da Europa e Estados Unidos. Além disso, alguns países da América do Sul apresentam proibições/restrições ao uso de E2 em bovinos. Assim, o aprimoramento dos protocolos a base de GnRH em vacas *Bos indicus* se torna necessário caso haja restrição ao E2 no Brasil. O objetivo foi avaliar a fertilidade de vacas Nelore lactantes, pré-sincronizadas com P4 e submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação sem a utilização de E2. No experimento 1 [109 vacas (estudo A) e 699 vacas (estudo B)] foram administrados 150mg de P4 injetável (P4i) dez dias (D-10) antes do protocolo de IATF. No D0, as vacas receberam um dispositivo intravaginal de P4 e 2mg de benzoato de estradiol (BE; Controle) ou 20µg de acetato de buserelina (GnRH/CE e 2GnRH). Oito dias depois (D8), o dispositivo de P4 foi removido e todas as vacas receberam 300UI de eCG e 500µg de Cloprostenol sódico (PGF2α). Além disso, as vacas receberam 1mg de cipionato de estradiol (CE; Controle e GnRH/CE) no D8 ou 10µg de acetato de buserelina (2GnRH) no D10. No D10 foi realizada a inseminação artificial (estudo B). No experimento 2 (699 vacas) as vacas do grupo Controle foram submetidas ao protocolo de IATF semelhante ao do estudo B. As vacas dos grupos GnRH/CE, 2GnRH48 e 2GnRH54 foram pré-sincronizadas com dispositivo de P4 sete dias antes do início do protocolo de IATF (D-7) e receberam 200µg de gonadorelina e um dispositivo de P4 no D0. A retirada dos dispositivos foi realizada no D8 com a administração de 300UI de eCG e 530µg de PGF2α. O grupo GnRH/CE recebeu 1mg de CE e nas vacas dos grupos 2GnRH/48h e 2GnRH/54h foram administrados 100µg GnRH 48 horas após a retirada do dispositivo de P4. A IATF foi realizada 48 horas (Controle, GnRH/CE e 2GnRH/48h) ou 54 horas (2GnRH/54h) após a retirada da P4. A análise estatística foi realizada pelo SAS. No estudo A, vacas que receberam CE ovularam mais cedo (P=0,002) sem diferença na dispersão das ovulações (P=0,06). Em todos os experimentos, vacas que receberam GnRH no D0 apresentaram maior diâmetro folicular no D8 (Estudo A: P=0,002; Estudo B: P=0,001 e Exp. 2: P=0,001) e maior taxa de ovulação no D0 (Estudo A: P=0,002; Estudo B: P=0,001 e Exp. 2: P=0,001). A expressão de estro foi maior nas vacas que receberam CE (P=0,01; estudo B e P = 0,001; Exp. 2). A P /IA foi semelhante entre os grupos experimentais no estudo B (P = 0,19). No entanto, P /IA foi maior no grupo Controle (Exp. 2; P=0,001). Em conclusão, a remoção do E2 nos protocolos de IATF reduz a fertilidade de vacas *Bos indicus* lactantes.

Palavras-chave: Fertilidade; Nelore; proibição; estrógeno.

ABSTRACT

In Brazil, synchronization protocols based on the association of progesterone (P4) with estradiol (E2) present satisfactory results in *Bos indicus* cows. However, E2 esters used in TAI protocols are banned in European countries and the United States. Furthermore, some countries in South America have prohibitions or restrictions regarding the use of E2 in cattle. In this context, the improvement of GnRH-based protocols, to obtain better results in *Bos indicus* cows, becomes necessary, if the restriction on E2 interferes the production and export of beef in Brazil. Thus, the objective was to evaluate the fertility of suckled Nelore cows, pre-synchronized with P4 and submitted to the ovulation synchronization protocol without the use of E2. In experiment 1 [109 cows (study A) and 699 cows (study B)] 150 mg of injectable P4 (P4i) were administered ten days (D-10) before the TAI protocol. On D0, cows received an intravaginal P4 device and 2 mg of estradiol benzoate (EB; Control) or 20 µg of buserelin acetate (GnRH/EC and 2GnRH). Eight days later (D8), the P4 device was removed and all cows received 300 IU of eCG and 500 µg of cloprostenol sodium (PGF2α). Additionally, cows received 1 mg of estradiol cypionate (EC; Control and GnRH/EC) on D8 or 10 µg of buserelin acetate (2GnRH) on D10. Artificial insemination was performed on D10 (study B). In experiment 2 (699 cows), cows in the Control group underwent a TAI protocol similar to that of study B. Cows in the GnRH/EC, 2GnRH48 and 2GnRH54 groups were pre-synchronized with a P4 device seven days before the start of the TAI protocol (D-7) and received 200 µg of gonadorelin and an intravaginal P4 device on D0. The P4 devices were removed on D8 together with the administration of 300 IU of eCG and 530 µg of PGF2α. Furthermore, the GnRH/EC group received 1 mg EC and cows in the 2GnRH/48h and 2GnRH/54h groups were administered 100 µg GnRH 48 hours after removal of the P4 device. TAI was performed 48 hours (Control, GnRH/EC and 2GnRH/48h) or 54 hours (2GnRH/54h) after removal of the P4 device. Statistical analysis was performed by SAS. In study A, cows that received EC ovulated earlier (P=0.002) with no difference in the dispersion of ovulations (P=0.06). In all experiments, cows receiving GnRH on D0 had larger follicular diameter on D8 (Study A: P=0.002; Study B: P=0.001 and Exp. 2: P=0.001) and higher ovulation rate on D0 (Study A: P=0.002; Study B: P=0.001 and Exp. 2: P=0.001). In addition, estrus expression was higher in cows receiving EC (P=0.01; Study B and P = 0.001; Exp. 2). P/AI was similar between experimental groups in Study B (P = 0.19). However, P/AI was higher in the Control group (Exp. 2; P=0.001). In conclusion, estradiol removal (EC and EB) in ovulation synchronization protocols reduces fertility of lactating *Bos indicus* cows.

Keywords: Fertility; Nelore; prohibition; estrogen.

INDICADORES DE IMPACTO

A pecuária desempenha um papel significativo na economia brasileira. Em 2022, o setor pecuário, englobando criação, indústria, serviços e insumos, foi responsável por aproximadamente 6,93% do Produto Interno Bruto (PIB) do Brasil. Assim, a maior produtividade e lucratividade na pecuária de corte está relacionado a eficiência reprodutiva do rebanho. Para maximizar a produtividade e, torná-la mais rentável, é necessário produzir um bezerro por vaca por ano. Para isso protocolos de sincronização da ovulação a base de progesterona e estrógeno são utilizados para realizar a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) no Brasil. Estima-se que no ano de 2023 mais de 24 milhões de protocolos de IATF foram realizados no Brasil, com a participação de 7 mil profissionais que atuam na área. Entretanto, apenas 22% de todas as fêmeas em idade reprodutiva foram inseminadas, o que mostra um grande potencial de crescimento para essa biotecnologia no Brasil. Desse modo, estima-se que houve o faturamento de R\$563 milhões com a venda de protocolos de IATF para o setor de reprodução animal. Entretanto, alguns fármacos como os ésteres de estradiol usados nos protocolos de IATF são proibidos em países da Europa e Estados Unidos. Além disso, países da América do Sul (Uruguai, Paraguai, Argentina e Brasil) apresentam proibições ou restrições em relação a utilização de estrógeno em bovinos. Dessa forma, são necessários ajustes nos protocolos de IATF sem a utilização de estradiol em vacas *Bos indicus* pré-sincronizadas com progesterona para melhorar os índices de fertilidade. Nesse contexto, o aprimoramento dos protocolos a base de GnRH, para obter melhores resultados em vacas *Bos indicus*, se torna necessário, caso a restrição ao estradiol interfira na produção e exportação de carne no Brasil. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a fertilidade de vacas Nelore submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação sem a utilização de estradiol. No entanto, os resultados encontrados apresentam redução de 10 a 15% na taxa de concepção em vacas de corte *Bos indicus* impactando significativamente a produção de bezerros do Brasil e o ganho econômico da pecuária de corte. Estima-se redução de aproximadamente 2 milhões de bezerros por ano (R\$ 5 bilhões de reais) se o estradiol for proibido em protocolos de IATF. Contudo, os resultados encontrados no estudo são fundamentais para realizar ajustes em próximos protocolos de IATF sem estrógeno.

IMPACT INDICATORS

Livestock is a significant part of Brazilian economy. In 2022, the livestock sector, including breeding, industry, services, and inputs, accounted for approximately 6.93% of Brazil's Gross Domestic Product (GDP). Thus, higher productivity and profitability in beef cattle production are directly related to the reproductive efficiency of the herd. To maximize productivity and make it more profitable, it is essential to produce one calf per cow per year. For this, ovulation synchronization protocols based on progesterone and estrogen are used to perform timed artificial insemination (TAI) in Brazil. It is estimated that in 2023, more than 24 million of TAI protocols were made in Brazil, involving 7,000 professionals working in this area. However, only 22% of cows and heifers in reproductive age were inseminated, indicating significant growth potential for this biotechnology in Brazil. In this context, it is estimated that the sale of TAI protocols for the animal reproduction sector generated R\$563 million. Nevertheless, some hormones, such as estradiol esters used in TAI protocols, are prohibited in countries like Europe and the United States. Additionally, South American countries (Uruguay, Paraguay, Argentina, and Brazil) imposed bans or restrictions on the use of estrogen in cattle. Therefore, adjustments to TAI protocols without estradiol are needed in *Bos indicus* cows pre-synchronized with progesterone to improve fertility rates. In this context, enhancing GnRH-based protocols to achieve better results in *Bos indicus* cows becomes necessary if estradiol restrictions affect Brazil's meat production and exportation. The objective of this study was to evaluate the fertility of Nelore cows subjected to ovulation synchronization protocols without the use of estradiol. However, the results showed a reduction of 10 to 15% in conception rates in *Bos indicus* beef cows, significantly impacting calf production in Brazil and the economic gains of beef cattle farming. It is estimated that approximately 2 million fewer calves would be produced annually (equivalent to a loss of R\$5 billion) if estradiol were prohibited in TAI protocols. Nevertheless, the results of the study are crucial for adjusting future TAI protocols without estrogen.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Figura 1. Desenho experimental. P4i – 150mg de progesterona injetável; BE: 2 mg benzoato de estradiol; Dispositivo intravaginal de P4 de 1g; GnRH - 20µg Buserelina (D0) e 10µg Buserelina (D10); CE – 1,0 mg de Cipionato de estradiol; eCG - 300 UI de gonadotrofina coriônica equina; PGF - 500 mg de cloprostenol; US - exames ultrassonográficos (estudo A e B). IATF - inseminação artificial em tempo fixo (estudo B) 34
- Figura 2 - Distribuição do momento da ovulação (horas) após a retirada do dispositivo de P4 em vacas *Bos indicus* submetidas a diferentes protocolos de IATF (com ou sem E2) e pré-sincronizadas com P4i 39
- Figura 3 - Taxa de prenhez de vacas *Bos indicus* que ovularam ou não no D0 submetidas a diferentes protocolos de IATF (com ou sem E2) e pré-sincronizadas com dispositivo intravaginal de P4 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resposta folicular ovariana (média ± EPM) de vacas Nelore (<i>Bos indicus</i>) pré-sincronizadas com P4i e submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação (com ou sem E2)	38
Tabela 2 – Resposta folicular ovariana (média ± EPM) de vacas Nelore (<i>Bos indicus</i>) pré-sincronizadas com P4i (Experimento 1 / Estudo B) ou dispositivo intravaginal de P4 (Experimento 2) submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação (com ou sem E2).....	42
Tabela 3 – Efeito do ECC na ciclicidade, taxa de ovulação no D0, taxa de estro e prenhez em vacas <i>Bos indicus</i> submetidas a diferentes protocolos de IATF (com ou sem E2) e pré-sincronizadas com P4i (estudo B) dispositivo intravaginal de P4 (experimento 2).....	44

LISTA DE SIGLAS

%	Porcentagem
µg	Microgramas
AGNE	Ácidos graxos não esterificados
BE	Benzoato de estradiol
CE	Cipionato de estradiol
CL	Corpo lúteo
D	Dia
DG	Diagnóstico de gestação
E ₂	Estrógeno
ECC	Escore de condição corporal
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
EPM	Erro padrão da média
EUA	Estados Unidos da América
FSH	Hormônio folículo estimulante
g	Gramas
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
h	Horas
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina
i.m.	Intramuscular
LH	Hormônio luteinizante
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
mg	Miligramas
MG	Minas Gerais
N	Número
mm	Milímetros
MT	Mato Grosso
P	Significância
P/IA	Prenhez por inseminação artificial
P4	Progesterona
P4i	Progesterona injetável
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
UI	Unidades internacionais
vs	Versus

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	14
1. Introdução.....	14
2. Referencial teórico.....	15
2.1. Anestro pós-parto em vacas <i>Bos Indicus</i>	15
2.2. Protocolos de sincronização da ovulação	17
2.3. Sincronização da emergência de onda	18
2.4. Sincronização da ovulação.....	20
2.5. Restrição ao uso dos ésteres de estradiol durante o protocolo de IATF	21
REFERÊNCIAS	22
SEGUNDA PARTE - ARTIGO	27
DIFERENTES ESTRATÉGIAS HORMONAIIS EM PROTOCOLOS DE IATF SEM A UTILIZAÇÃO DE ESTRÓGENO NA FERTILIDADE DE VACAS <i>Bos indicus</i>	
Resumo	28
Abstract	29
1. Introdução	30
2. Material e Métodos	32
2.1. Experimento 1 - Dinâmica folicular e taxa de prenhez em vacas <i>Bos indicus</i> submetidas ao protocolo de IATF sem a utilização de estrógeno e pré-sincronizadas com P4i.....	32
2.2. Experimento 2 - Dinâmica folicular e taxa de prenhez em vacas <i>Bos indicus</i> submetidas ao protocolo de IATF sem a utilização de estrógeno e pré-sincronizadas com dispositivo intravaginal de P4	34
2.3. Exames ultrassonográficos	35
2.4. Detecção de estro.....	36
2.5. Análise estatística.....	36
3. Resultados.....	37
3.1. Experimento 1 - Dinâmica folicular e taxa de prenhez de vacas <i>Bos indicus</i> pré sincronizadas com P4i	37

