



MATHEUS PEDROSO VICENTE

**hCG NÃO É UMA ALTERNATIVA À eCG NO PROTOCOLO
DE IATF EM VACAS *Bos indicus* MAS AUMENTA A
EFICIÊNCIA DOS PROTOCOLOS DE IATF EM VACAS QUE
NÃO APRESENTAM ESTRO**

**LAVRAS – MG
2025**

MATHEUS PEDROSO VICENTE

**hCG NÃO É UMA ALTERNATIVA À eCG NO PROTOCOLO DE IATF EM VACAS
Bos indicus, MAS AUMENTA A EFICIÊNCIA DOS PROTOCOLOS DE IATF EM
VACAS QUE NÃO APRESENTAM ESTRO**

Exame de defesa apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Reprodução Animal para 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).**

Vicente, Matheus Pedroso.

hCG não é uma alternativa à eCG no protocolo de iatf em vacas bos indicus mas aumenta a eficiência dos protocolos de iatf em vacas que não apresentam estro /
Matheus Pedroso Vicente. - 2025.

63 p. : il.

Orientador: José Nélio de Sousa Sales

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2025.
Bibliografia.

1. Utilização de hCG em substituição à eCG em protocolos de sincronização da ovulação em vacas Bos indicus. 2. Utilização de hCG no momento da inseminação artificial em vacas Bos indicus submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação. 3. Utilização de hCG no momento da inseminação artificial em vacas Bos indicus que não manifestaram estro ao final do protocolo de sincronização da ovulação. I. Sales, José Nélio de Sousa. II. Universidade Federal de Lavras. III. Título.

MATHEUS PEDROSO VICENTE

hCG NÃO É UMA ALTERNATIVA À eCG NO PROTOCOLO DE IATF EM VACAS *Bos indicus*, MAS AUMENTA A EFICIÊNCIA DOS PROTOCOLOS DE IATF EM VACAS QUE NÃO APRESENTAM ESTRO


hCG IS NOT AN ALTERNATIVE TO eCG IN THE TAI PROTOCOL IN *Bos indicus* COWS, BUT IT INCREASES THE EFFICIENCY OF TAI PROTOCOLS IN COWS THAT DO NOT SHOW ESTRUS.

Exame de defesa apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Reprodução Animal para obtenção do título de Mestre

Aprovado aos 23 dias do mês de Maio do ano de 2025

Prof. Dr. Bernardo Garziera Gasperin – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Marco Roberto Bourg de Mello – Universidade Federal de Juiz de Fora

Documento assinado digitalmente
 JOSE NELIO DE SOUSA SALES
Data: 16/04/2026 09:48:07-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. José Nélio de Sousa Sales
Orientador

**LAVRAS – MG
2025**

AGRADECIMENTOS

A realização deste mestrado só foi possível graças ao apoio e dedicação de muitas pessoas e instituições que, de diferentes formas, contribuíram para esta conquista.

Em primeiro lugar, agradeço profundamente à minha família, pelo amor incondicional, incentivo constante e compreensão diante das ausências e desafios enfrentados durante esta jornada. O suporte de vocês foi fundamental para que eu pudesse seguir firme e confiante em cada etapa.

Aos amigos da República Mula Manca, pela convivência fraterna, companheirismo e pela leveza nos momentos de maior pressão, que tornaram a caminhada mais alegre e suportável.

Aos colegas médicos-veterinários, que compartilharam conhecimento, experiências e apoio técnico durante o desenvolvimento deste trabalho, fortalecendo não apenas minha formação profissional, mas também minha motivação pessoal.

Às empresas parceiras, pelo suporte, confiança e colaboração, que viabilizaram a execução deste estudo e ampliaram suas perspectivas de aplicabilidade prática.

Sou grato às agências de fomento CAPES, FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro, sem o qual a realização desta pesquisa não seria possível.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela infraestrutura, ambiente acadêmico de excelência e oportunidade de crescimento científico e pessoal.

A todos que, de alguma forma, estiveram presentes nesta trajetória, deixo meu sincero agradecimento.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a utilização da hCG em diferentes momentos do protocolo de IATF na fertilidade de vacas *Bos indicus* lactantes. Nos experimentos 1 e 2, as vacas receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (P4) e 2 mg de benzoato de estradiol (BE) no dia zero (D0). No experimento 1, o dispositivo foi removido após oito dias e meio (D8,5; estudo A) ou sete dias (D7; estudo B). Nesse momento foram administrados 500 µg de cloprostenol sódico (PGF2α) e 1 mg de um indutor de ovulação (BE no estudo A e CE no estudo B). Após a remoção do dispositivo, no estudo A, as vacas dos grupos controle (n=320), eCG (n=316) e hCG (n=321) não receberam tratamento adicional, 300 UI de eCG e 150 UI de hCG, respectivamente. De maneira similar, no estudo B, as vacas dos grupos controle (n=146), eCG (n=151) e hCG (n=151), receberam os mesmos tratamentos supracitados. A inseminação artificial ocorreu 36 horas após a retirada do dispositivo de P4 no estudo A e 48 horas no estudo B. Exames ultrassonográficos foram realizados nos dias zero (D0), da retirada do dispositivo de P4 e inseminação. O experimento 2 foi subdividido em três estudos (A, B e C). No estudo A, vacas do grupo controle (n=42) não receberam tratamento adicional, enquanto os grupos GnRH (n=44) e hCG (n=41) receberam 100 µg de gonadorelina e 1000 UI de hCG, respectivamente. Exames ultrassonográficos foram realizados no D0, D8, D10, D11, D12 e D22. No estudo B, as vacas receberam os mesmos tratamentos do estudo A (Controle; n=228, GnRH; n=227 e hCG; n=229). No estudo C, foram administrados 500 UI de hCG no grupo hCG500 (n=162), 800 UI no grupo hCG800 (n=165) e 1000 UI no grupo hCG1000 (n=168). Nos estudos A e B do experimento 1, observou-se maior ($P>0,05$) taxa de crescimento folicular nos grupos eCG ($P=0,003$) e hCG ($P=0,001$). As vacas do grupo hCG tiveram maiores taxas de ovulação antecipada ($P=0,001$) e expressão de estro ($P=0,006$). No entanto, menor taxa de prenhez foi observada nas vacas do grupo hCG ($P=0,01$) e Controle ($P=0,04$). No experimento 2, vacas tratadas com hCG mostraram maiores taxas de ovulação ($P=0,03$; estudo A) e de P/IA ($P=0,04$; estudos B). No estudo C, o grupo hCG1000 obteve a maior taxa de prenhez ($P=0,05$). Conclui-se que o hCG não é uma alternativa a eCG na retirada do dispositivo de P4. No entanto, a administração de 1000 UI de hCG no momento da inseminação aumenta a fertilidade de vacas *Bos indicus* que não manifestaram estro.