3.2. Experimento 2 - Dinâmica folicular e taxa de prenhez de vacas <i>Bos indicus</i> pré-sincronizadas com dispositivo de P4	40
4. Discussão	44
REFERÊNCIAS	48

PRIMEIRA PARTE

1. Introdução

Os protocolos de sincronização da ovulação estão bem consolidados, o que permitiu serem utilizados rotineiramente em fazendas de gado de corte e de gado de leite (BARUSELLI et al., 2019). Em *Bos indicus*, a principal vantagem do uso da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) é antecipar a primeira ovulação em vacas em anestro no pós-parto e conseqüentemente, aumentar a eficiência reprodutiva do rebanho (BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003). Além disso, a inseminação artificial (IA) aumenta o ganho genético e permite o uso do cruzamento industrial na pecuária de corte (BARUSELLI et al., 2004). Em vacas de corte *Bos indicus*, o protocolo de IATF mais utilizado é a base de progesterona (P4) e estradiol (E2; BARUSELLI et al., 2019). O E2 é utilizado para sincronizar a emergência da onda folicular quando associado à altas concentrações de P4 (CARVALHO et al., 2008) e para sincronizar a ovulação, permitindo assim a inseminação em momento pré-determinado (BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003). Além disso, para promover o crescimento folicular final é utilizada a gonadotrofina coriônica equina (eCG; SALES et al., 2016) e para promover a lise de um possível corpo lúteo (CL) é utilizada prostaglandina (PGF2 α). A associação de P4 e E2 permite a sincronização da emergência de uma nova folicular mesmo que administrados em dia aleatório do ciclo estral (BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003). Essa característica permite respostas satisfatórias ao final do protocolo em vacas em anestro pós-parto.

Outra forma de sincronizar a emergência da onda folicular e manter altas concentrações de P4 durante o protocolo hormonal é a administração de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) no início do protocolo de sincronização da ovulação (D0). Essa estratégia, baseia-se na indução da ovulação de um folículo dominante e conseqüente formação de um CL (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995). No entanto, para obter resultados satisfatórios é necessária alta taxa de ovulação em resposta ao primeiro GnRH. Em vacas, foi observada maior resposta à sincronização da ovulação e concepção quando iniciou-se o protocolo entre os dias 5 e 12 do ciclo estral (VASCONCELOS et al., 1999). Dessa maneira, protocolos de pré-sincronização foram desenvolvidos para otimizar a resposta ao protocolo a base de GnRH (SILVA et al., 2018; SOUZA et al., 2008). Outra forma de aumentar o número de vacas com folículos que respondam à administração de GnRH no início do protocolo é a utilização de P4. A progesterona injetável (P4i) administrada previamente ao protocolo de IATF aumentou o

diâmetro folicular ao início do protocolo e no momento da retirada do dispositivo de P4 em vacas *Bos indicus* (SIMÕES et al., 2018). Nesse contexto, a P4i torna-se uma alternativa de pré-sincronização para a obtenção de folículos responsivos ao GnRH no início do protocolo de IATF.

No Brasil, o protocolo de sincronização da ovulação que associa P4 e E2 tem apresentado resultados satisfatórios em vacas *Bos indicus*, além do baixo custo em relação aos protocolos que utilizam GnRH. Entretanto, alguns fármacos como os ésteres de estradiol usados nos protocolos de IATF são proibidos em países da Europa e Estados Unidos (“Directive - 2003/74 - EN - EUR-Lex”). Além disso, países da América do Sul (Uruguai, Paraguai, Argentina e Brasil) apresentam proibições ou restrições em relação a utilização de E2 em bovinos. Nesse contexto, o aprimoramento dos protocolos a base de GnRH, para obter resultados satisfatórios em vacas *Bos indicus*, tornam-se necessários, caso a restrição ao E2 afete a produção e exportação de carne do Brasil. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a fertilidade de vacas Nelore (*Bos indicus*) lactantes, pré-sincronizadas com P4 e submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação sem a utilização de E2.

2. Referencial teórico

2.1 Anestro pós-parto em vacas *Bos indicus*

A maior produtividade e lucratividade na pecuária de corte está relacionado a eficiência reprodutiva do rebanho. Para maximizar a produtividade e, torná-la mais rentável, é necessário produzir um bezerro por vaca por ano. Assim, para obter intervalos de partos de doze meses, é necessário que as vacas concebam até os 80 dias após o parto (gestação de fêmeas bovinas em média 285 dias). No entanto, o longo período de anestro após o parto, observado em vacas *Bos indicus* criadas de forma extensiva, é um desafio para alcançar essa meta, visto que a primeira ovulação nesses animais ocorre, em média, entre 35 e 80 dias (YAVAS; WALTON, 2000). Em relação as vacas de leite, o retorno a ciclicidade ocorre mais precocemente, por volta de 2 a 3 semanas após o parto. Essas diferenças estão relacionadas com a fisiologia e forma de criação de fêmeas com aptidão leiteira ou de produção de carne.

A duração do anestro após o parto, está relacionada com a capacidade da fêmea restabelecer o funcionamento do eixo-hipotalâmico-hipofisário. Durante o final da gestação e,

próximo ao parto, ocorre elevada retroalimentação negativa dos esteroides (P4 e E2) placentários e ovarianos no hipotálamo e na hipófise, suprimindo a liberação de FSH e causando depleção nos estoques de LH (SARTORI; BARROS, 2011). Após a redução drástica nas concentrações de LH (aproximadamente 95% de redução na sua concentração), ocorre aumento progressivo, até o restabelecimento dos padrões adequados para que haja a primeira ovulação após o parto, entre 15 e 30 dias (MAPLETOFT et al., 2018; NETT et al., 1988). Em contraste, em vacas leiteiras, o aumento nas concentrações de FSH ocorre imediatamente após o parto, resultando na emergência da primeira onda de crescimento folicular (WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002). No entanto, devido à redução dos estoques de LH, ocorre o crescimento de ondas foliculares subsequentes sem ovulação (MURPHY; BOLAND; ROCHE, 1990). Assim, para que se tenha crescimento folicular final adequado e, conseqüentemente, ovulação, é necessário o estabelecimento da secreção pulsátil de GnRH/LH (1 pulso/hora; ROCHE; CROWE; BOLAND, 1992).

Em vacas de corte, o reestabelecimento da secreção adequada de LH, ocorre por volta dos 30 dias pós-parto (MACKEY et al., 1999). No entanto, observam-se períodos superiores de anestro após o parto nessas fêmeas. Fatores inerentes a criação extensiva desses animais no Brasil (clima subtropical) afetam diretamente o retorno a ciclicidade. Nesse contexto, após o parto, a alta demanda energética para a produção de leite, para manutenção e, em primíparas, para o crescimento corporal, não é atendida corretamente. Essa condição é denominada balanço energético negativo e ocorre pelo déficit na relação de oferta e demanda de nutrientes (AYRES et al., 2009). Uma maneira de predizer o estado nutricional do animal após o parto é por meio do escore de condição corporal (ECC; LAFLAMMEL' et al., 2011).

O mecanismo que relaciona a subnutrição e o eixo-hipotalâmico-hipofisário envolve a disponibilidade de glicose, que é o principal substrato energético do sistema nervoso central (HESS et al., 2005). Em condições de falta desse nutriente, o organismo mobiliza reservas corporais (tecido adiposo), que resulta em formação de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e corpos cetônicos (beta-hidroxibutirato). A concentração sérica elevada desses metabólitos, atua negativamente na liberação de GnRH no hipotálamo (GRIMARD et al., 1995). Além disso, também são observadas menores concentrações de insulina e do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) nessas condições (DIAS et al., 2009). Estudos demonstraram correlação positiva entre maiores concentrações de IGF-1 e melhor fertilidade em vacas (STEWART et al., 1995; STICK et al., 1998). Assim, essa condição limita a produção e secreção de LH e conseqüentemente, crescimento final do folículo dominante e ovulação. Nesse

contexto, algumas estratégias nutricionais, como a suplementação proteica e energética podem atuar no retorno precoce a ciclicidade após o parto em vacas *Bos indicus* (SALES et al., 2019).

Outro fator que está associado ao atraso na ciclicidade em fêmeas zebuínas após o parto, é a presença do bezerro até o desmame. Diversas hipóteses foram testadas ao longo dos anos, objetivando elucidar como a presença do bezerro e a amamentação atuavam no eixo-hipotalâmico-hipofisário. Inicialmente, foi observado aumento nos receptores de LH em folículos de vacas sem o estímulo da amamentação. Em associação à esses achados, foi observada maior concentração de prolactina no fluido folicular de vacas em lactação (WALTENS et al., 1982). Após esses resultados, foi proposto que a prolactina estaria envolvida na regulação dos receptores de LH no folículo. Porém, a utilização de dopamina (bloqueador de prolactina), em vacas de corte no pós-parto, não interferiu na liberação das gonadotrofinas e na duração do anestro (YAVAS; WALTON, 2000). Outra estratégia testada para elucidar o efeito da amamentação no retorno a ciclicidade após o parto, foi a redução do número de amamentação (1x ao dia) e a separação total do bezerro (sem contato visual, auditivo e olfatório). Como resultado, os autores observaram redução de 17 e 28 dias no anestro após o parto em vacas de corte, respectivamente (CROWE, 2008). A partir desse estudo, concluiu-se que somente a presença física do bezerro foi capaz de suprimir a liberação de GnRH e, conseqüentemente, de LH. Essa capacidade da mãe de identificar a prole gera sinais metabólicos e neurais que induzem a liberação de opioides endógenos que são capazes de agir no hipotálamo e inibir a liberação de GnRH (PETER; VOS; AMBROSE, 2009). Para tentar minimizar esses efeitos em vacas de corte em lactação, estratégias hormonais foram desenvolvidas ao longo dos anos e são utilizadas rotineiramente na atualidade.

2.2 Protocolos de sincronização da ovulação

Em *Bos indicus*, a principal vantagem do uso dos protocolos de sincronização da ovulação é antecipar a primeira ovulação de vacas em anestro após o parto e, conseqüentemente, aumentar a eficiência reprodutiva do rebanho (BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003). O primeiro protocolo hormonal desenvolvido para induzir a ovulação e inseminar vacas sem a necessidade de detectar o estro, tem como base a associação de PGF2 α e GnRH (Ovsynch; PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995). Posteriormente, foi relatada a associação de P4 exógena e E2 como estratégia para inseminar vacas em momento pré-determinado (BARUSELLI et al., 2004; PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995). A P4 é capaz de aumentar a pulsatilidade de LH em vacas em anestro (GARCIA-WINDER et al., 1987) e assim, induzir

a ovulação e o retorno a ciclicidade após o parto (SÁ FILHO; THATCHER; VASCONCELOS, 2009). Por apresentar melhores resultados em vacas *Bos indicus*, o protocolo a base de P4 e E2 é o mais utilizado no Brasil, atualmente.

As associações hormonais para sincronizar a ovulação precisam mimetizar o que ocorre fisiologicamente na fêmea bovina. Nesse contexto, independentemente do protocolo utilizado, três premissas básicas, durante a dinâmica folicular e luteínica, precisam ser atendidas para obter resultados satisfatórios. Inicialmente, é necessário sincronizar a emergência de uma nova onda folicular pela indução da ovulação com GnRH (WILTBANK et al., 2015) ou atresia folicular (E2+P4; BARUSELLI et al., 2017). Em seguida, é necessário controlar o crescimento folicular pela manutenção da P4 por um determinado período (7 a 9 dias) e posterior remoção das fontes de exógena (remoção do dispositivo) e endógena de P4 (administração de PGF2 α) para que ocorra a ovulação (BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003). Por fim, é necessário realizar a sincronização da ovulação utilizando ésteres de estradiol ou GnRH para permitir a inseminação artificial em tempo pré determinado (BARUSELLI et al., 2017). Em adição, é utilizada a eCG, como suporte gonadotrófico (LH) para crescimento do folículo dominante (DUFFY et al., 2004). Foi observado que a utilização de eCG durante o protocolo aumenta as taxas de ovulação e prenhez em vacas de corte após o parto, principalmente em fêmeas em anestro, com baixo ECC e primíparas (SALES et al., 2016). Dessa maneira, o protocolo mais utilizado no Brasil em vacas *Bos indicus* em lactação, consiste na associação de P4 e E2 no dia 0 (D0); administração de PGF2 α , eCG e cipionato de estradiol (CE; indutor da ovulação) no momento da retirada do dispositivo de P4 (D7, D8 ou D9) e IA 48 horas após a remoção do dispositivo de P4. A resposta ao final desse protocolo é de aproximadamente 80% (ovulação do folículo dominante ao final do protocolo; SALES et al., 2012a).

2.3 Sincronização da emergência de onda

Para inseminar vacas em momento pré-determinado sem a detecção de estro, é necessário, inicialmente, sincronizar a emergência de uma nova onda folicular. Duas diferentes maneiras são descritas na literatura com resultados variados, em vacas de leite e de corte. Em vacas leiteiras, o protocolo denominado *Ovsynch*, é amplamente utilizado em países, como o EUA. No entanto, a resposta a administração ao primeiro GnRH é dependente do diâmetro folicular. Segundo Vasconcelos (1999), o momento ideal para iniciar protocolos a base de GnRH seria entre os dias 5 e 12 do ciclo estral. Além disso, estudos recentes demonstraram que altas concentrações de P4 no momento da administração de GnRH podem reduzir a eficiência

desse tratamento por efeito supressor no pico de LH (COLAZO et al., 2008; SILVA et al., 2023). Por esses motivos, a resposta final a esse protocolo quando iniciado em dia aleatório do ciclo estral é de aproximadamente 64% (VASCONCELOS et al., 1999). Em função desse problema, protocolos de pré-sincronização foram desenvolvidos para mitigar os efeitos do diâmetro folicular no início do *Ovsynch*. Dentre eles, o *Double-ovsynch* é amplamente utilizado, obtendo resultados de 82,0% de taxa de ovulação ao primeiro GnRH e 49,7% de P/IA (SOUZA et al., 2008). Outra estratégia para induzir a formação de um folículo responsivo ao GnRH foi descrita e denominada como P4synch. Essa pré-sincronização consiste na inserção de um dispositivo intravaginal de P4 dez dias prévios ao protocolo a base de GnRH em vacas leiteiras (SILVA et al., 2018). O objetivo da exposição à P4 é proporcionar o crescimento folicular, sem subsequente ovulação. Dessa maneira, espera-se que a maioria das fêmeas estejam com folículo ovulatório no D0, aumentando a taxa de ovulação nesse momento. Nesse estudo, os resultados obtidos foram semelhantes ao Double-Ovsynch [taxa de ovulação ao 1º GnRH [Double-Ovsynch = 86,3% e P4synch = 81,2%; P=0,50] e P/AI [Double-Ovsynch = 39,0% e P4synch = 40,1%]. Nesse contexto, a vantagem da P4synch em relação ao Double-ovsynch baseia-se no tempo necessário para realização do protocolo (20 dias vs. 28 dias, respectivamente), no número de administrações hormonais e no custo dos tratamentos hormonais.

Recentemente, alguns estudos de nosso grupo de pesquisa, utilizou a P4i previamente ao protocolo de sincronização da ovulação em vacas leiteiras e vacas de corte. Em vacas *Bos indicus* em lactação, a administração de 150mg de P4i, dez dias antes (D-10) do início do protocolo de IATF a base de E2/P4, aumento diâmetro folicular no dia 0 (D0) e no dia da retirada do dispositivo de P4 [(D0; Controle = $10,9 \pm 0,2$ e P4i = $12,7 \pm 0,3$); (D8; Controle = $9,7 \pm 0,2$ e P4i = $10,4 \pm 0,3$)]. Além disso, o risco de prenhez aumentou em 1,7 nas fêmeas expostas previamente a P4 em relação ao grupo controle (SIMÕES et al., 2018). Em vacas leiteiras mestiças Gir/Holandês foram administrados 300mg intramuscular (i.m.) de P4i dez dias antes do início do protocolo de IATF (D-10). Não houve diferença na taxa de prenhez em vacas que receberam ou não P4i. No entanto, vacas em anestro que receberam o tratamento tiveram incremento de 14,2% na taxa de concepção (Controle = 42,4%, P4i = 56,4%; P=0,24; Simões *et al.*, dados não publicados). Em estudo com vacas Holandês e mestiças Holandês/Jersey a administração de 300mg de P4i sete dias antes do início do protocolo de IATF aumentou a taxa de concepção aos 30 e 60 dias (Controle = 52,1% e P4i = 56,3%; P=0,05; Controle = 49,6% e P4i = 53,5%; P=0,05, respectivamente). Além disso, vacas em anestro que receberam P4i previamente ao protocolo de IATF tiveram incremento de 18% na P/IA

(Controle = 32,7% e P4i = 50,7%; P= 0,04; SIMÕES et al., 2022). Assim, recentes estudos conduzidos por nosso grupo de pesquisa mostram que os possíveis benefícios em utilizar a P4i previamente ao protocolo de IATF podem estar relacionados a um melhor ambiente uterino.

2.4 Sincronização da ovulação

Para a obtenção de resultados satisfatórios ao final do protocolo de IATF é necessário controlar o crescimento do folículo dominante e sincronizar a ovulação final para inseminar as fêmeas em momento pré-determinado. Os ésteres de estradiol são comumente utilizados no Brasil para atingir esse objetivo. A administração de CE no D8 resultou na ovulação 68,5 horas após a retirada do dispositivo de P4 (SALES et al., 2012). Além do CE, o BE, que é outro éster de estradiol, pode ser utilizado com a finalidade de induzir a ovulação. No entanto, esse éster de estradiol deve ser administrado um dia após a retirada do dispositivo de P4 (D9). Após a administração de BE no D9, a ovulação ocorreu 70,2 horas após a retirada do dispositivo de P4 (SALES et al., 2012). Assim, por questões do número de vezes que as vacas são manejadas ao longo do protocolo de IATF (Utilizando CE: 3 manejos e BE: 4 manejos), o CE é mais utilizado em vacas de corte.

Outra maneira de sincronizar a ovulação final é pela administração de GnRH. No entanto, o momento correto para administrar o GnRH e realizar a IATF ainda é questionável. Após a administração de GnRH, o pico de LH ocorre em 2 horas (PULLEY; KEISLER; STEVENSON, 2015) e a ovulação entre 28 e 30 horas (LIU et al., 2018). Nesse contexto, a IATF deveria ser realizada 16 horas após a administração do segundo GnRH no protocolo *Ovsynch* em vacas leiteiras (WILTBANK et al., 2015). Outros estudos demonstraram que o GnRH administrado 8h antes da IATF (IA 56h após a retirada do dispositivo intravaginal de P4) ou no momento da IATF resultou em taxas de prenhez satisfatórias em vacas de corte *Bos taurus* (CEDEÑO et al., 2021) e *Bos indicus* (MADUREIRA et al., 2020) em lactação que não manifestaram estro. Em contraste, o tratamento com GnRH concomitante à IATF não melhorou a P/IA em vacas que manifestaram estro (BISHOP et al., 2017; SÁ FILHO et al., 2011). Além dos inconclusivos achados sobre o momento ideal para a administração de GnRH ao final do protocolo, fêmeas Nelore lactantes que não receberam estradiol como indutor da ovulação, demonstraram menor taxa de estro e tendência de ter menor P/IA (SILVA et al., 2023b). Tal resultado é devido ao aumento do estradiol circulante no período pré-ovulatório pela soma do estradiol exógeno (CE ou BE) com o estradiol endógeno (liberado pelo folículo dominante)

resultando na manifestação de estro (BOSOLASCO et al., 2021). Após essas particularidades citadas em relação ao uso do GnRH no início e no final do protocolo de IATF, é possível entender a baixa taxa de prenhez em vacas Nelore submetidas ao protocolo *Ovsynch* (*Ovsynch* = 15% e P4/E2 = 52%; BARUSELLI et al., 2002).

2.5 Restrição ao uso dos ésteres de estradiol durante o protocolo de IATF

Os protocolos de IATF a base de E2 e P4 estão consolidados e são amplamente utilizados em vacas de corte no Brasil, com resultados entre 40 e 65% (BARUSELLI et al., 2017; SALES et al., 2015). No entanto, o uso de estradiol em programas de sincronização da ovulação é proibido na união europeia desde a década de 80, assim como importação de produtos derivados de animais que receberam estradiol. Inicialmente, a restrição era somente ao uso dos ésteres de estradiol com finalidade de promover o crescimento, mas, após alguns anos, países europeus restringiram a utilização em programas reprodutivos. Outros países, como os EUA também seguem essas restrições, com ressalvas ao uso de E2 como promotor de crescimento. Além disso, países da América do Sul (Uruguai, Paraguai, Chile e Argentina) atualizaram as recomendações sobre o uso desse esteroide na pecuária (BÓ; MENCHACA, 2023) e, recentemente, no Brasil foi emitido uma instrução normativa que restringe a exportação de carne bovina para a União Europeia em fazendas de corte que utilizam ésteres de estradiol em fêmeas bovinas (MAPA, 2024). O argumento para a restrição ao E2 baseia-se na segurança alimentar. Porém, as doses utilizadas em protocolos de IATF induzem concentrações séricas de estradiol semelhantes aos de uma vaca em cio, entre 12 e 24 horas após os tratamentos. Além disso, o retorno às concentrações basais desse hormônio ocorre algumas horas após o tratamento, não diferindo dos animais tratados em 48 horas (BOSOLASCO et al., 2021). Nesse contexto, torna-se necessário criar alternativas aos protocolos a base de E2 e P4, caso essas restrições afetem a produção e exportação de carne no Brasil.

REFERÊNCIAS

- AYRES, H. et al. Validation of body condition score as a predictor of subcutaneous fat in Nelore (*Bos indicus*) cows. **Livestock Science**, v. 123, n. 2–3, p. 175–179, 1 ago. 2009.
- BARUSELLI, P. S. et al. Efeito de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo na eficiência reprodutiva de vacas de corte lactantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, p. 218–221, 2002.
- 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, jul. 2004.
- BARUSELLI, P. S. et al. Timed artificial insemination: Current challenges and recent advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 558–571, 14 ago. 2017.
- BARUSELLI, P. S. et al. Challenges to increase the AI and ET markets in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 3, p. 364–375, 13 ago. 2019.
- BISHOP, B. E. et al. Split-time artificial insemination in beef cattle: III. Comparing fixed-time artificial insemination to split-time artificial insemination with delayed administration of GnRH in postpartum cows. **Theriogenology**, v. 99, p. 48–52, 1 set. 2017.
- BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTÍNEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3–4, p. 307–326, 15 out. 2003.
- BÓ, G. A.; MENCHACA, A. Thematic Section: 36th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE) Prohibition of hormones in animal reproduction: what to expect and what to do? 2023.
- BOSOLASCO, D. et al. Estradiol cypionate administered at the end of a progesterone-based protocol for FTAI induces ovulation and improves postovulatory luteal function and uterine environment in anestrus beef cows. **Theriogenology**, v. 162, p. 74–83, 1 mar. 2021.
- CARVALHO, J. B. P. et al. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, n. 2, p. 167–175, 15 maio 2008.
- CEDEÑO, A. V. et al. Effect of expression of estrus and treatment with GnRH on pregnancies

per AI in beef cattle synchronized with an estradiol/progesterone-based protocol. **Theriogenology**, v. 161, p. 294–300, 1 fev. 2021.

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. 109–117, jan. 2008.

CROWE, M. A. Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. SUPPL. 5, p. 20–28, nov. 2008.

DIAS, J. C. et al. Efeitos da suplementação lipídica no aumento da eficiência reprodutiva de fêmeas bovinas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 2, p. 95–104, 2009.

Directive - 2003/74 - EN - EUR-Lex. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/ALL/?uri=CELEX%3A32003L0074>>. Acesso em: 16 maio. 2024.

DUFFY, P. et al. The effect of eCG or estradiol at or after norgestomet removal on follicular dynamics, estrus and ovulation in early post-partum beef cows nursing calves. **Theriogenology**, v. 61, n. 4, p. 725–734, 2004.

GARCIA-WINDER, M. et al. Effects of norgestomet on follicular development in postpartum beef cows. **Journal of animal science**, v. 64, n. 4, p. 1099–1109, 1987.

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. 173–179, 1995.

HESS, B. W. et al. Nutritional controls of beef cow reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. suppl_13, p. E90–E106, 1 jun. 2005.

LAFLAMMEL', L. F. et al. Effect of postpartum nutrition and cow body condition at parturition on subsequent performance of beef cattle. <https://doi.org/10.4141/cjas92-096>, v. 72, n. 4, p. 843–851, 1 dez. 2011.

LIU, T. C. et al. Effect of GnRH on ovulatory response after luteolysis induced by two low doses of PGF2 α in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 105, p. 45–50, 1 jan. 2018.

MACKEY, D. R. et al. Effect of acute nutritional restriction on incidence of anovulation and periovulatory estradiol and gonadotropin concentrations in beef heifers. **Biology of reproduction**, v. 61, n. 6, p. 1601–1607, 1999.

MADUREIRA, G. et al. Progesterone-based timed AI protocols for *Bos indicus* cattle II: Reproductive outcomes of either EB or GnRH-type protocol, using or not GnRH at AI. **Theriogenology**, v. 145, p. 86–93, 15 mar. 2020.

MAPLETOFT, R. J. et al. Evolution of knowledge on ovarian physiology and its contribution to the widespread application of reproductive biotechnologies in South American cattle. **Animal Reproduction**, v. 15, n. Supplement 1, p. 1003–1014, 5 set. 2018.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DEPARTAMENTO DE INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL - Ofício - Circular Conjunto N° 24/2024/DSA/ DIPOA/ SDA/ MAPA Brasília, 06 de setembro de 2024.

MURPHY, M. G.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. **Journal of reproduction and fertility**, v. 90, n. 2, p. 523–533, 1990.

NETT, T. M. et al. Pituitary receptors for GnRH and estradiol, and pituitary content of gonadotropins in beef cows. II. Changes during the postpartum period. **Domestic animal endocrinology**, v. 5, n. 1, p. 81–89, 1988.

PETER, A. T.; VOS, P. L. A. M.; AMBROSE, D. J. Postpartum anestrus in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 71, n. 9, p. 1333–1342, 1 jun. 2009.

PULLEY, S. L.; KEISLER, D. H.; STEVENSON, J. S. Concentrations of luteinizing hormone and ovulatory responses in dairy cows before timed artificial insemination. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 9, p. 6188–6201, 1 set. 2015.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2alpha and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915–923, 1995.

ROCHE, J. F.; CROWE, M. A.; BOLAND, M. P. Postpartum anoestrus in dairy and beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 28, n. 1–4, p. 371–378, 1 jul. 1992.