PALAVRAS-CHAVE: eCG; ovulação; crescimento folicular; *Bos indicus*.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the use of hCG at different times in the TAI protocol on the fertility of lactating *Bos indicus* cows. In experiments 1 and 2, the cows received an intravaginal progesterone (P4) device and 2 mg of estradiol benzoate (EB) on day zero (D0). In experiment 1, the device was removed after eight and a half days (D8.5; study A) or at seven days (D7; study B). At that moment of the P4 device removal, 500 µg of sodium cloprostenol (PGF2α) and 1 mg of an ovulation inducer (EB in study A and EC in study B) were administered. After the removal of the device, in study A, the cows in the control groups (n=320) did not receive additional treatment, while those in the eCG (n=316) and hCG (n=321) groups received 300 IU of eCG and 150 IU of hCG, respectively. Similarly, in study B, the cows in the control (n=146), eCG (n=151), and hCG (n=151) groups received the same aforementioned treatments. Artificial insemination occurred 36 hours after the removal of the P4 device in study A and 48 hours in study B. Ultrasonographic exams were performed on day zero (D0), on the day of the removal of the P4 device, and at insemination. Experiment 2 was subdivided into three studies (A, B, and C). In study A, cows in the control group (n=42) did not receive additional treatment, while the GnRH (n=44) and hCG (n=41) groups received 100 µg of gonadorelin and 1000 IU of hCG, respectively. Ultrasonographic examinations were performed on D0, D8, D10, D11, D12, and D22. In study B, the cows received the same treatments as in study A (Control; n=228, GnRH; n=227, and hCG; n=229). In study C, 500 IU of hCG were administered to the hCG500 group (n=162), 800 IU to the hCG800 group (n=165), and 1000 IU to the hCG1000 group (n=168). In studies A and B of experiment 1, a greater ($P>0.05$) follicular growth rate was observed in the eCG ($P=0.003$) and hCG ($P=0.001$) groups. The cows in the hCG group had greater rates of anticipated ovulation ($P=0.001$) and estrus expression ($P=0.006$). However, a lower pregnancy rate was observed in the cows of the hCG group ($P=0.01$) and the Control group ($P=0.04$). In experiment 2, cows treated with hCG showed greater ovulation rates ($P=0.03$; study A) and P/AI rates ($P=0.04$; studies B). In study C, the hCG1000 group achieved the greater pregnancy rates ($P=0.05$). It is concluded that hCG is not an alternative to eCG in the removal of the P4 device. However, the administration of 1000 IU of hCG at the time of insemination increases the fertility of *Bos indicus* cows that did not show estrus.

KEYWORDS: eCG; ovulation; follicular growth; *Bos indicus*.

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. A utilização do hCG (gonadotrofina coriônica humana) em protocolos reprodutivos de bovinos surge como uma alternativa promissora ao uso da eCG (gonadotrofina coriônica equina). Apesar de sua ampla eficácia, a obtenção da eCG envolve a exploração de éguas gestantes, o que tem gerado discussões e restrições relacionadas ao bem-estar animal e a aspectos éticos da produção. Nesse contexto, torna-se relevante a busca por substitutos que garantam resultados satisfatórios sem levantar questionamentos dessa natureza. O hCG apresenta mecanismos de ação semelhantes aos da eCG, sendo capaz de estimular a luteinização e promover o desenvolvimento de estruturas ovarianas funcionais. Especificamente em vacas *Bos indicus* submetidas a protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), o hCG tem papel importante como indutor da ovulação em fêmeas que não manifestaram estro ao final do tratamento hormonal. Nessas situações, a ausência de sinais de estro pode comprometer a ovulação espontânea e, conseqüentemente, reduzir as taxas de concepção. A administração de hCG garante a indução ovulatória, favorecendo a formação de um corpo lúteo funcional e a adequada produção de progesterona, condições essenciais para o estabelecimento e manutenção da gestação. Assim, o uso do hCG em protocolos de IATF com vacas *Bos indicus* representa não apenas uma estratégia eficiente para aumentar a sincronização da ovulação e as taxas de prenhez, mas também uma alternativa eticamente responsável,

alinhada às demandas atuais de sustentabilidade e respeito ao bem-estar animal na produção pecuária.

IMPACT INDICATORS

Cattle ranching plays a significant role in the Brazilian economy. In 2022, the livestock sector, encompassing farming, industry, services, and supplies, accounted for approximately 6.93% of Brazil's Gross Domestic Product (GDP). Thus, greater 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 necessary to produce one calf per cow per year. For this purpose, ovulation synchronization protocols based on progesterone and estrogen are widely used to perform fixed-time artificial insemination (FTAI) in Brazil. It is estimated that in 2023 more than 24 million FTAI protocols were carried out in the country, involving around 7,000 professionals working in the field. However, only 22% of all females of reproductive age were inseminated, which demonstrates the great growth potential of this biotechnology in Brazil. Consequently, the sale of FTAI protocols in the animal reproduction sector generated an estimated revenue of R\$563 million. The use of hCG (human chorionic gonadotropin) in bovine reproductive protocols emerges as a promising alternative to the use of eCG (equine chorionic gonadotropin). Despite its broad efficacy, eCG production involves the exploitation of pregnant mares, which has raised discussions and restrictions related to animal welfare and ethical aspects of its production. In this context, it becomes highly relevant to seek substitutes that ensure satisfactory results without raising such concerns. hCG presents mechanisms of action similar to those of eCG, being capable of stimulating luteinization and promoting the development of functional ovarian structures. Specifically, in *Bos indicus* cows subjected to fixed-time artificial insemination protocols, hCG plays an important role as an ovulation inducer in females that do not exhibit estrus at the end of the hormonal treatment. In these cases, the absence of estrus signs may compromise spontaneous ovulation and, consequently, reduce conception rates. The administration of hCG ensures ovulation induction, favoring the formation of a functional corpus luteum and the adequate production of progesterone, both of which are essential for the establishment and maintenance of pregnancy. Therefore, the use of hCG in FTAI protocols for *Bos indicus* cows represents not only an efficient strategy to improve ovulation synchronization and pregnancy rates but also an ethically responsible alternative, aligned with current demands for sustainability and respect for animal welfare in livestock production.

LISTA DE FIGURAS

- Figure 1. Experimental design. EB - 2mg or 1mg of estradiol benzoate; Intravaginal P4 device of 0.6 g; PGF2 α - 500 μ g of cloprostenol; EC - 1mg of estradiol cypionate; eCG - 300UI of equine chorionic gonadotropin; hCG - 150UI of human chorionic gonadotropin; TAI - timed artificial insemination; PD - pregnancy diagnosis.....35
- Figure 2. Experimental design. EB - 2mg of estradiol benzoate; Intravaginal P4 device of 1.2g; PGF2 α - 500 μ g of cloprostenol; EC - 1mg of estradiol cypionate; eCG - 300UI of equine chorionic gonadotropin; hCG - 1000UI of human chorionic gonadotropin; GnRH - 100 μ g of gonadorelin; TAI - timed artificial insemination; PD - pregnancy diagnosis.....37
- Figure 3. Effect of hCG and GnRH administration at the time of TAI on the pregnancy rate of Bos indicus cows that did not show estrus.....45

LISTA DE TABELAS

Table 1. Ovarian follicular response (mean \pm SEM) and rates of early ovulation, estrus, and conception in <i>Bos indicus</i> cows subjected to the ovulation synchronization protocol using eCG or hCG at the time of removal of the intravaginal P4 device (D8.5).....	42
Table 2. Ovarian follicular response (mean \pm SEM) and rates of early ovulation, estrus, and conception in <i>Bos indicus</i> cows subjected to the ovulation synchronization protocol using eCG or hCG at the time of removal of the intravaginal P4 device (D7).....	43
Table 3. Effect of treatment with different ovulation inductors at the time of TAI on ovarian response (mean \pm SEM) in Nelore cows (<i>Bos indicus</i>) subjected to the ovulation synchronization protocol.....	44