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

SÁ FILHO, O. G.; THATCHER, W. W.; VASCONCELOS, J. L. M. Effect of progesterone and/or estradiol treatments prior to induction of ovulation on subsequent luteal lifespan in

- anestrous Nelore cows. **Animal reproduction science**, v. 112, n. 1–2, p. 95–106, maio 2009.
- SALES, J. N. DE S. et al. Pre-TAI protocol strategies to increase reproductive efficiency in beef and dairy cows. **Animal reproduction**, v. 16, n. 3, p. 402–410, 23 out. 2019.
- SALES, J. N. S. et al. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 510–516, ago. 2012.
- SALES, J. N. S. et al. Effect of circulating progesterone concentration during synchronization for fixed-time artificial insemination on ovulation and fertility in *Bos indicus* (Nelore) beef cows. **Theriogenology**, v. 83, n. 6, p. 1093–1100, 1 abr. 2015.
- SALES, J. N. S. 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, 1 dez. 2016.
- SARTORI, R.; BARROS, C. M. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. **Animal reproduction science**, v. 124, n. 3–4, p. 244–250, abr. 2011.
- SILVA, L. A. C. L. et al. Presynchronization by induction of a largest follicle using a progesterone device in GnRH-based-ovulation synchronization protocol in crossbred dairy cows. **Theriogenology**, v. 119, p. 233–237, 1 out. 2018.
- SILVA, L. O. E. et al. Effect of progesterone from corpus luteum, intravaginal implant, or both on luteinizing hormone release, ovulatory response, and subsequent luteal development after gonadotropin-releasing hormone treatment in cows. **Journal of dairy science**, v. 106, n. 6, p. 4413–4428, 1 jun. 2023a.
- SILVA, S. A. et al. GnRH34 with or without estradiol cypionate in timed AI in *Bos indicus* beef cows. **Theriogenology**, v. 209, p. 134–140, 1 out. 2023b.
- 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.
- SIMÕES, L. M. S. et al. Progesterone (Injectable Sincrogest) pre-exposition to ovulation synchronization protocol tend to increase the conception rate at 30 days after TAI in high production *Bos taurus* dairy cows. **Animal Reproduction - Abstracts - 35th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE)**, 2022.

SOUZA, A. H. et al. A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 70, n. 2, p. 208–215, 15 jul. 2008.

STEWART, R. E. et al. Effects of insulin-like growth factor I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine thecal cells: involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone. **Journal of animal science**, v. 73, n. 12, p. 3719–3731, 1995.

STICK, D. A. et al. Relationship between blood serum insulin-like growth factor I concentration and postweaning feed efficiency of crossbred cattle at three levels of dietary intake. **Journal of animal science**, v. 76, n. 2, p. 498–505, 1998.

VASCONCELOS, J. L. M. et al. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 52, n. 6, p. 1067–1078, 1 out. 1999.

WALTENS, D. L. et al. Effect of steroids and/or 48 HR calf removal on serum luteinizing hormone concentrations in anestrous beef cows. **Theriogenology**, v. 18, n. 3, p. 349–356, 1982.

WILTBANK, M. C. et al. Effect of a second treatment with prostaglandin F₂ α during the Ovsynch protocol on luteolysis and pregnancy in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 12, p. 8644–8654, 1 dez. 2015.

WILTBANK, M. C.; GÜMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 21–52, 1 jan. 2002.

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

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

DIFERENTES ESTRATÉGIAS HORMONAIS EM PROTOCOLOS DE IATF SEM A UTILIZAÇÃO DE ESTRÓGENO NA FERTILIDADE DE VACAS *Bos indicus*

Artigo formatado segundo as normas da *Theriogenology*

Resumo

O objetivo foi avaliar a fertilidade de vacas Nelore (*Bos indicus*), pré sincronizadas com progesterona (P4) e submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação sem a utilização de estrógeno (E2). No experimento 1 [109 vacas *Bos indicus* (estudo A) e 389 vacas *Bos indicus* (estudo B)] foram administrados 150mg de P4 injetável (P4i) dez dias (D-10) antes do protocolo de IATF. No D0, as vacas receberam um dispositivo intravaginal de P4 e 2mg de Benzoato de estradiol (BE; Controle) ou 20µg de acetato de busarelina (GnRH/CE e 2GnRH). Oito dias depois (D8), o dispositivo de P4 foi removido e todas as vacas receberam 300UI de eCG e 500µg de Cloprostenol sódico (PGF2α). Além disso, as vacas receberam 1mg de cipionato de estradiol (CE; Controle e GnRH/CE) no D8 ou 10µg de acetato de busarelina (2GnRH) no D10. No D10 foi realizada a inseminação artificial (estudo B). No experimento 2 (699 vacas *Bos indicus*) as vacas do grupo Controle foram submetidas ao protocolo de IATF semelhante ao do estudo B. As vacas dos grupos GnRH/CE, 2GnRH48 e 2GnRH54 foram pré-sincronizadas com dispositivo de P4 sete dias antes do início do protocolo de IATF (D-7) e receberam 200µg de gonadorelina e um dispositivo intravaginal de P4 no D0. A retirada dos dispositivos de P4 foi realizada no D8 juntamente com a administração de 300UI de eCG e 530µg de PGF2α. Além disso, o grupo GnRH/CE recebeu 1mg de CE e nas vacas dos grupos 2GnRH/48h e 2GnRH/54h foram administrados 100µg GnRH 48 horas após a retirada do dispositivo de P4. A IATF foi realizada 48 horas (Controle, GnRH/CE e 2GnRH/48h) ou 54 horas (2GnRH/54h) após a retirada do dispositivo de P4. A análise estatística foi realizada pelo SAS. No estudo A, o diâmetro do folículo ovulatório foi maior nas vacas do grupo 2GnRH em comparação ao grupo Controle (P=0,02). No entanto, as vacas que receberam CE ovularam mais cedo (P=0,002) sem diferença na dispersão das ovulações (P=0,06). Em todos os experimentos as vacas que receberam GnRH no D0 apresentaram maior diâmetro folicular no D8 (Estudo A: P=0,002; Estudo B: P=0,001 e Exp. 2: P=0,001) e maior taxa de ovulação no D0 (Estudo A: P=0,002; Estudo B: P=0,001 e Exp. 2: P=0,001). Além disso, expressão de estro foi maior nas vacas que receberam CE (P=0,01; estudo B e P = 0,001; Exp. 2). A P /IA foi semelhante entre os grupos experimentais no estudo B (P = 0,19). No entanto, P /IA foi maior no grupo Controle (Exp. 2; P=0,001). Em conclusão, a remoção do estradiol (CE e BE) nos protocolos de sincronização da ovulação reduz a fertilidade de vacas *Bos indicus* lactantes.

Palavras-chave: Fertilidade, Nelore, proibição, estrogênio

Abstract

The objective was to evaluate the fertility of Nelore cows (*Bos indicus*), pre-synchronized with progesterone (P4) and submitted to an ovulation synchronization protocol without estrogen (E2). In experiment 1 [109 *Bos indicus* cows (study A) and 389 *Bos indicus* cows (study B)] 150 mg of injectable P4 (P4i) were administered ten days (D-10) before the TAI protocol. On D0, cows received an intravaginal P4 device and 2mg of estradiol benzoate (EB; Control) or 20µg of buserelin acetate (GnRH/EC and 2GnRH). Eight days later (D8), the P4 device was removed and all cows received 300 IU of eCG and 500 µg of sodium Cloprostenol (PGF2α). Additionally, cows received 1mg estradiol cypionate (EC; Control and GnRH/EC) on D8 or 10µg buserelin acetate (2GnRH) on D10. On D10, artificial insemination was performed (study B). In experiment 2 (699 *Bos indicus* cows), the cows in the Control group were submitted to a TAI protocol similar to that of study B. Cows in the GnRH/EC, 2GnRH48 and 2GnRH54 groups were pre-synchronized with a P4 device seven days before the start of the TAI protocol (D-7) and received 200 µg of gonadorelin and an intravaginal P4 device on D0. Removal of P4 devices was performed on D8 together with the administration of 300 IU of eCG and 530 µg of PGF2α. Furthermore, the GnRH/EC group received 1mg of EC and cows in the 2GnRH/48h and 2GnRH/54h groups were administered 100µg GnRH 48 hours after removal of the P4 device. TAI was performed 48 hours (Control, GnRH/EC and 2GnRH/48h) or 54 hours (2GnRH/54h) after removal of the P4 device. Statistical analysis was performed by SAS. In study A, the diameter of the ovulatory follicle was greater in cows in the 2GnRH group compared to the Control group (P=0.02). However, cows receiving EC ovulated earlier (P=0.002) with no difference in the dispersion of ovulations (P=0.06). In all experiments, the follicular diameter on D8 was greater in cows that received GnRH on D0 (Study A: P=0.002; Study B: P=0.001 and Exp. 2: P=0.001) as well as a higher ovulation rate on D0 (Study A: P=0.002; Study B: P=0.001 and Exp. 2: P=0.001). Furthermore, estrus expression was greater in cows receiving EC (P = 0.01; study B and P = 0.001; Exp. 2). P /AI was similar between experimental groups in study B (P = 0.19). However, P/AI was higher in the Control group (Exp. 2; P=0.001). In conclusion, removal of estradiol (EC and EB) in ovulation synchronization protocols reduces fertility of lactating *Bos indicus* cows.

Keywords: Fertility, Nelore, prohibition, estrogen

1. Introdução

Atualmente, os protocolos de sincronização da ovulação são rotineiramente utilizados em sistemas pecuários [1]. No Brasil, mais de 90% das inseminações em bovinos são realizadas por inseminação artificial em tempo fixo (IATF) [2]. Em fêmeas *Bos indicus*, a principal vantagem da implementação dos tratamentos hormonais na IATF é antecipar a primeira ovulação em vacas em anestro após o parto e, conseqüentemente, aumentar a eficiência reprodutiva do rebanho [3]. Assim, para obter resultados satisfatórios ao final do protocolo, as associações hormonais realizadas precisam mimetizar o que ocorre fisiologicamente na fêmea bovina. Inicialmente é necessário sincronizar a emergência de uma nova folicular que pode ser realizada de duas formas distintas pela combinação de progesterona (P4) e estradiol (E2) ou pelo hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). A administração simultânea de P4 e E2 induz a supressão na liberação de FSH e LH e causa atresia folicular, independentemente do tamanho do folículo [4]. Dessa maneira, o surgimento de uma nova onda folicular ocorre entre 3,5 a 5 dias após o início do protocolo de IATF [3]. Outra forma de sincronizar a emergência da onda folicular e manter altas concentrações de P4 durante o protocolo hormonal é administrar GnRH no início do protocolo de sincronização da ovulação (D0). Essa estratégia, baseia-se na indução do pico de LH e, conseqüentemente, ovulação de um folículo com capacidade ovulatória [5,6]. No entanto, para a obtenção de resultados satisfatórios é necessária uma alta taxa de ovulação ao primeiro GnRH. Em vacas produtoras de leite, foi observada maior resposta a sincronização da ovulação e concepção quando iniciou-se o protocolo entre os dias 5 e 12 do ciclo estral [7]. Dessa maneira, protocolos de pré-sincronização foram desenvolvidos para otimizar a resposta ao protocolo a base de GnRH [8,9]. Em vacas leiteiras o principal protocolo de pré sincronização com resultados satisfatórios é o *Double-Ovsynch* com duas administrações de prostaglandinas [10]. No entanto, em vacas de corte submetidas ao protocolo de IATF com GnRH no D0 sem pré-sincronização foi observada menor taxa de prenhez em relação ao protocolo P4/E2 [11].

Recentemente, estudos demonstraram que a inserção do dispositivo intravaginal de P4, dez dias antes do protocolo de IATF aumenta o diâmetro folicular no D0 em vacas leiteiras submetidas ao protocolo *Ovsynch* [8]. Em vacas de corte, a progesterona injetável (P4i) administrada previamente ao protocolo de IATF aumentou o diâmetro folicular ao início do protocolo em vacas *Bos indicus* [12] e *Bos taurus* [13] submetidas ao protocolo a base de P4/E2. Nesse contexto, a P4i pode tornar-se uma alternativa de pré-sincronização para obter folículos responsivos ao GnRH no início do protocolo de IATF.

Os ésteres de estradiol são comumente utilizados em vacas *Bos indicus* para sincronizar a ovulação o que permite realizar a IA em momento pré-determinado. A administração de cipionato de estradiol (CE) resulta em ovulações 68,5 horas após a remoção do dispositivo de P4 [14]. Outra maneira de induzir a ovulação ao final do protocolo é utilizando GnRH, porém, o momento ideal para administrar o GnRH e realizar a IATF ainda é questionável em vacas *Bos indicus* de corte. O pico de LH ocorre 2 horas após a administração de GnRH, [15] e as ovulações entre 28 e 30 horas [16]. Em vacas *Bos taurus* produtoras de leite, a IA é realizada 16 horas após a administração do segundo GnRH no protocolo *Ovsynch* [10]. No entanto, em vacas de corte, o momento ideal de administração de GnRH em protocolos de sincronização sem estrógeno ainda é questionável [17–20].

No Brasil, o protocolo de sincronização da ovulação que associa P4 e E2 está bem estabelecido em vacas de corte *Bos indicus*, apresentando resultados entre 50 - 60% de taxa de concepção [21,22] com custo inferior aos protocolos que utilizam GnRH. Entretanto, o uso de ésteres de estradiol em protocolos de IATF em países da Europa e Estados Unidos não são permitidos [23] com a justificativa de que o E2 pode deixar resíduos na carne e no leite . Recentemente, países da América do Sul apresentam proibições (Uruguai) ou restrições (Paraguai e Argentina) em relação a utilização de E2 nos protocolos de IATF em fêmeas bovinas [24]. Nesse contexto, o aprimoramento dos protocolos a base de GnRH, para obter resultados satisfatórios em vacas *Bos indicus*, tornam-se necessários, caso a restrição ao E2 afete a produção e exportação de carne no Brasil. Recentemente no Brasil foi emitida uma instrução normativa que restringe a exportação de carne bovina para a União Europeia em fazendas de corte que utilizam ésteres de estradiol em fêmeas bovinas (Ofício - Circular Conjunto Nº 24/2024/DSA/ DIPOA/ SDA/ MAPA).