LISTA DE SIGLAS

µg	Microgramas
AGNE	Ácidos graxos não esterificados
BE	Benzoato de estradiol
BHB	β-hidroxi butirato
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
FSH	Hormônio folículo estimulante
g	Gramas
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
h	Horas
hCG	Gonadotrofina Coriônica humana
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina
i.m.	Intramuscular
LH	Hormônio luteinizante
mg	Miligramas
N	Número
mm	Milímetros
P	Significância
P/IA	Prenhez por inseminação artificial
P4	Progesterona
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
UI	Unidades internacionais
vs	Versus

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	13
1. Introdução.....	13
2. Referencial teórico	14
2.1 Anestro pós-parto em vacas de corte	14
2.2 Protocolos de sincronização da ovulação	16
2.3 Fatores que influenciam o crescimento folicular em vacas <i>Bos indicus</i>	18
2.4 Indutores de ovulação	22
REFERÊNCIAS	26
SEGUNDA PARTE – ARTIGO	35
1. Introduction	36
2. Material and Methods.....	37
2.1 <i>Experiment 1: hCG at P4 device removal; follicular dynamics and fertility</i>	37
2.1.1 <i>Study A: hCG at P4 device removal in 8.5 days-protocols using EB for ovulation induction</i>	37
2.1.2 <i>Study B: hCG at P4 device removal in protocols (D7) using EC as the ovulation inducer</i>	38
2.2 <i>Experiment 2: hCG at FTAI</i>	39
2.2.1 <i>Study A: hCG at FTAI; follicular dynamics and corpus luteum quality</i>	39
2.2.2 <i>Study B: hCG at FTAI and fertility</i>	40
2.2.3 <i>Study C: Different hCG doses at FTAI and fertility</i>	41
2.2 <i>Detection of estrus</i>	41
2.4 <i>Ultrasound exams</i>	42
2.4.1 <i>Follicular growth evaluation</i>	42
2.4.2 <i>Pregnancy diagnosis</i>	42
2.4.3 <i>Statistical analysis</i>	43
3. Results	44
3.1 <i>Experiment 1: hCG at P4 device removal; follicular dynamics and fertility</i>	44
3.1.1 <i>Estudy A: hCG at P4 device removal in 8.5 days-protocols using EB for ovulation induction</i>	44
3.2 <i>Experiment 2: hCG at TAI</i>	46
3.2.1 <i>Study A: hCG at FTAI on follicular dynamics and corpus luteum quality</i>	46
3.2.2 <i>Studies B and C: hCG and different hCG doses at FTAI on fertility</i>	47

4. Discussion	48
REFERENCES	Erro! Indicador não definido.

PRIMEIRA PARTE

1. Introdução

O Brasil se destaca em cenário mundial como maior exportador de carne bovina. Dessa forma objetiva-se, através do aumento da eficiência reprodutiva do rebanho, melhor aproveitamento do desempenho produtivo dos animais. A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) é uma ferramenta de grande importância em âmbitos de melhoramento genético e aumento da eficiência reprodutiva, atuando diretamente no retorno à ciclicidade pós-parto. Grande parte das fêmeas bovinas *Bos indicus* se encontram em condição de anestro prolongado após a parição, em consequência de fatores relacionados ao déficit nutricional e inibição pela presença do bezerro (SALES et al., 2011; TORRES-JÚNIOR et al., 2016).

Os protocolos hormonais de IATF baseados em estrógeno (E2) e progesterona (P4) são amplamente utilizados em vacas de corte (*Bos indicus*) tendo como objetivo sincronizar a emergência de uma onda de crescimento folicular, controlar as concentrações de P4 e sincronizar ovulação. Vacas em condição anovulatória submetidas ao tratamento, podem responder com a primeira ovulação após o parto (BARUSELLI et al., 2004a, 2017; MENEGHETTI et al., 2009). Essa estratégia apresenta índices de concepção em torno de 50% (LAMB; MERCADANTE, 2016) fator esse que é muito influenciado pelas taxas ovulatórias ao final do protocolo de IATF que, em vacas de corte, são entre 85% e 90% (VASCONCELOS et al., 2018).

O déficit nas concentrações circulantes de LH é o principal causador de menores taxas de crescimento folicular e falhas ovulatórias, principalmente em vacas primíparas e com baixo escore de condição corporal (ECC; SIMÕES et al., 2018). Essa necessidade fisiológica de LH, em determinado momento da dinâmica folicular, foi evidenciada pelo aumento no crescimento folicular após suplementação com gonadotrofina coriônica equina (eCG) no dia da retirada do implante intravaginal de P4 (48 horas antes da inseminação artificial; (BOTTINO et al., 2021a). A administração de eCG aumentou as taxas de crescimento folicular e manifestação de estro em relação à suplementação apenas com hormônio folículo estimulante (FSH). Porém, a extração da eCG e o processo de purificação dificultam a produção padronizada do produto comercial (WILSHER; ALLEN, 2011). Além disso, existe um apelo da sociedade para que a

forma de obtenção desse produto seja revista, devida a exploração de éguas gestantes. Como alternativa a eCG, no suporte de estímulos aos receptores de LH para o crescimento folicular final, a gonadotrofina coriônica humana (hCG) é uma gonadotrofina que pode ser utilizada para promover o suporte de LH necessário para o crescimento folicular final, por ligar-se aos receptores de LH (KOISTINEN et al., 2019). Recentemente a hCG vem sendo utilizada como alternativa em substituição a eCG em protocolos de sincronização da ovulação (SOUZA et al., 2019).

Após o final do protocolo, a porcentagem de animais que manifestam estro é relacionado ao diâmetro folicular ovulatório, o que influencia a taxa de ovulação e produção de P4 no metaestro e diestro subsequentes, consequentemente, afetando a fertilidade do ciclo (NOGUEIRA et al., 2019; SÁ FILHO et al., 2010a). A administração de GnRH no momento da IA poderia ser uma alternativa para vacas que não manifestaram estro em resposta ao protocolo hormonal. No entanto, vacas *Bos indicus* submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação baseados em E2 e P4 que não manifestaram estro e receberam GnRH no momento da IA, não apresentaram melhoria na taxa de concepção (SÁ FILHO et al., 2011b).

Uma outra estratégia para melhorar a resposta a ovulatória em vacas que não manifestam estro ao final do protocolo é a utilização de hCG. Segundo Cunha (2021) vacas leiteiras das raças holandesas e Jersey, submetidas a aplicação de GnRH ou hCG a 7 dias após a manifestação de estro, obtiveram taxas de ovulação semelhantes entre os dois grupos (CUNHA et al., 2021).

2. Referencial teórico

2.1 Anestro pós-parto em vacas de corte

O sucesso produtivo na pecuária de corte está correlacionado a eficiência reprodutiva das matrizes. É importante que o maior número possível de fêmeas conceba até 75 dias após o parto, para que esse animal entregue dentro da fazenda um produto (bezerro) a cada ano. Contudo, grande parte dessas fêmeas, passam por um período anovulatório prolongado após o parto, que pode ser influenciado por fatores fisiológicos, nutricionais e pela presença do bezerro (CROWE, 2008; YAVAS; WALTON, 2000). Fisiologicamente, a fêmea bovina restabelece suas concentrações circulantes do hormônio folículo estimulante (FSH) há cerca de 3 dias após o parto. Em contrapartida, do hormônio luteinizante (LH) acontece por volta de 3 semanas,

onde a concentração desta gonadotrofina passa a ser superior a 1ng/ml (SCHAMS et al., 1978). Vacas de corte em bom estado nutricional, geralmente ovulam o primeiro folículo dominante por volta de 30 dias após o parto, entretanto, em situações de baixo escore de condição corporal (ECC), esse período pode estender-se de 70 a 100 dias (CROWE, 2008).

Segundo Sartori e Barros (2011) o acoplamento do eixo hipotalâmico-hipofisário influencia a duração do anestro fisiológico (SARTORI; BARROS, 2011), uma vez que a retroalimentação negativa, proveniente dos esteroides (E2 e P4), durante o final da gestação, suprime a liberação de FSH bem como os estoques de LH, impossibilitando crescimento folicular e ovulação nos últimos 20 a 25 dias prévios ao parto (CROWE et al., 1998; GINTHER et al., 1996). Dessa forma, após o parto espera-se que o retorno na liberação de LH e FSH aconteçam dentro do tempo esperado e que o LH consiga atingir um nível de pulsos suficientes (1 pulso/hora) para que ocorra o crescimento final do folículo dominante e, conseqüentemente, produção de E2 para realizar o feedback positivo no GnRH, induzindo a ovulação (CROWE, 2008).

Todavia, o rebanho brasileiro de gado de corte é criado, em sua grande maioria, de modo extensivo. Em certos casos, a degradação das pastagens dificulta a ingestão suficiente de nutrientes para suprir as demandas energéticas de uma vaca adulta, produzindo leite para o bezerro. O balanço energético negativo (BEN) gerado nessa fase, induz a mobilização de reservas corporais ocasionando um aumento nos metabolitos séricos, como os ácidos graxos não esterificados (AGNE) e β -hidroxi butirato (BHB; CROWE; DISKIN; WILLIAMS, 2014). Além disso o aumento de Neuropeptídios Y (NPY) que, atuando em conjunto com AGNE e BHB geram um feedback negativo à nível hipotalâmico, diminuindo a secreção de GnRH (HESS et al., 2005a). Em vacas de corte com restrição energética (Grupo alta energia – 1,4ng/ml vs grupo com restrição alimentar – 0,8ng/ml) foi observada redução na concentração sérica de LH (ng/ml) aos 42 dias pós-parto (HALL et al., 1991). Corroborando com esse resultado, vacas leiteiras em restrição alimentar apresentaram menor crescimento folicular em relação às vacas sem restrição (0,8mm/dia vs 1,8mm/dia, respectivamente; (LUCY et al., 1992). Nesse contexto, vacas em BEN apresentam crescimento e ação hormonal dos folículos influenciados pela diminuição nas concentrações circulantes do fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1; GRUMMER; MASHEK; HAYIRLI, 2004). Nas fêmeas bovinas, o IGF-1 atua na transição dos folículos ovarianos para o estágio gonadotrófico dependente. Dessa forma, o IGF-1 é responsável por aumentar a sensibilidade desses folículos submetidos às ações do FSH e

LH, proliferação celular e secreção de estradiol (SILVA; FIGUEIREDO; VAN DEN HURK, 2009).

Outro fator que pode retardar o retorno à ciclicidade em vacas de corte é o anestro lactacional. A liberação de opióides endógenos, estimulado pela presença física do bezerro e amamentação bloqueia a liberação de GnRH no hipotálamo, diminuindo os níveis circulantes de LH. Essa teoria foi confirmada com a aplicação de nolaxona, um importante antagonista aos opióides endógenos, em ovelhas com 18 dias de pós-parto, onde observou-se um acréscimo significativo nas concentrações circulantes de LH (ng/ml) quando comparada às concentrações antes da aplicação (Grupo solução salina - 0,93ng/ml vs grupo nolaxona - 8,59ng/ml; GREGG et al., 1986). Assim, a remoção temporária do bezerro é uma estratégia utilizada para aumentar as concentrações e quantidades de pulsos de GnRH e LH liberados pelo eixo hipotálamo-hipofisário (WHISNANT et al., 1985). Segundo Barreiros et al., (2014) a remoção temporária dos bezerros de vacas nelore em anestro ocasionou um incremento no tamanho (mm) do folículo dominante no momento da IATF (8,5 vs 10,3) além de aumentar as concentrações circulantes de P4 (4 vs 9,6 ng/ml), evidenciando o desbalanço hormonal ocasionado por essa situação (BARREIROS et al., 2014). Além disso, essa estratégia aumentou 10% na taxa de concepção em vacas de corte acíclicas submetidas a um protocolo de sincronização da ovulação (GEARY et al., 2001). Ademais, a eCG tem se mostrado muito eficaz em aumentar a taxa de crescimento final do folículo dominante (0,7 vs 1,4mm/dia) por promover ação semelhante aos hormônios FSH e LH (SALES et al., 2016).

Nesse contexto, ao longo dos anos, diversos pesquisadores buscam alternativas que objetivam mitigar esses problemas a fim de promover um incremento nas taxas de concepção de vacas de corte em condição de anestro pós-parto. Sendo assim, uma biotecnologia da reprodução amplamente utilizada é a IATF.

2.2 Protocolos de sincronização da ovulação

Os protocolos hormonais de IATF são utilizados em vacas e novilhas cíclicas ou acíclicas, culminando em ovulação em momento pré-determinado, possibilitando a realização da IA sem a necessidade de detecção prévia de estro (BARUSELLI et al., 2017). Essa biotecnologia da reprodução é uma ferramenta essencial que pode incrementar os índices reprodutivos em gado de corte, ao mitigar problemas como a observação de cio, mas principalmente, o prolongado anestro após o parto.

O primeiro protocolo de sincronização da ovulação desenvolvido para bovinos, denominado *Ovsynch*, utilizou a combinação do GnRH e prostaglandina 2 α (PGF2 α) para controlar o desenvolvimento da onda folicular e induzir ovulação sincronizada ao final do período previsto (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995). A administração da primeira dose de GnRH permite a indução da ovulação de um folículo dominante seguida da sincronização da emergência de uma onda folicular após 12 a 24 horas (TWAGIRAMUNGU; GUILBAULT; DUFOUR, 1995). Entretanto, a taxa de ovulação é afetada pelo tamanho do folículo dominante (FD), resultando em grande variação de resposta ovulatória e, conseqüentemente, taxas de concepção (VASCONCELOS et al., 1999). Diante disso, a combinação de E2 e P4 promove feedback negativo à nível hipofisário, ocasionando queda nas concentrações circulantes do FSH e LH, induzindo atresia de FD e folículos subordinados (FS), aumentando a taxa de sincronização de emergência de onda (BÓ et al., 2002).

A associação de benzoato de estradiol (BE) com dispositivos intravaginais de 0,5g a 2,0g de P4 (ALVES et al., 2021) é amplamente utilizada nos rebanhos nacionais e apresenta resultados satisfatórios na taxa de prenhez em vacas de corte. A P4 liberada pelos dispositivos intravaginais aumentam a performance reprodutiva pelo aumento da pulsatilidade do hormônio luteinizante (LH), crescimento folicular e ovulação (SALES et al., 2015). Nesse contexto, é necessário modular o crescimento folicular pela permanência do dispositivo de P4, que pode durar de 7 a 9 dias, seguida da retirada das fontes exógena (dispositivo intravaginal de P4) e endógena (indução da luteólise) para que ocorra ovulação (BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003a). Além disso, a administração da eCG na retirada do implante de P4 promove o crescimento do folículo dominante resultado em maiores taxas de ovulação e prenhez em vacas *Bos indicus* lactantes (BOTTINO et al., 2021a). Nesse mesmo momento, é fundamental a utilização de ésteres de estradiol para induzir ovulação sincronizada permitindo a IA em tempo pré-determinado (BARUSELLI et al., 2017). A indução da ovulação sincronizada pode ser realizada a partir da utilização de BE ou cipionato de estradiol (CE). Entretanto, o CE é comumente utilizado em protocolos de sincronização da ovulação por ser administrado junto com outros hormônios na retirada do dispositivo de P4 (SALES et al., 2012). Dessa forma, o protocolo de sincronização da ovulação mais utilizados em fêmeas *Bos indicus* consiste na administração de BE e inserção de um dispositivo intravaginal de P4 no dia zero (D0). Sete, oito ou nove dias depois, realiza-se a remoção da fonte exógena de P4, administração de PGF2 α , eCG e CE. Em seguida, realiza-se a IA 48 horas após a retirada do dispositivo intravaginal.