Assim, dois diferentes estudos foram realizados para avaliar a fertilidade de vacas *Bos indicus* submetidas a duas diferentes estratégias de pré-sincronização com P4 em protocolos de sincronização da ovulação sem a utilização de estradiol. O objetivo do experimento 1 foi avaliar a dinâmica folicular e P/IA de vacas *Bos indicus* pré-sincronizadas com P4i em protocolos de IATF sem a utilização de E2. A hipótese foi que o protocolo de IATF sem estradiol com pré sincronização (P4i) resulta em fertilidade semelhante ao protocolo a base de P4/E2. O objetivo do experimento 2, foi avaliar a dinâmica folicular e P/IA de vacas *Bos indicus* pré-sincronizadas com dispositivo de P4 em protocolos de IATF sem a utilização de E2 com IA 48h ou 54h após a remoção do dispositivo de P4. A hipótese foi que o protocolo de IATF sem E2 com a IATF 54h após a remoção do dispositivo de P4 (6h após a administração de GnRH) melhora os resultados de fertilidade dos protocolos a base de GnRH.

2. Material e Métodos

As preparações hormonais do experimento 1 (dispositivo intravaginal de P4 - Sincrogest®, Cloprostenol ou Prostaglandina F2a- Sincrocio®, Benzoato de Estradiol - Sincrodiol®, Progesterona injetável ou P4i - Sincrogest Injetavel®, Gonadotrofina Coriônica Equina - SincroeCG®, Cipionato de Estradiol - SincroCP®, Hormônio liberador de gonadotrofinas/buserelina ou GnRHb - Sincroforte®) foram provenientes do Laboratório Ouro Fino Saúde Animal, São Paulo, Brasil.

As preparações hormonais do experimento 2 (dispositivo intravaginal de P4 - Crestar IVG 1g®, Cloprostenol ou Prostaglandina F2a- Ciosin®, Benzoato de Estradiol - Ferticare sincronização®, Gonadotrofina Coriônica Equina - Folligon®, Cipionato de Estradiol - Ferticare ovulação®, Hormônio liberador de gonadotrofinas/gonadorelina ou GnRHg - Fertagyl®) foram provenientes do Laboratório MSD, São Paulo, Brasil.

*2.1. Experimento 1 - Dinâmica folicular e taxa de prenhez em vacas *Bos indicus* submetidas ao protocolo de IATF sem a utilização de estrógeno e pré-sincronizadas com P4i*

2.1.1. Estudo A - Dinâmica folicular

2.1.1.1. Animais e local de realização do estudo

O experimento foi conduzido em duas fazendas comerciais localizadas no sudeste do Brasil no estado de Minas Gerais (Ingaí - MG; latitude: 21°29'47.4" Sul/longitude: 44°49'24.2"Oeste; Santa Rita do Ibitipoca-MG; latitude: 21°35'36.4" Sul/longitude: 43°55'58.9"Oeste) nos períodos de primavera e verão. No estudo foram utilizadas 109 vacas *Bos indicus* (Nelore) múltiparas com escore de condição corporal (ECC) médio de $2,78 \pm 0,02$ (escala de 1 a 5; [25]). Os animais foram mantidos em pastejo contínuo de *Brachiaria brizantha* e tiveram livre acesso à água e suplementação mineral.

2.1.1.2. Desenho experimental

Em pós-parto recente (30 a 45 dias), vacas *Bos indicus* (Nelore) receberam 150mg de P4i 10 dias antes do início do protocolo de IATF (D-10). No dia 0 (D0), as vacas receberam um dispositivo intravaginal de 1g de P4 e foram distribuídas aleatoriamente em três grupos experimentais [Controle (n=36), GnRH/CE (n=37) e 2GnRH (n=36)]. Nesse momento, as vacas do grupo Controle receberam 2mg de benzoato de estradiol (BE) e as vacas dos grupos

GnRH/CE e 2GnRH receberam 20µg de acetato de buserelina (GnRHb). Após oito dias (D8), os dispositivos de P4 foram removidos e administrou-se 300UI de eCG e 500µg de Cloprostenol (PGF) em todos os animais dos grupos experimentais. Além disso, as vacas dos grupos Controle e GnRH/CE receberam 1mg de cipionato de estradiol (CE). Após 48 horas (D10), as vacas do grupo 2GnRH receberam 10µg de GnRHb (Figura 1).

2.1.2. Estudo B - Dinâmica folicular e taxa de prenhez

2.1.2.1. Animais e local de realização do estudo

O experimento foi conduzido em duas fazendas comerciais localizadas no centro-oeste do Brasil no estado de Mato Grosso (Barra do Garças - MT; latitude: 15° 53' 35"Sul/longitude: 52° 15' 36"Oeste) nos períodos de primavera e verão. No estudo foram utilizadas 389 vacas *Bos indicus* (Nelore) multíparas com ECC médio de $2,72 \pm 0,02$ (escala de 1 a 5; [25]). Os animais foram mantidos em pastejo contínuo de *Brachiaria brizantha* e tiveram livre acesso à água e suplementação mineral.

2.1.2.2. Desenho experimental

As vacas *Bos indicus* (Nelore) foram pré-sincronizadas com 150mg de P4i 10 dias antes do início do protocolo de IATF (D-10). No dia 0 (D0), as vacas receberam um dispositivo intravaginal de P4 e foram distribuídas em três grupos experimentais [Controle (n=129), GnRH/CE (n=130) e 2GnRH (n=130)]. O restante dos tratamentos hormonais realizados foi semelhante ao estudo A. Em adição, a IATF foi realizada 48h após a retirada do dispositivo de P4 (D10). Nesse momento, as vacas do grupo 2GnRH receberam 10µg de GnRH (Figura 1).

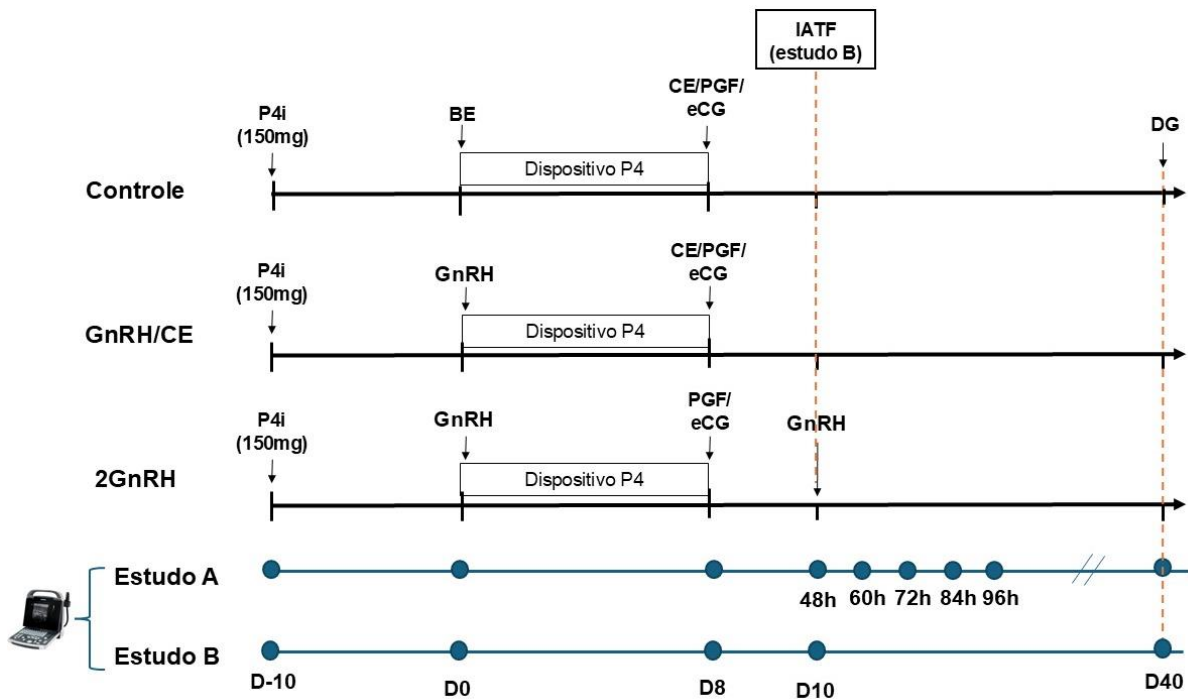


Figura 1. Desenho experimental. P4i – 150mg de progesterona injetável; BE: 2 mg benzoato de estradiol; Dispositivo intravaginal de P4 de 1g; GnRH - 20 μ g Buserelina (D0) e 10 μ g Buserelina (D10); CE – 1,0 mg de Cipionato de estradiol; eCG - 300 UI de gonadotrofina coriônica equina; PGF - 500 mg de cloprostenol; US - exames ultrassonográficos (estudo A e B). IATF - inseminação artificial em tempo fixo (estudo B)

2.2. Experimento 2 - Dinâmica folicular e taxa de prenhez em vacas *Bos indicus* submetidas ao protocolo de IATF sem a utilização de estrógeno e pré-sincronizadas com dispositivo intravaginal de P4

2.2.1. Animais e local de realização do estudo

O estudo foi conduzido em duas fazendas comerciais localizadas no centro-oeste do Brasil no estado de Mato Grosso (Barra do Garças - MT; latitude: 15° 53' 35"Sul/longitude: 52° 15' 36"Oeste). No estudo foram utilizadas 699 vacas *Bos indicus* (Nelore) lactantes com pós-parto de 30 a 60 dias e com ECC médio de $2,62 \pm 0,01$ (escala de 1 a 5; [25]). Os animais foram mantidos em pastejo contínuo de *Brachiaria brizantha* e tiveram livre acesso à água e suplementação mineral.

2.2.2. Desenho experimental

As vacas foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos experimentais (Controle, GnRH/CE, 2GnRH/48h e 2GnRH/54h) mantendo um número equilibrado de animais por ECC. Sete dias antes do início do protocolo de IATF (D-7), os animais dos grupos GnRH/CE (n=177), 2GnRH/48h (n=176) e 2GnRH/54h (n=176) receberam dispositivos intravaginais de P4 que permaneceram até o dia (D8). No dia 0 (D0), foram administrados 200µg de gonadorelina (GnRHg) nas vacas do grupo GnRH/CE, 2GnRH/48h e 2GnRH/54h. Nesse mesmo momento, os animais do grupo Controle (n=170) receberam dispositivos intravaginais de P4 e 2mg de BE. Oito dias depois (D8), os dispositivos de P4 foram removidos e administrados 0,530mg de PGF e 300UI de eCG em todos os animais. Em adição, as vacas dos grupos Controle e GnRH/CE receberam 1mg de CE. Nas vacas dos grupos 2GnRH/48h e 2GnRH/54h foram administrados 100µg GnRHg 48 horas após a retirada do dispositivo de P4. A IATF foi realizada 48 horas (Controle, GnRH/CE e 2GnRH/48h) e 54 horas (2GnRH/54h) após a retirada do dispositivo de P4.

2.3. Exames ultrassonográficos

Em todos os animais, exames ultrassonográficos foram realizados utilizando ultrassom Mindray DP-10 POWER com transdutor linear de 5-10MHz (Mindray, China). No estudo A do experimento 1 exames ultrassonográficos foram realizados para verificar o diâmetro do maior folículo no momento da retirada do dispositivo intravaginal de P4 (D8), o diâmetro máximo do folículo dominante (maior diâmetro atingido durante todas as avaliações ultrassonográficas), diâmetro máximo do folículo ovulatório (último diâmetro registrado antes de seu desaparecimento), crescimento folicular final (cálculo com base na diferença nos diâmetros do FD entre D8 e D10 divididos por dois), taxa de ovulação no D0 (a partir da presença do corpo lúteo no D8 em vacas que não apresentavam CL no D0 ou em lado contralateral ao CL observado no D0) e taxa de ovulação ao protocolo [26]. O momento da ovulação foi definido como o intervalo do desaparecimento de um folículo dominante em uma avaliação subsequente a sua visualização, menos 6 horas. Além disso, avaliações ultrassonográficas foram realizadas a cada 12 horas, a partir do D10 (48 horas após a remoção da P4) até a detecção da ovulação (Figura 1). No estudo B do experimento 1 e no experimento 2, exames ultrassonográficos foram realizados para verificar a presença de CL no momento da pré-sincronização (D-10 ou D-7), no início do protocolo de IATF (D0), no momento da retirada do dispositivo de P4 (D8) e na IATF (D10; visualização da formação completa do CL - Experimento 2). Além disso, foi registrado o diâmetro do maior folículo no momento da pré-

sincronização (D-10 ou D-7) e nos dias 0, 8 e 10. O diagnóstico de gestação e a taxa de ciclicidade (presença de CL no DG) após o protocolo de sincronização da ovulação foi realizada 30 dias após a IATF (D40; Figura 1).