2.3 Fatores que influenciam o crescimento folicular em vacas *Bos indicus*

O processo de desenvolvimento folicular pode ser categorizado em três fases sucessivas estimuladas pela ação de gonadotrofinas sintetizadas e liberadas pela adenohipófise. As 3 fases são desenvolvimento inicial do folículo (pré antral), a progressão dependente do FSH e a fase final de maturação responsiva ao LH. O FSH exerce papéis importantes nas fases iniciais e finais do desenvolvimento folicular, estimulando o progresso inicial dos folículos e síntese de E2. O LH tem ação principal na fase final do desenvolvimento folicular, estimulando maturação folicular final, produção de E2 e ovulação (PALERMO, 2007). Para assegurar a ovulação de apenas um folículo dominante em espécies como bovinos, equinos e humanos, existe um mecanismo de seleção, denominado desvio folicular, que ocorre durante o desenvolvimento da onda folicular, com a função de garantir uma única ovulação por ciclo. Esse mecanismo é caracterizado por feedback negativo na hipófise, mediado pela inibina e E2, promovendo a redução na liberação de FSH (GINTHER et al., 1996). A redução na secreção de FSH pela hipófise, promove atresia dos folículos que ainda são dependentes desse hormônio para seu crescimento. No desvio folicular, observa-se diferenças no diâmetro folicular entre fêmeas *Bos indicus* (6mm) e *Bos taurus* (8,5mm). No entanto, o momento do desvio é semelhante entre os grupos genéticos ocorrendo cerca de 2,5 dias após a emergência da onda folicular (GINTHER, 2016; GINTHER et al., 1996; SARTORELLI et al., 2005). Dessa forma, o folículo dominante selecionado continua seu desenvolvimento de maneira normal, pela mudança na dependência primária de gonadotrofinas, uma vez que já possui receptores de LH nas células da granulosa e teca, embora ainda contenha grande quantidade de receptores para FSH nessa células, continuando seu desenvolvimento pelo estímulo do LH (FORTUNE, 2001; SARTORI et al., 2001).

O anestro pós-parto em fêmeas zebuínas está diretamente relacionado ao comprometimento na liberação de gonadotrofinas importantes para o desenvolvimento final do folículo dominante interferindo no crescimento folicular e impedindo que esses folículos alcancem diâmetros superiores a 6 mm, comprometendo a taxa de ovulação (BARUSELLI; GIMENES; SALES, 2007). Nesse contexto é necessário salientar a importância de aumentar o estímulo do crescimento folicular para que ele adquira capacidade ovulatória. Em fêmeas *Bos indicus*, o tamanho do folículo pré-ovulatório está diretamente relacionado com a probabilidade de ovulação. Um estudo realizado em novilhas Nelore, demonstrou que folículos dominantes entre 7-8,4mm, 8,5-10mm e maior que 10mm tiveram taxas de ovulações (após administração

de LH exógeno) de 33,3%, 80% e 90%, respectivamente (GIMENES et al., 2008). Diante desses fatores, vários tratamentos (eCG, hCG, FSH e desmama temporária) foram propostos para aumentar o crescimento final do folículo dominante de fêmeas *Bos indicus* submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação a base de E2 e P4.

A eCG é um hormônio glicoproteico secretado pelos cálices das células endometriais de éguas gestantes, apresentando seu pico de concentração plasmática entre os dias 55 e 70 de gestação. Após esse período, observa-se redução nos níveis circulantes, atingindo o mínimo por volta dos 130 dias. A eCG distingue-se por sua capacidade de induzir respostas semelhantes às do FSH e LH em espécies não equinas, promovendo a foliculogênese em outros mamíferos. Além disso, em bovinos, a eCG possui meia-vida de aproximadamente 40 horas, permanecendo detectável na circulação por até 10 dias. Em ratas hipofisectomizadas, essa ação estimulou o desenvolvimento folicular, demonstrando seu potencial na modulação reprodutiva (MURPHY; MARTINUK, 1991).

Em bovinos, diversos estudos foram realizados ao longo dos anos demonstrando a ação da eCG no desenvolvimento folicular. O número de folículos ovulados ou o momento da ovulação não alteram com a administração dessa gonadotrofina no momento da remoção do dispositivo de P4. Desse modo, a ação da eCG foi associada ao aumento do crescimento final do folículo pré-ovulatório. Devido ao maior desenvolvimento folicular, vacas tratadas com eCG apresentam maiores taxas de ovulação e prenhez, indicando o potencial benefício desse hormônio na melhoria da eficiência reprodutiva (DE SOUSA SALES et al., 2024b). Esses dados corroboram com estudos anteriores que demonstraram os efeitos positivos da administração da eCG na taxa de prenhez por inseminação artificial (P/IA) em rebanhos de vacas *Bos indicus* lactantes, especialmente no pós-parto recente (menos de dois meses) e em animais com ECC baixo (inferior a 2,75 em uma escala de 1 a 5). Em um estudo foi verificado que vacas tratadas com eCG tiveram maior taxa de crescimento (1,45mm/dia) quando comparadas com o grupo controle (0,91mm/dia; SALES et al., 2011). Resultados semelhantes foram observados em outro estudo, no qual vacas *Bos indicus* lactantes tratadas com 300UI de eCG, no momento da remoção do dispositivo de P4, apresentaram maiores taxas de crescimento folicular (1,4mm/dia vs 0,7mm/dia), ovulação (85,6% vs 58%) e P/IA (50,3% vs 34,7%) em relação às fêmeas não tratadas. Além disso, esse foi o primeiro estudo a demonstrar os efeitos da administração da eCG em vacas primíparas, evidenciando resultados mais expressivos nessa categoria animal (SALES et al., 2016). Esse fato pode ser atribuído às diferenças metabólicas

e às distintas demandas energéticas existentes entre vacas multíparas e primíparas lactantes (MEIKLE et al., 2004).

De maneira similar, em vacas lactantes da raça Girolando, com até 70 dias em lactação, o tratamento com 400UI de eCG resultou em aumento significativo na taxa de prenhez (39% versus 25,2%; PRATA et al., 2017). No entanto, no pós parto recente (60 e 80 dias) de vacas cruzadas (Jersey vs Holandês) não houve diferenças na taxa de prenhez (52,9% vs 51,4%) em vacas que receberam eCG quando submetidas ao protocolo *Ovsynch* (RANDI et al., 2018).

Esses achados reforçam a eficácia do uso de eCG em diferentes condições fisiológicas e produtivas. No entanto, o processo de extração e purificação da eCG representam desafios para a padronização da produção comercial desse hormônio (WILSHER; ALLEN, 2011). De maneira adicional, há crescente demanda social por revisão das práticas de obtenção do produto, devido às preocupações éticas relacionadas à exploração de éguas gestantes. Com base nessas informações, aliadas ao conhecimento sobre a fisiologia da fêmea bovina, diversas alternativas de promotores de crescimento foram estudadas com o objetivo de avaliar sua eficácia.

De forma alternativa, o hormônio FSH representa outra gonadotrofina potencialmente eficaz para estimular o crescimento folicular. O desenvolvimento folicular induzido pelo FSH ocorre devido ao grande número de receptores contidos nas células da granulosa, promovendo resposta ao estímulo (FORTUNE et al., 2001). O FSH purificado, extraído de hipófises suínas ou ovinas, é amplamente empregado em protocolos de superovulação em bovinos, oferecendo maior precisão e controle sobre a resposta ovariana (BÓ; MAPLETOFT, 2014). Entretanto, o FSH possui curto tempo de meia vida no organismo bovino sendo, aproximadamente 5 horas (DEMOUSTIER et al., 1988). Nesse contexto, alguns estudos foram realizados a fim de elucidar o efeito da administração de FSH em protocolos de sincronização da ovulação à base de E2 e P4.

Um estudo realizado na década passada objetivou avaliar o efeito da administração de 10mg de FSH no momento da remoção do dispositivo de P4 em relação ao tratamento com a eCG e mostrou que, vacas *Bos indicus* que receberam 300UI de eCG apresentaram maior taxa de crescimento folicular (1,4mm/dia) e ovulação (88,6%) em relação às vacas do grupo controle (0,9mm/dia; 71,6%) e grupo FSH (0,9mm/dia; 71,9%), respectivamente. Além disso, foi observado que o efeito da eCG foi mais eficiente em promover ovulação em vacas com folículos pequenos e médios (4-8mm) no momento do tratamento (SALES et al., 2011). Em um segundo estudo, foi observado taxa de prenhez semelhante entre vacas multíparas tratadas com eCG e FSH (57,3% vs 51%) porém somente as vacas que receberam eCG tiveram maior taxa de

preñez que o grupo controle. No entanto, a P/IA de vacas primíparas lactantes, dos grupos tratados com eCG (41,7%) e FSH (7,7%), não se comportaram da mesma forma (BOTTINO et al., 2021a). Dessa maneira, a utilização de FSH em protocolos de sincronização da ovulação em vacas *Bos indicus* ainda não está plenamente consolidada, devido aos resultados inferiores em comparação ao uso de eCG. Fatores como a diferença na duração da ação hormonal e a necessidade de um incremento de LH na fase final do crescimento folicular, podem contribuir para essas discrepâncias nos resultados.

A presença do bezerro atua como inibidor significativo da síntese e secreção de hormônios como o GnRH e o LH, impactando diretamente as taxas de crescimento folicular e ovulação. Em vacas de corte, as concentrações hormonais medidas 48 e 56 horas após o desmame apresentaram aumento na frequência de pulsos e na concentração circulante desses hormônios, em comparação com o período pré-desmame (WILLIAMS et al., 1996). Diante disso, vacas de corte acíclicas submetidas ao protocolo de sincronização a base de P4 e E2 obtiveram aumento na taxa de crescimento folicular, quando condicionadas à remoção temporária do bezerro (RTB) durante 56 horas (1,3mm/dia) no dia da retirada do implante de P4 em relação às vacas do grupo controle que não receberam nenhum tratamento (0,7mm/dia). Corriqueiramente, essa diferença não foi observada em relação ao grupo que recebeu 400UI de eCG (1,5mm/dia; (BARREIROS et al., 2014).

Dessa forma, a RTB entre a retirada do dispositivo de P4 e a IA (intervalo de 48-56 horas) pode ser uma alternativa interessante para permitir o crescimento final do folículo no período de proestro. Em um programa de ressincronização precoce (com 23 dias pós primeira IA), o tratamento com eCG ou a RTB em vacas Nelore lactantes demonstraram ser eficientes, uma vez que aumentou o número de vacas gestantes nos grupos RTB (74%) e eCG (76%) em relação ao grupo controle (61,6%; CAMPOS et al., 2013). No entanto, em outro estudo não foi observada aumento da fertilidade quando as vacas foram tratadas com eCG ou RTB ou na combinação de ambos. Esses resultados podem ser atribuídos ao elevado ECC dos animais participantes e à maior proporção de vacas múltiparas em relação às primíparas, visto que foi observada diferença significativa nas taxas de prenhez entre as duas categorias (51,7% versus 28,9%; PINHEIRO et al., 2009).

Como alternativa à eCG no suporte sustentado de estímulos aos receptores de LH durante o crescimento final do folículo, a hCG tem se mostrado uma opção viável, devido à sua capacidade de se ligar aos receptores de LH (KOISTINEN et al., 2019). A hCG é um hormônio glicoproteico secretado pelas células do sinciciotrofoblasto embrionário, com concentrações

detectáveis aproximadamente nove dias após a concepção, atingindo seu pico entre a 9^a e a 12^a semana gestacional. Sua estrutura é composta por duas subunidades: a subunidade α , que é estruturalmente idêntica à encontrada em outros hormônios glicoproteicos, como TSH, FSH e LH, e apresenta meia-vida de aproximadamente 24 a 30 horas; e a subunidade β , que é responsável pela atividade biológica específica do hormônio. A subunidade β da hCG confere sua função luteinizante, estimulando a produção de P4, e apresenta cerca de 80% de similaridade estrutural com o LH (PHYSIOLOGY, 3^a edição).

Recentemente, a hCG tem sido utilizada como alternativa à eCG em protocolos de sincronização da ovulação, demonstrando potencial para fornecer o suporte hormonal necessário ao crescimento final do folículo. Em um estudo em vacas Nelore foi avaliado o efeito de diferentes doses de hCG (200 UI, 250 UI e 300 UI) e de diferentes vias de administração [intramuscular (IM) e subcutânea (SC)]. Os resultados demonstraram que vacas tratadas com 300 UI de hCG e eCG obtiveram as maiores taxas de crescimento folicular (1,8mm/dia). As taxas de crescimento nos grupos controle, hCG 250 UI (SC) e hCG 200 UI foram inferiores, registrando 1,1mm/dia, 1,3mm/dia e 1,3mm/dia, respectivamente. Além disso, foi observada maior taxa de ovulação antecipada antes da IA no grupo tratado com 300 UI de hCG (44,4%). É importante destacar que os animais desse estudo apresentavam elevado (2,90) ECC o que resultou em número considerável de folículos com diâmetro superior a 10 mm no momento do tratamento (PRATA et al., 2018). Em outro estudo foi observado que a administração de 150 UI de hCG no momento da retirada do implante de P4 promoveu taxa de crescimento folicular comparável com as obtidas com o uso da eCG (SOUZA et al., 2019).

Dessa forma, a suplementação com hormônios que atuem em receptores de LH é fundamental para alcançar resultados satisfatórios e consistentes, especialmente em vacas com baixo ECC e em primíparas. Pois, a utilização de eCG em protocolos de sincronização da ovulação tem se mostrado uma estratégia eficaz para estimular o crescimento folicular final e elevar as taxas de prenhez, destacando-se como uma ferramenta valiosa na reprodução bovina. No entanto, novas estratégias devem ser desenvolvidas para ser uma alternativa à eCG, devido à complexidade e dificuldade de produção desse hormônio.