2.4. *Detecção de estro*

Simultaneamente à remoção do dispositivo intravaginal (D8), a base da cauda das vacas [Experimento 2 (n = 389) e Experimento 3 (n = 699)] foi marcada com bastão de cera (Raidl-Maxi, RAIDEX GmbH, Dettingen/Erms, Alemanha). Considerou-se que o estro ocorreu nas vacas quando mais de 90% do giz da cauda foi removido no momento da IATF

2.5. *Análise estatística*

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Statistical Analysis System for Windows. No estudo A do experimento 1, as variáveis avaliadas foram diâmetro do maior folículo no momento da retirada do dispositivo intravaginal de P4 (D8), diâmetro máximo do folículo dominante, diâmetro máximo do folículo ovulatório, momento da ovulação, taxa de crescimento folicular, taxa de ovulação. O modelo inicial incluiu os efeitos de tratamento (Controle, GnRH/CE e 2GnRH), ECC no primeiro dia do protocolo de sincronização e interações. A dispersão das ovulações entre os grupos experimentais no estudo A foi avaliada pelo teste de Bartlett. No estudo B do experimento 1 e no experimento 2, as variáveis avaliadas foram diâmetro do maior folículo no momento da pré-sincronização (D-10: estudo B do Exp. 1 e D-7: Exp. 2) e nos dias 0, 8 e 10, expressão de estro, P/IA e ciclicidade no DG. 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 com ajuste de Tukey foi utilizado para verificar se houve diferenças entre as médias dos grupos. A taxa de ovulação (dados binomiais) foi analisada utilizando o procedimento GLIMMIX do SAS. Os dados binomiais (ocorrência de estro, presença de CL nos diferentes momentos e P/IA) foram analisados por meio de regressão logística multivariada utilizando o procedimento LOGISTIC do SAS. As variáveis foram removidas por eliminação retroativa com base no critério estatístico de Wald quando $P > 0,20$. No estudo B do experimento 1, as variáveis incluídas no modelo final foram tratamento (Controle, GnRH/CE e 2GnRH), fazenda e ECC no D0 e suas interações para análise da ciclicidade na pré-sincronização (D-10) e no diagnóstico de gestação (D40) e

ocorrência de estro. Para a análise da ciclicidade no início do protocolo (D0) permaneceram no modelo final as variáveis de ECC e tratamento. Para a análise da taxa de ovulação foi incluída no modelo final a variável de tratamento e para a taxa de prenhez foram incluídas as variáveis de tratamento e fazenda (touro e inseminador aninhados dentro de fazenda). No experimento 2, as variáveis incluídas no modelo final foram tratamento (Controle, GnRH/CE, 2GnRH48 e 2GnRH54), fazenda e ECC no D0 e suas interações para análise de ocorrência de estro e presença de CL no D40. Para a análise da ciclicidade na pré-sincronização (D-7), no início do protocolo (D0) e P/IA permaneceram no modelo final as variáveis de ECC e tratamento. Para a análise da taxa de ovulação no D0, taxa de CL no D8 e D10 foram incluídas no modelo final as variáveis de fazenda e tratamento. Essas variáveis binomiais foram analisadas pelo procedimento GLIMMIX do SAS. As variáveis contínuas foram apresentadas como média \pm erro padrão da média e as variáveis binomiais foram apresentadas como porcentagens. Diferenças com $P < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas e valores de P entre 0,05 e 0,1 foram consideradas tendência.

3. Resultados

3.1 Experimento 1 – Dinâmica folicular e taxa de prenhez de vacas *Bos indicus* pré sincronizadas com P4i

3.1.1 Estudo A

O diâmetro folicular no momento da retirada do dispositivo de P4 foi maior ($P = 0,002$) nas vacas que receberam GnRH (GnRH/CE e 2GnRH) no início do protocolo. Entretanto, o diâmetro médio do folículo dominante foi maior nas fêmeas que não receberam estradiol durante o protocolo (2GnRH; $P = 0,001$). Além disso, o diâmetro máximo do folículo ovulatório foi maior nas vacas que receberam o GnRH como indutor da ovulação (2GnRH) em comparação ao grupo Controle ($P = 0,02$). A taxa de crescimento folicular entre a retirada do dispositivo de P4 e a inseminação foi semelhante entre os grupos experimentais ($P = 0,16$). Vacas que receberam GnRH no início do protocolo (D0) tiveram maior taxa de ovulação no dia 0 ($P = 0,002$). No entanto, a taxa de ovulação final foi similar entre os grupos experimentais ($P = 0,52$). Além disso, as fêmeas que receberam CE como indutor da ovulação ovularam mais cedo ($P = 0,002$; Tabela 1). Porém, não foi observada diferença na dispersão das ovulações entre os grupos experimentais ($P = 0,06$; Figura 2).

Tabela 1 - Resposta folicular ovariana (média \pm EPM) de vacas Nelore (*Bos indicus*) pré-sincronizadas com P4i e submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação (com ou sem E2).

	Controle	GnRH/CE	2GnRH	P
Nº animais	36	37	36	
Diâmetro do folículo (mm)				
Na retirada do dispositivo (D8)	10,0 \pm 0,6 ^b	12,0 \pm 0,4 ^a	12,3 \pm 0,5 ^a	0,002
Dominante	12,9 \pm 0,5 ^b	13,9 \pm 0,5 ^b	15,1 \pm 0,6 ^a	0,001
Ovulatório	12,8 \pm 0,5 ^b	13,8 \pm 0,4 ^{a,b}	14,9 \pm 0,7 ^a	0,02
Momento da ovulação após a retirada da P4 (h)	71,1 \pm 1,7 ^b	73,3 \pm 1,9 ^b	78,0 \pm 1,2 ^a	0,002
Taxas				
Crescimento folicular (mm/dia)	1,46 \pm 0,20	1,03 \pm 0,15	1,45 \pm 0,20	0,16
Ovulação no D0 (%)	13,9 (5/36) ^b	37,8 (14/37) ^a	52,8 (19/36) ^a	0,002
Ovulação final (%)	75,0 (27/36)	75,7 (28/37)	83,3 (30/36)	0,52

^{a-b} Valores com letras diferentes diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$).

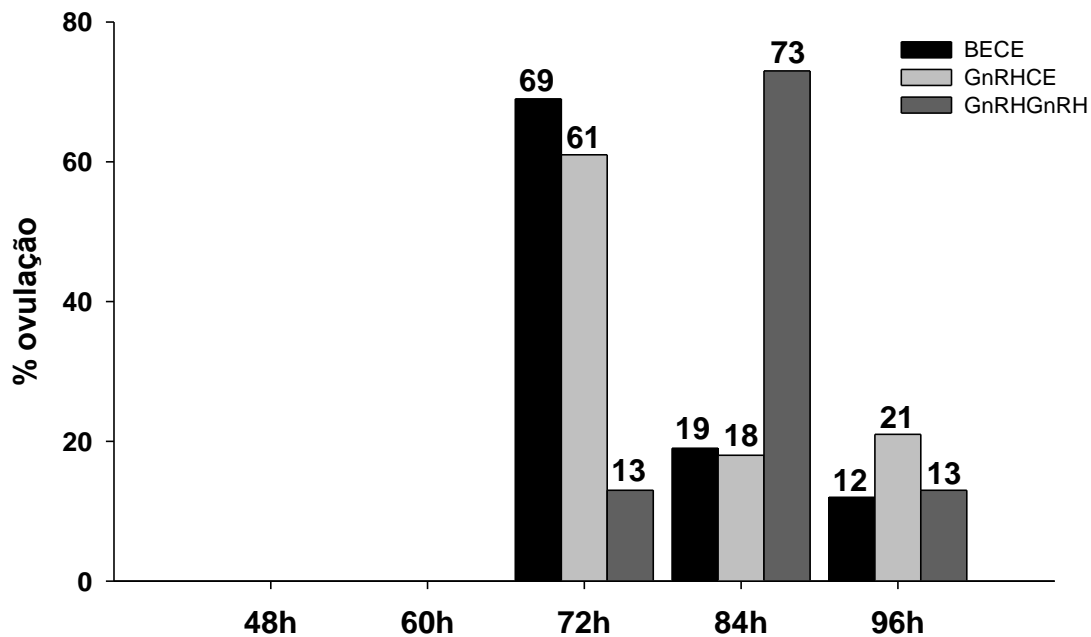


Figura 2. Distribuição do momento da ovulação (horas) após a retirada do dispositivo de P4 em vacas *Bos indicus* submetidas a diferentes protocolos de IATF (com ou sem E2) e pré-sincronizadas com P4i.

3.1.2 Estudo B

A taxa de ciclicidade (presença de CL) foi semelhante entre os grupos experimentais no momento da pré-sincronização com P4i (D-10; $P = 0,69$) e no início do protocolo de IATF (D0; $P = 0,68$). Em relação a dinâmica folicular, não houve diferença entre os grupos Controle, GnRH/CE e 2GnRH no diâmetro do folículo no dia da pré-sincronização (D-10; $P = 0,59$) e no dia da inserção do dispositivo de P4 (D0; $P = 0,59$). Entretanto, o diâmetro folicular foi maior nos grupos GnRH/CE e 2GnRH no momento da retirada do dispositivo de P4 (D8; $P = 0,001$) e na IATF (D10; $P = 0,001$). Além disso, a taxa de ovulação no D0 foi maior nas vacas que receberam GnRH no início do protocolo (Grupos GnRH/CE e 2GnRH; $P = 0,001$).

A taxa de expressão de estro foi maior nas vacas que receberam CE como indutor da ovulação (Controle e GnRH/CE; $P = 0,01$). A taxa de prenhez foi semelhante entre os grupos experimentais ($P = 0,19$) e a taxa de ciclicidade no momento do diagnóstico de gestação (D40), teve tendência de ser maior em vacas do grupo controle em relação ao grupo GnRH/CE ($P = 0,06$, Tabela 2).

Em relação a ciclicidade por ECC, vacas com baixo ECC ($< 2,75$) tiveram menor incidência de CL no momento da pré-sincronização (D-10; $P = 0,004$), no início do protocolo

(D0; $P = 0,008$) e no diagnóstico de gestação (D40; $P = 0,003$). Além disso, a expressão de estro foi menor em vacas com $ECC < 2,75$ ($P = 0,03$), porém, a taxa de prenhez foi semelhante em vacas com $ECC < 2,75 \geq$ ($P = 0,33$; Tabela 3).

3.2. Experimento 2 - Dinâmica folicular e taxa de prenhez de vacas *Bos indicus* pré-sincronizadas com dispositivo de P4

A taxa de ciclicidade (presença de CL) foi semelhante entre os grupos experimentais no momento da pré-sincronização com P4i (D-7; $P = 0,29$) e no início do protocolo de IATF (D0; $P = 0,91$). No entanto, a taxa de presença de CL no momento da retirada do dispositivo de P4 (D8) foi maior nas vacas que receberam GnRH no início do protocolo (D0; $P = 0,001$). Na dinâmica folicular, não houve diferença entre os grupos experimentais em relação ao diâmetro do folículo no dia da pré-sincronização (D-7; $P = 0,71$) e no momento da IATF (D10; $P = 0,71$). No entanto, no dia da inserção do dispositivo (D0; $P = 0,02$) e no dia da retirada do dispositivo intravaginal de P4 (D8; $P = 0,001$), o diâmetro folicular foi maior nos grupos GnRH/CE, 2GnRH48 e 2GnRH54. A taxa de ovulação no D0 foi maior nos grupos que receberam GnRH ao início do protocolo (GnRH/CE, 2GnRH48 e 2GnRH54; $P = 0,001$). Além disso, a taxa de presença de CL no momento da IATF foi semelhante entre os grupos experimentais ($P = 0,21$; Tabela 2). A taxa de expressão de estro foi maior nas vacas que receberam CE como indutor da ovulação em relação ao grupo 2GnRH48 ($P = 0,001$).

A taxa de prenhez foi maior nas vacas que receberam BE e CE durante o protocolo de IATF ($P = 0,001$). Nas vacas que ovularam após a administração de GnRH no início do protocolo de IATF, a taxa de prenhez foi semelhante às vacas que receberam benzoato e cipionato de estradiol ($P = 0,45$). No entanto, nas vacas que receberam GnRH e não ovularam no início do protocolo houve tendência de melhor fertilidade nas vacas do grupo Controle ($P = 0,08$; Figura 3). A taxa de ciclicidade no momento do diagnóstico de gestação (D40) foi semelhante entre os grupos experimentais ($P = 0,43$).

Em relação a ciclicidade por ECC, vacas com baixo ECC ($< 2,75$) tiveram menor incidência de CL no momento da pré-sincronização (D-7; $P = 0,001$), no início do protocolo (D0; $P = 0,001$) e no diagnóstico de gestação (D40; $P = 0,001$). Porém, a presença de CL foi semelhante no momento da retirada do dispositivo de P4 e na IATF (D8; $P = 0,49$ e D10; $P = 0,26$, respectivamente). A taxa de ovulação ao D0 não diferiu em relação ao ECC das fêmeas ($P = 0,36$). No entanto, a expressão de estro e a taxa de prenhez foi menor em vacas com $ECC < 2,75$ ($P = 0,001$; Tabela 3).

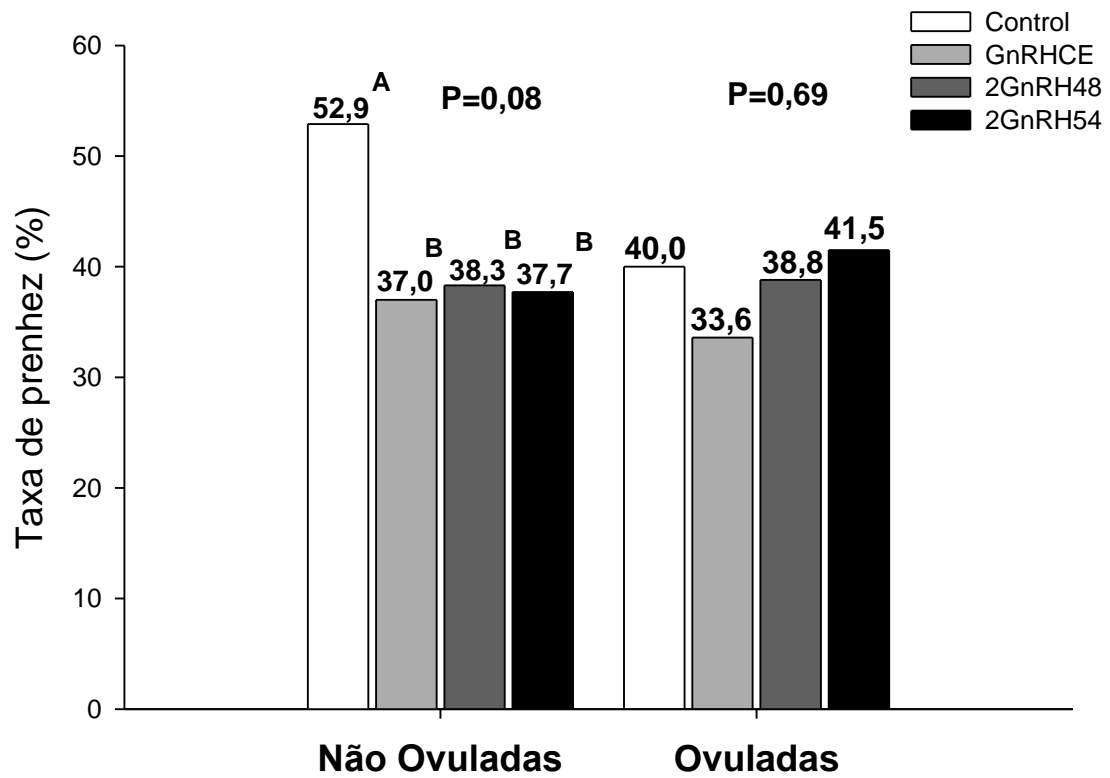


Figura 3: Taxa de prenhez de vacas *Bos indicus* que ovularam ou não no D0 submetidas a diferentes protocolos de IATF (com ou sem E2) e pré-sincronizadas com dispositivo intravaginal de P4.