2.4 Indutores de ovulação

Os estrógenos (E2) são esteróides endógenos, destacando-se o 17 β -estradiol como seu principal representante que é sintetizado nos ovários, placenta e glândula adrenal. O 17 β -

estradiol exerce funções fundamentais na fisiologia reprodutiva, incluindo a indução do estro, o desenvolvimento das características sexuais secundárias e a regulação da liberação do GnRH e do LH. A manipulação do ciclo estral por meio da administração de compostos sintéticos, denominados ésteres de estradiol que mimetizam a atividade biológica do 17β -estradiol, visa estimular a liberação de GnRH e LH, induzindo a ovulação de FD em fêmeas bovinas na ausência de P4(CREPALDI; BARUSELLI, 2009).

Atualmente, BE e CE são os principais ésteres de estradiol utilizados na indução de ovulação sincronizada em vacas de corte (DE SOUSA SALES et al., 2024a). Sendo assim, é de extrema importância a compreensão da farmacocinética desses hormônios para estabelecer o momento de administração de cada fármaco com o objetivo de alcançar altas taxas de ovulação e prenhez. Estudos demonstraram diferenças entre esses ésteres de estradiol. Após a administração intramuscular de BE (1mg) ou CE (2mg) em vacas leiteiras não lactantes, observou-se diferenças no intervalo de tempo (horas) entre administração e aumento nas concentrações plasmáticas de 17β -estradiol (BE - 4 horas e CE - 12 horas), concentração máxima de estradiol (pg/ml) circulante (BE - 12,6pg/ml e CE - 33,0pg/ml) e tempo (horas) em que as concentrações permaneceram elevadas (BE - 24 horas e CE - 96 horas). Além disso, o CE induziu o pico de concentração de estradiol apenas 36 horas após sua administração (BURKE et al., 2000), confirmando o maior tempo de meia vida do CE em comparação ao BE.

As diferentes características farmacocinéticas entre os dois ésteres de estradiol e, consequentemente, momento do pico de LH, determinam momentos distintos de administração durante o protocolo de sincronização da ovulação. Essa informação foi confirmada a partir da indução de ovulação em vacas Nelore após a administração de BE e CE, no qual foi observado respostas diferentes de liberação de LH endógeno em relação à magnitude de pico (BE - 20,5ng/ml e CE - 9,4ng/ml), duração de pico (BE - 8,6 horas e CE - 16,5 horas) e momento do pico após administração (BE - 19,6 horas e CE - 50,5 horas). No entanto, em função do momento de administração dos ésteres de estradiol (BE no D9 e CE no D8), não foi observada diferença no momento das ovulações após a remoção do dispositivo de P4 (CE - 68,5 horas e BE - 70,2). Além disso, foi observado similares taxas de prenhez entre os tratamentos (CE - 61,8% e BE - 57,5%; SALES et al., 2012). Apesar da similar eficiência dos ésteres de estradiol, a administração do BE no D9 exige um manejo a mais (4 manejos), necessitando que os animais sejam manejados um dia a mais em instalações de contenção, o que aumenta a demanda por mão de obra (MACMILLAN; BURKE, 1996).

Apesar da necessidade de sincronização das ovulações, existe certa flexibilidade entre a retirada do dispositivo intravaginal de P4 e momento da inseminação (IA; 48 a 54 horas) sem alteração na taxa de prenhez. No entanto, a administração de BE no momento da retirada do dispositivo de P4 no dia oito (D8), seguida pela IA 54 horas mais tarde, resultou em redução na taxa de prenhez em comparação ao grupo submetido à IA 48 horas após a retirada (IA 48h - 58,8% e IA54h - 34,3%). Essa diferença pode ser atribuída à proximidade temporal entre a IA e a ovulação (AYRES et al., 2008). Nesse contexto, o atraso em 10 horas na retirada do implante de P4 concomitante à administração de BE (D8,5), possibilitou flexibilidade no tempo da realização da IA no D10, podendo ser realizada entre 38 horas (22 horas antes da ovulação) e 48 horas (12 horas antes da ovulação), após a retirada do implante de P4, mantendo a mesma eficiência em relação as taxas de prenhez (CREPALDI et al., 2019a).

Além de induzir ovulação sincronizada que permite a realização da IA em momento previamente estabelecido, a utilização dos ésteres de estradiol desempenha papel fundamental em aumentar as concentrações circulantes de E2 durante o proestro. Dessa forma, o E2 é responsável pela ação comportamental do estro, sendo base indispensável para as melhores taxas de prenhez ao final do protocolo de sincronização da ovulação (ROELOFS et al., 2006; SÁ FILHO et al., 2010a). Maiores concentrações circulantes de E2 estão relacionados com maior diâmetro do FD no momento da IA e maior probabilidade de ovulação e prenhez (NÚÑEZ-OLIVERA; BÓ; MENCHACA, 2022). Dessa forma, vacas *Bos indicus* lactantes que demonstraram estro entre a retirada e a IA, apresentaram maior diâmetro folicular no momento da retirada do dispositivo intravaginal de P4 (Estro - 11,9mm e Sem estro - 8,1mm) e no momento da IA (Estro - 13,9mm e Sem estro - 9,5mm) e maiores taxas de ovulação (Estro - 100% e Sem estro - 70,6%) e, conseqüentemente, maiores taxas de prenhez (Estro - 61,9% e Sem estro - 41,4%; SÁ FILHO et al., 2011a). Um estudo recente demonstrou menor taxa de prenhez nas fêmeas que não manifestaram estro (Estro - 45,9% vs grupo sem estro - 24,8%; DE SOUSA SALES et al., 2024). Nesse contexto, quando existe déficit no desenvolvimento folicular, a produção endógena de E2 é insuficiente para estimular adequadamente a secreção de GnRH, resultando em redução da liberação de LH e, conseqüentemente, na falha do processo ovulatório (PERRY et al., 2014). Além disso, vacas que não demonstram estro durante o protocolo podem não ter a sincronização da ovulação adequada durante o protocolo de IATF.

Os fármacos análogos agonistas ao GnRH foram desenvolvidos para estimular a liberação endógena de LH. Alguns diferentes análogos de GnRH (Gonadorelina, licerelina e busarelina) estimulam o aumento nas concentrações circulantes de LH, promovendo ovulação

de folículos dominantes e formação de corpo lúteo (CL) em fêmeas bovinas, quando administrados entre os dias 5 e 7 do ciclo estral (PADULA, 2005; PICARD-HAGEN et al., 2015). Em vacas multíparas lactantes da raça Holandesa, a administração de 100 µg de gonadorelina no D0 resultou na ovulação de 80% dos FD presentes no momento da administração desse análogo de GnRH (VALDÉS-ARCINIEGA et al., 2023). Diante disso, a utilização de análogos sintéticos de GnRH em vacas de corte submetidas ao protocolo de IATF que não apresentaram sinais evidentes de estro no momento da IA tem sido amplamente discutida ao longo dos anos. Nos primeiros estudos em vacas Nelore que avaliaram o uso de análogos de GnRH em vacas que não expressaram estro, a administração de 10µg de busserelina não aumentou a taxa de prenhez (Controle - 37,8% e GnRH - 44,7%, SÁ FILHO et al., 2011). No entanto, em outro estudo, a administração de 8,4µg de busserelina no momento da IA em vacas *Bos indicus* que não manifestaram estro aumentou a taxa de prenhez (Controle - 38,1% GnRH - 52,7%). No entanto, nas vacas que expressaram estro, a administração de busserelina não interferiu na taxa de prenhez (Controle - 62,4 e GnRH - 62,5%; ALVES et al., 2021). Em outro estudo, a administração de 8,4µg de busserelina no momento da IA em vacas *Bos indicus* que não manifestaram estro, aumentou a taxa de prenhez (Controle - 44,6% e GnRH - 55,6%). Entretanto, a administração de busserelina em protocolos de IATF de sete dias, não demonstrou incremento na taxa de prenhez (Controle - 48,8% e GnRH - 52,7%; PRATA et al., 2020). Os resultados contraditórios relacionados à administração de GnRH na melhoria dos índices reprodutivos em vacas de corte que não manifestaram estro, destacam a necessidade de desenvolver novas estratégias para aumentar as taxas de ovulação e prenhez.