Tabela 2 - Resposta folicular ovariana (média \pm EPM) de vacas Nelore (*Bos indicus*) pré-sincronizadas com P4i (Experimento 1 / Estudo B) ou dispositivo intravaginal de P4 (Experimento 2) submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação (com ou sem E2).

	Experimento 1 (estudo B)				Experimento 2				
	Controle	GnRH/CE	GnRH/GnRH	<i>P</i>	Controle	GnRH/CE	2GnRH48	2GnRH54	<i>P</i>
Nº animais	129	130	130		170	177	176	176	
Presença de CL (%)									
Pré-sincronização	3,1 (4/129)	5,4 (7/130)	3,9 (5/130)	0,69	4,7 (08/169)	11,5 (20/177)	12,4 (22/176)	9,4 (17/176)	0,29
D0	5,5 (7/127)	4,7 (6/128)	3,2 (4/127)	0,68	10,0 (17/169)	8,5 (15/177)	10,2 (18/176)	11,4 (20/176)	0,91
D8	-	-	-	-	8,9 (15/169) ^b	74,0 (131/177) ^a	73,3 (129/176) ^a	69,9 (123/176) ^a	0,001
D10 (IATF)	-	-	-	-	5,7 (5/88)	14,0 (13/93)	15,1 (14/93)	10,9 (10/92)	0,21
Diâmetro folicular (mm)									
Pré-sincronização	9,7 \pm 0,3	9,8 \pm 0,0	9,1 \pm 0,4	0,59	11,5 \pm 0,4	11,8 \pm 0,4	11,9 \pm 0,3	11,9 \pm 0,4	0,71
D0	12,0 \pm 0,3	12,4 \pm 0,3	12,0 \pm 0,3	0,59	12,3 \pm 0,3 ^b	13,3 \pm 0,3 ^a	13,2 \pm 0,3 ^{ab}	13,3 \pm 0,3 ^{ab}	0,02
D8	9,6 \pm 0,3 ^b	11,5 \pm 0,3 ^a	11,0 \pm 0,3 ^a	0,001	11,9 \pm 0,2 ^b	13,2 \pm 0,3 ^a	13,0 \pm 0,2 ^a	13,4 \pm 0,2 ^a	0,001
IATF	11,6 \pm 0,3 ^b	13,0 \pm 0,3 ^a	12,6 \pm 0,3 ^a	0,001	13,6 \pm 0,3	13,7 \pm 0,4	14,1 \pm 0,4	14,4 \pm 0,4	0,71

Taxa de ovulação no D0 (%)	0,0 (0/129) ^b	38,5 (50/130) ^a	45,4 (59/130) ^a	0,001	4,7 (8/169) ^b	69,5 (123/177) ^a	69,9 (123/176) ^a	61,9 (109/176) ^a	0,001
Expressão de estro (%)	48,8 (63/129) ^a	52,3 (68/130) ^a	34,6 (45/130) ^b	0,01	54,7 (93/169) ^a	53,7 (95/177) ^a	34,7 (61/176) ^b	46,6 (82/176) ^{ab}	0,001
Taxa de prenhez (%)	35,9 (46/128)	33,6 (43/128)	25,9 (33/127)	0,19	51,2 (87/169) ^a	34,5 (61/177) ^b	38,6 (68/176) ^b	40,3 (71/176) ^b	0,001
Taxa de CL no DG (%)	24,4 (20/82) ^A	12,9 (11/85) ^B	17,0 (16/94) ^{AB}	0,06	50,6 (42/83)	60,3 (70/116)	53,7 (58/108)	59,1 (62/105)	0,43

D0: Início do protocolo de IATF; D8: momento da retirada do dispositivo de P4; CL: Corpo lúteo; DG: Diagnóstico de gestação;

^{a-b} Valores com letras diferentes diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$).

Tabela 3 - Efeito do ECC na ciclicidade, taxa de ovulação no D0, taxa de estro e prenhez em vacas *Bos indicus* submetidas a diferentes protocolos de IATF (com ou sem E2) e pré-sincronizadas com P4i (estudo B) dispositivo intravaginal de P4 (experimento 2).

	Experimento 1 (estudo B)			Experimento 2		
	<2,75	≥ 2,75	P	<2,75	≥ 2,75	P
Presença de CL (%)						
Pré-sincronização	1,6 (3/190)	6,5 (13/199)	0,004	4,1 (16/394)	19,0 (58/304)	0,001
D0	1,1 (2/185)	7,6 (15/197)	0,008	4,3 (17/394)	17,4 (53/304)	0,001
D8	-	-	-	54,1 (213/394)	61,1 (185/304)	0,49
D10	-	-	-	8,5 (12/142)	13,4 (30/224)	0,26
DG	11,2 (15/134)	25,2 (32/127)	0,003	51,7 (136/263)	64,4 (96/149)	0,001
Taxa de ovulação no D0 (%)	-	-	-	51,8 (204/394)	52,3 (159/304)	0,36
Taxa de estro (%)	33,7 (64/190)	56,3 (112/199)	0,03	39,9 (157/394)	57,1 (174/304)	0,001
Taxa de prenhez (%)	28,3 (53/187)	35,2 (69/196)	0,33	33,3 (131/394)	51,2 (156/304)	0,001

ECC: Escore de condição corporal; CL: corpo lúteo; D0: início do protocolo de IATF; D8: retirada do dispositivo de P4; D10: IATF; DG: diagnóstico de gestação.

4. Discussão

Para nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo que avaliou protocolos de IATF sem estradiol em vacas *Bos indicus* que receberam fontes exógenas de progesterona (injetável e intravaginal) antes do protocolo de sincronização. A administração de GnRH no início do protocolo de sincronização da ovulação resultou em maior diâmetro folicular no momento da retirada do dispositivo intravaginal de P4 e maior taxa de ovulação no dia 0. Ao final do protocolo, fêmeas que receberam GnRH como indutor da ovulação ovularam mais tarde do que fêmeas que receberam cipionato de estradiol. No entanto, não houve diferença na dispersão das ovulações. Ainda, a taxa de prenhez foi maior em vacas que receberam ésteres de estradiol

durante o protocolo de IATF. Diante desses resultados, a hipótese do estudo foi rejeitada, demonstrando a grande importância do estradiol em protocolos de IATF em vacas *Bos indicus*.

O maior diâmetro folicular observado nas vacas que receberam GnRH no D0 do protocolo está relacionado com início da emergência de uma nova onda folicular. Após a administração de GnRH e a onda folicular inicia-se entre 1,5 a 2,1 dias em novilhas e vacas, respectivamente [27]. Nos protocolos de sincronização a base de P4 e E2 a onda folicular inicia-se em média 4 dias após essa associação [3,29,30]. Além disso, a taxa de crescimento folicular diária em *Bos indicus* é 1.1 mm por dia durante o protocolo de sincronização da ovulação [29]. Dessa forma, as vacas que receberam GnRH no início do protocolo tiveram 2 a 3 dias (2.2 a 3.3 mm) a mais de crescimento folicular resultando em maior diâmetro folicular na retirada do dispositivo [18].

Conforme esperado, as vacas que receberam GnRH no início do protocolo de sincronização da ovulação tiveram maior taxa de ovulação no D0, visto que a associação de estradiol e progesterona promove feedback negativo no hipotálamo levando a atresia folicular independentemente do diâmetro do folículo [30]. Em protocolos que utilizam GnRH é importante ocorrer a ovulação no início do protocolo para atender a primeira premissa da IATF que é sincronizar a emergência de onda, pois nesse protocolo a emergência de uma nova folicular ocorre a partir da ovulação de um folículo dominante no D0 [31]. Nesse contexto, para obter resultados satisfatórios é necessário a presença de um folículo responsivo ao GnRH. Estudos demonstraram que o momento ideal para iniciar protocolos a base de GnRH seria entre os dias 5 e 12 do ciclo estral [7]. No presente estudo, as vacas foram tratadas com P4 previamente ao início do protocolo para induzir persistência folicular e garantir folículos responsivos ao GnRH no início protocolo. Essa estratégia induziu a formação de folículos com diâmetro acima de 12 mm no D0 que são responsivos ao GnRH. No entanto, somente as vacas do experimento 2 tiveram altas taxas de ovulação. Esses resultados estão de acordo com outros estudos nos quais foi realizada a pré-sincronização com dispositivo intravaginal de P4 ou P4i tendo sido observado maior diâmetro folicular no dia 0 em vacas leiteiras [9] e de corte *Bos indicus* e *Bos taurus* [12,13]. Em adição, vacas que receberam GnRH como indutor da ovulação tiveram maior diâmetro do folículo ovulatório em relação ao grupo Controle. As vacas que receberam GnRH como indutor da ovulação ovularam mais tarde principalmente devido ao momento em que o indutor foi administrado, 48 horas após a administração do cipionato de estradiol. Soma-se a isso, o fato de que após a administração de GnRH, a ovulação ocorre entre 28 e 30 horas [16].

No presente estudo, foi observado maior expressão de estro em vacas que receberam cipionato de estradiol como indutor de ovulação, corroborando com os resultados de outro estudo no qual foi observada redução de 20% na expressão de estro em vacas que não receberam esse éster de estradiol [32]. O estro durante o protocolo de IATF é muito importante, pois, existe correlação positiva entre expressão de estro e taxa de concepção em vacas de leite [34] e de corte [33]. Estudos observaram aumento na taxa de concepção e em vacas *Bos indicus* tratadas com cipionato de estradiol na retirada do dispositivo de progesterona quando comparado com vacas que receberam somente GnRH como indutor da ovulação [35]. Em estudos em vacas Holandesas produtoras de leite foi demonstrado aumento na P/IA quando as vacas receberam 1mg de cipionato de estradiol como indutor da ovulação quando comparado com vacas que receberam GnRH [36]. O aumento do E2 no proestro parece estar relacionado a algumas funções uterinas após a ovulação [37–39]. Dessa forma, a melhora no estabelecimento da gestação se deve aos efeitos diretos no útero do aumento da exposição ao estradiol (endógeno e exógeno) durante o proestro e estro. Tal exposição melhora a capacidade de fecundação dos espermatozoides e modula o útero para receber o embrião no início de seu desenvolvimento. A ação do estradiol no útero está relacionada com a indução de receptores de progesterona no endométrio [40] e redução da expressão prematura de receptores de estradiol no útero, o que evita a luteólise precoce [41]. Também, aumenta o tamanho do concepto e a expressão de genes relacionados ao reconhecimento materno da gestação [42]. No entanto, no presente estudo, a suplementação com estradiol na retirada do dispositivo de progesterona (Grupo GnRH/CE), não aumentou a taxa de concepção em vacas que receberam GnRH no início do protocolo.

No presente estudo, a taxa de prenhez foi menor nos grupos que iniciaram com GnRH em relação ao grupo controle (experimento 2). A eficiência do GnRH para sincronizar a emergência de uma nova onda folicular pode ser menor em relação ao uso do BE, devido a menor magnitude do aumento de LH, após a administração de GnRH em *Bos indicus*, principalmente em vacas com a presença de CL [43]. Além disso, estudos demonstraram que a associação de E2 com P4 promove maior taxa de sincronização da emergência de onda do que vacas que receberam GnRH no D0 [44,45], o que contrasta com outro estudo em que a taxa de sincronização foi semelhante entre E2/P4 e GnRH [45]. No presente estudo foi utilizada dose de 16,2 µg de acetato de buserelina (dose dobrada) no dia 0, pois foi observada maior taxa de ovulação em vacas *Bos indicus* [46]. Ainda, não foi observada diferença na taxa de prenhez entre vacas ovuladas ou não dos grupos que receberam GnRH no D0. Uma possível explicação para esse achado poderia ser atribuído a menor taxa de crescimento folicular das vacas que ovularam no D0 devido ao aumento da progesterona [47]. No entanto, o diâmetro folicular nas

vacas que receberam GnRH no D0 foi maior do que no grupo E2/P4. Diante disso, apesar de melhor sincronização da onda nas vacas ovuladas, é possível que parte dessas vacas não tenha tido luteólise completa devido à presença de CL jovem. Ao final do protocolo é necessário que as concentrações de P4 sejam mínimas para que ocorra a ovulação e preparação do útero para a fecundação e desenvolvimento inicial do embrião. Estudos demonstraram que concentrações de P4 em torno de 1ng/mL no momento da IATF diminui a fertilidade [48]. Em vacas leiteiras submetidas ao protocolo *Ovsynch*, foi observada menor taxa de concepção em vacas com P4 > 0,4 ng/mL no momento da administração do segundo GnRH [49]. Dessa forma, no presente estudo, a administração de uma dose única de PGF2 α no momento da retirada da P4 pode não ter sido suficiente para desencadear luteólise completa nas vacas que ovularam ao GnRH no D0. Em outro estudo com mais de 2000 vacas de corte após o parto, foi observada maior taxa de prenhez no protocolo Co-Synch+P4 quando foi realizada a administração de duas doses de PGF2 α [50]. Além disso, foi observada maior taxa de luteólise em vacas tratadas com duas doses de PGF utilizando diferentes análogos [51]. No presente estudo, apesar de não ter sido observada diferença significativa na presença de corpo lúteo no D10, as vacas que receberam GnRH no início do protocolo apresentavam mais de 11% de corpo lúteo no momento da IATF. Esse achado pode ter interferido na taxa de ovulação, fecundação e desenvolvimento inicial do embrião. Dessa forma, apesar das vacas ovuladas terem melhor sincronização da emergência de onda, forma-se um corpo lúteo jovem que pode ter menor taxa de luteólise quando administrada dose única de prostaglandina, resultando assim em taxas de prenhez semelhantes entre vacas ovuladas e não ovuladas.

Os índices de fertilidade observados nesses estudos foram melhores em vacas com ECC >2,75. Esses resultados corroboram com outros estudos em que vacas com baixo ECC apresentam menor taxa de ciclicidade ao início do protocolo de IATF e no diagnóstico de gestação (D40), taxa de estro e menor taxa de prenhez [12,13,52]. O ECC é uma importante ferramenta de observação do estado metabólico do animal, pois existe forte relação com os níveis de metabólitos e de hormônios como IGF-1, insulina, leptina, grelina e ácidos graxos circulantes que tem ação direta tanto no hipotálamo, modulando a liberação de GnRH quanto nas gônadas, estimulando ou inibindo o crescimento folicular, produção de hormônios e interferindo na qualidade oocitária [53]. Assim, vacas em melhor condição corporal no início da estação de monta possuem melhor resposta ovariana aos tratamentos hormonais utilizados nos protocolos de IATF [22,54].

Conclui-se que a remoção do estradiol (CE e BE) nos protocolos de sincronização da ovulação reduz a fertilidade de vacas *Bos indicus* lactantes. Dessa forma, são necessários

ajustes nos protocolos de IATF sem a utilização de E2 em vacas *Bos indicus* pré-sincronizadas com P4 para melhorar os índices de fertilidade.

REFERÊNCIAS

- [1] Baruselli PS, Catussi BLC, de Abreu L ângelo, Elliff FM, da Silva LG, Batista E de OS. Challenges to increase the AI and ET markets in Brazil. *Anim Reprod* 2019;16:364–75. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0050/PDF/ANIMREPROD-16-3-364.PDF>.
- [2] BARUSELLI PS. Em 2023, apesar da redução do número de protocolos comercializados, 91,2% das inseminações no Brasil foram realizadas por IATF. *Bol Eletrônico Do Dep Reprodução Anim* 2024;8a ed.
- [3] Bó GA, Baruselli PS, Martínez MF. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci* 2003;78:307–26. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00097-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00097-6).
- [4] Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, et al. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 2002;57:53–72. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00657-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00657-4).
- [5] Sartori R, Fricke PM, Ferreira JCP, Ginther OJ, Wiltbank MC. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol Reprod* 2001;65:1403–9. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD65.5.1403>.
- [6] Gimenes LU, Sá Filho MF, Carvalho NAT, Torres-Júnior JRS, Souza AH, Madureira EH, et al. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology* 2008;69:852–8. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2008.01.001>.
- [7] Vasconcelos JLM, Silcox RW, Rosa GJM, Pursley JR, Wiltbank MC. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 1999;52:1067–78. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00195-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00195-8).
- [8] Silva LACL, Simões LMS, Bottino MP, Santos APC, Santos G, Martinez IYH, et al. Presynchronization by induction of a largest follicle using a progesterone device in GnRH-based-ovulation synchronization protocol in crossbred dairy cows. *Theriogenology* 2018;119:233–7. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2018.04.030>.
- [9] Souza AH, Ayres H, Ferreira RM, Wiltbank MC. A new presynchronization system

- (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2008;70:208–15.
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2008.03.014>.
- [10] Wiltbank MC, Baez GM, Cochrane F, Barletta R V., Trayford CR, Joseph RT. Effect of a second treatment with prostaglandin F₂ α during the Ovsynch protocol on luteolysis and pregnancy in dairy cows. *J Dairy Sci* 2015;98:8644–54.
<https://doi.org/10.3168/JDS.2015-9353>.
- [11] Baruselli PS, Marques MO, Carvalho NAT, Madureira EH, Campos Filho EP. Efeito de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo na eficiência reprodutiva de vacas de corte lactantes. *Rev Bras Reprodução Anim* 2002;26:218–21.
- [12] Simões LMS, Orlandi RE, Massoneto JPM, Scandiuzzi LA, 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>.
- [13] Simões LMS, Lima EA, Carvalho LR, Martínez MBP, Zanatta GM, Santos MFO, et al. Exposure to progesterone before an ovulation synchronization protocol increases the follicular diameter and fertility of multiparous suckled *Bos taurus* cows. *Theriogenology* 2024;218:239–43.
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2024.01.031>.
- [14] Sales JNS, Carvalho JBP, Crepaldi GA, Cipriano RS, Jacomini JO, Maio JRG, et al. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* 2012;78:510–6.
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2012.02.031>.
- [15] Pulley SL, Keisler DH, Stevenson JS. Concentrations of luteinizing hormone and ovulatory responses in dairy cows before timed artificial insemination. *J Dairy Sci* 2015;98:6188–201. <https://doi.org/10.3168/JDS.2015-9473>.
- [16] Liu TC, Chiang CF, Ho CT, Chan JPW. Effect of GnRH on ovulatory response after luteolysis induced by two low doses of PGF₂ α in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2018;105:45–50. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2017.09.013>.
- [17] Cedeño A V., Cuervo R, Tríbulo A, Tríbulo R, Andrada S, Mapletoft R, et al. Effect of expression of estrus and treatment with GnRH on pregnancies per AI in beef cattle synchronized with an estradiol/progesterone-based protocol. *Theriogenology*

- 2021;161:294–300. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2020.12.014>.
- [18] Madureira G, Consentini CEC, Motta JCL, Drum JN, Prata AB, Monteiro PLJ, et al. Progesterone-based timed AI protocols for *Bos indicus* cattle II: Reproductive outcomes of either EB or GnRH-type protocol, using or not GnRH at AI. *Theriogenology* 2020;145:86–93. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2020.01.033>.
- [19] Bishop BE, Thomas JM, Abel JM, Poock SE, Ellersieck MR, Smith MF, et al. Split-time artificial insemination in beef cattle: III. Comparing fixed-time artificial insemination to split-time artificial insemination with delayed administration of GnRH in postpartum cows. *Theriogenology* 2017;99:48–52. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2017.04.046>.
- [20] Sá Filho MF, Santos JEP, Ferreira RM, Sales JNS, 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] Bó GA, de la Mata JJ, Baruselli PS, Menchaca A. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology* 2016;86:388–96. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2016.04.053>.
- [22] Alves RLOR, Silva MA, Consentini CEC, e Silva LO, Folchini NP, Oliva AL, et al. Hormonal combinations aiming to improve reproductive outcomes of *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed AI protocols. *Theriogenology* 2021;169:89–99. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2021.04.007>.
- [23] Directive - 2003/74 - EN - EUR-Lex n.d. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/ALL/?uri=CELEX%3A32003L0074> (accessed May 16, 2024).
- [24] Bó GA, Menchaca A. Thematic Section: 36th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE) Prohibition of hormones in animal reproduction: what to expect and what to do? 2023. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2023-0067>.
- [25] 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. *Livest Sci* 2009;123:175–9. <https://doi.org/10.1016/J.LIVSCI.2008.11.004>.
- [26] Sá Filho MF, Baldrighi JM, Sales JNS, Crepaldi GA, Carvalho JBP, Bó GA, et al. Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci*

- 2011;129:132–9. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2011.12.005>.
- [27] Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2alpha and GnRH. *Theriogenology* 1995;44:915–23. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00279-H](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00279-H).
- [28] Bo GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 1995;43:31–40. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)00010-R](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)00010-R).
- [29] Bó GA, Baruselli PS, Martínez MF. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci* 2003;78:307–26. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00097-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00097-6).
- [30] 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. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.025>.
- [31] Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2alpha and GnRH. *Theriogenology* 1995;44:915–23. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00279-H](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00279-H).
- [32] Silva SA, Mondadori RG, Noleto GS, Barbosa IP, Gonçalves RL, Gasperin BG, et al. GnRH34 with or without estradiol cypionate in timed AI in *Bos indicus* beef cows. *Theriogenology* 2023;209:134–40. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2023.06.026>.
- [33] Perry GA, Smith MF, Lucy MC, Green JA, Parks TE, MacNeil MD, et al. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:5268–73. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0501700102>.
- [34] Lopes AS, Butler ST, Gilbert RO, Butler WR. Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2007;99:34–43. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2006.04.056>.
- [35] Sá Filho MF, Santos JEP, Ferreira RM, Sales JNS, 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>.
- [36] Cerri RLA, Santos JEP, Juchem SO, Galvão KN, Chebel RC. Timed artificial insemination with estradiol cypionate or insemination at estrus in high-producing dairy cows. *J Dairy Sci* 2004;87:3704–15. <https://doi.org/10.3168/JDS.S0022->

- 0302(04)73509-2.
- [37] 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>.
- [38] Binelli M, Pugliesi G, Hoeck VV, Sponchiado M, Ramos RS, Oliveira ML, et al. The role of proestrus on fertility and postovulatory uterine function in the cow. *Anim Reprod* 2018;11:246–53.
- [39] Vasconcelos JLM, Pereira MHC, Meneghetti M, Dias CC, Filho OGS, Peres RFG, et al. Relationships between growth of the preovulatory follicle and gestation success in lactating dairy cows. *Anim Reprod* 2018;10:206–14.
- [40] Zelinski MB, Stormshak F. Temporal relationships between endometrial RNA polymerase activities and steroid hormone receptors following estradiol administration during the midluteal phase of the ovine estrous cycle. *Biol Reprod* 1981;24:119–24. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD24.1.119>.
- [41] Kieborz-Loos KR, Garverick HA, Keisler DH, Hamilton SA, Salfen BE, Youngquist RS, et al. Oxytocin-induced secretion of prostaglandin F₂α in postpartum beef cows: effects of progesterone and estradiol-17β treatment. *J Anim Sci* 2003;81:1830–6. <https://doi.org/10.2527/2003.8171830X>.
- [42] Cooke RF, Pohler KG, Vasconcelos JLM, Cerri RLA. Estrous expression during a fixed-time artificial insemination protocol enhances development and interferon-tau messenger RNA expression in conceptuses from *Bos indicus* beef cows. *Animal* 2019;13:2569–75. <https://doi.org/10.1017/S1751731119000636>.
- [43] Batista EOS, Del Valle TA, Ortolan MDDV, Rennó FP, Nogueira GP, Souza AH, et al. The effect of circulating progesterone on magnitude of the GnRH-induced LH surge: Are there any differences between *Bos indicus* and *Bos taurus* heifers? *Theriogenology* 2017;104:43–8. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2017.08.008>.
- [44] Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, et al. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 2002;57:53–72. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00657-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00657-4).
- [45] Madureira G, Motta JCL, Drum JN, Consentini CEC, Prata AB, Monteiro PLJ, et al. Progesterone-based timed AI protocols for *Bos indicus* cattle I: Evaluation of ovarian function. *Theriogenology* 2020;145:126–37.

- <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2020.01.030>.
- [46] Carvalho LR, Souza Simões LM, Lemos LA, Vicente MP, Souza SV, Gonçalves Junior WA, et al. Use of injectable progesterone to replace the intravaginal progesterone device on the ovulation synchronization protocol reduces the pregnancy rate in *Bos indicus* cows. *Theriogenology* 2023;195:55–61.
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2022.10.008>.
- [47] Adams GP, Matteri RL, Ginther OJ. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *J Reprod Fertil* 1992;96:627–40. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0960627>.
- [48] Colazo MG, López Helguera I, Behrouzi A, Ambrose DJ, Mapletoft RJ. Relationship between circulating progesterone at timed-AI and fertility in dairy cows subjected to GnRH-based protocols. *Theriogenology* 2017;94:15–20.
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2017.02.004>.
- [49] Carvalho PD, Santos VG, Giordano JO, Wiltbank MC, Fricke PM. Development of fertility programs to achieve high 21-day pregnancy rates in high-producing dairy cows. *Theriogenology* 2018;114:165–72.
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2018.03.037>.
- [50] Bridges GA, Ahola JK, Brauner C, Cruppe LH, Currin JC, Day ML, et al. Determination of the appropriate delivery of prostaglandin F_{2α} in the five-day CO-Synch + controlled intravaginal drug release protocol in suckled beef cows. *J Anim Sci* 2012;90:4814–22. <https://doi.org/10.2527/JAS.2011-4880>.
- [51] Umaña Sedó SG, Figueiredo CC, Gonzalez TD, Duarte GA, Ugarte Marin MB, Crawford CA, et al. Evaluation of luteolysis, follicle size, and time to ovulation in Holstein heifers treated with two different analogs and doses of prostaglandin-F_{2α}. *J Dairy Sci* 2022;105:5506–18. <https://doi.org/10.3168/JDS.2021-21487>.
- [52] de Sousa Sales JN, Vicente MP, Carvalho LR, Lemos LA, Souza Simões LM, Alcántara Colli MH, et al. Is estradiol valerate an alternative to estradiol benzoate in promoting the synchronization of ovulation and timed artificial insemination in suckled *Bos indicus* beef cows? *Theriogenology* 2024;218:56–61.
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2024.01.027>.
- [53] D’Occhio MJ, Baruselli PS, Campanile G. Influence of nutrition, body condition, and metabolic status on reproduction in female beef cattle: A review. *Theriogenology* 2019;125:277–84. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2018.11.010>.
- [54] Nishimura TK, Martins T, da Silva MI, Lafuente BS, de Garla Maio JR, Binelli M, et

al. Importance of body condition score and ovarian activity on determining the fertility in beef cows supplemented with long-acting progesterone after timed-AI. *Anim Reprod Sci* 2018;198:27–36. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2018.08.042>.