Devido à elevada similaridade na atividade biológica entre a hCG e o LH (DE MEDEIROS; NORMAN, 2009), a hCG pode ser uma potencial alternativa para indução da ovulação em vacas *Bos indicus* que não apresentaram sinais de estro. A maioria dos estudos concentrou-se no uso de hCG em induzir a formação de um CL acessório após ovulação prévia. Nesse contexto, alguns autores demonstraram que a administração de hCG em vacas Holandesas e Nelore entre os dias 5 e 9 do ciclo estral foi eficaz na indução da ovulação de um FD, resultando em aumento no número total de CL formados, na concentração circulante de P4 e nas taxas de prenhez (ROSSETTI et al., 2011). Além disso, a administração de 3000 UI de hCG 10 dias após o estro, resultou em altas taxas de ovulação (88%) em vacas leiteiras (LIU et al., 2019). Essas informações permitem concluir que a hCG tem potencial de induzir ovulação em vacas que não expressam estro durante o protocolo de IATF.

REFERÊNCIAS

- ALVES, R. L. O. R. et al. Hormonal combinations aiming to improve reproductive outcomes of *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed AI protocols. **Theriogenology**, v. 169, p. 89–99, 15 jul. 2021a.
- ALVES, R. L. O. R. et al. Hormonal combinations aiming to improve reproductive outcomes of *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed AI protocols. **Theriogenology**, v. 169, p. 89–99, 15 jul. 2021b.
- AYRES, H. et al. Effect of timing of estradiol benzoate administration upon synchronization of ovulation in suckling Nelore cows (*Bos indicus*) treated with a progesterone-releasing intravaginal device. **Animal reproduction science**, v. 109, n. 1–4, p. 77–87, dez. 2008.
- 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.
- BARREIROS, T. R. R. et al. Dynamics of follicular growth and progesterone concentrations in cyclic and anestrus suckling Nelore cows (*Bos indicus*) treated with progesterone, equine chorionic gonadotropin, or temporary calf removal. **Theriogenology**, v. 81, n. 5, p. 651–656, 15 mar. 2014.
- 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. 2004a.
- 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. 2004b.
- 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.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. DE S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 205–211, 2007.
- BÓ, G. A. et al. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 53–72, 1 jan. 2002.
- 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. 2003a.

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. 2003b.

BÓ, G. A.; MAPLETOFT, R. J. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 38–48, 1 jan. 2014.

BOTTINO, M. P. et al. Effects of eCG and FSH in timed artificial insemination treatment regimens on estrous expression and pregnancy rates in primiparous and multiparous *Bos indicus* cows. **Animal reproduction science**, v. 228, 1 maio 2021a.

BOTTINO, M. P. et al. Effects of eCG and FSH in timed artificial insemination treatment regimens on estrous expression and pregnancy rates in primiparous and multiparous *Bos indicus* cows. **Animal reproduction science**, v. 228, 1 maio 2021b.

BRACKETT, B. G. et al. Fertilization and early development of cow ova. **Biology of Reproduction**, v. 23, n. 1, p. 189–205, 1980.

BURKE, C. R. et al. Use of a small dose of estradiol benzoate during diestrus to synchronize development of the ovulatory follicle in cattle. **Journal of animal science**, v. 78, n. 1, p. 145–151, 2000.

C. THIBAUT. Sperm transport and storage in vertebrates. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 18, p. 39–53, 1973.

CAMPOS, J. T. et al. Resynchronization of estrous cycle with eCG and temporary calf removal in lactating *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 80, n. 6, p. 619–623, 1 out. 2013.

CARROLL, D. J.; GRUMMER, R. R.; MAO, F. C. Progesterone production by cultured luteal cells in the presence of bovine low- and high-density lipoproteins purified by heparin affinity chromatography. **Journal of animal science**, v. 70, n. 8, p. 2516–2526, 1992.

CHIAN, R. C. et al. Fertilization and early cleavage in vitro of ageing bovine oocytes after maturation in culture. **Theriogenology**, v. 37, n. 3, p. 665–672, 1992.

CREPALDI, G. A. et al. Effect of induction of ovulation with estradiol benzoate at P4 device removal on ovulation rate and fertility in *Bos indicus* cows submitted to a TAI protocol. **Animal reproduction science**, v. 209, 1 out. 2019a.

CREPALDI, G. A. et al. Effect of induction of ovulation with estradiol benzoate at P4 device removal on ovulation rate and fertility in *Bos indicus* cows submitted to a TAI protocol. **Animal reproduction science**, v. 209, 1 out. 2019b.

CREPALDI, G. A.; BARUSELLI, P. S. **Eficácia de diferentes protocolos de indução da**

- ovulação e de intervalos de inseminação em vacas de corte submetidas à IATF**, 2009. Disponível em: <<https://repositorio.usp.br/item/001834115>>. Acesso em: 10 dez. 2024
- CROWE, M. A. et al. Resumption of follicular waves in beef cows is not associated with periparturient changes in follicle-stimulating hormone heterogeneity despite major changes in steroid and luteinizing hormone concentrations. **Biology of reproduction**, v. 58, n. 6, p. 1445–1450, jun. 1998.
- 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.
- CROWE, M. A.; DISKIN, M. G.; WILLIAMS, E. J. Parturition to resumption of ovarian cyclicity: comparative aspects of beef and dairy cows. **Animal**, v. 8, n. SUPPL. 1, p. 40–53, 1 jan. 2014.
- CUNHA, T. O. et al. Effects of GnRH and hCG administration during early luteal phase on estrous cycle length, expression of estrus and fertility in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 173, p. 23–31, 1 out. 2021.
- DALTON, J. C. et al. Effect of time of insemination on number of accessory sperm, fertilization rate, and embryo quality in nonlactating dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 84, n. 11, p. 2413–2418, 2001.
- DE MEDEIROS, S. F.; NORMAN, R. J. Human choriogonadotrophin protein core and sugar branches heterogeneity: basic and clinical insights. **Human reproduction update**, v. 15, n. 1, p. 69–95, 2009.
- DE RENSIS, F. et al. Inducing ovulation with hCG improves the fertility of dairy cows during the warm season. **Theriogenology**, v. 69, n. 9, p. 1077–1082, jun. 2008.
- DE RENSIS, F. et al. Clinical use of human chorionic gonadotropin in dairy cows: An update. **Theriogenology**, v. 73, n. 8, p. 1001–1008, maio 2010.
- DE SOUSA SALES, J. N. et al. Is estradiol valerate an alternative to estradiol benzoate in promoting the synchronization of ovulation and timed artificial insemination in suckled *Bos indicus* beef cows? **Theriogenology**, v. 218, p. 56–61, 1 abr. 2024a.
- DE SOUSA SALES, J. N. et al. Evolution over the last 40 years of the assisted reproduction technologies in cattle - the Brazilian perspective I - timed artificial insemination. **Animal Reproduction**, v. 21, n. 3, p. e20240034, 12 ago. 2024b.
- DEMOUSTIER, M. M. et al. Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. **Theriogenology**, v. 30, n. 2, p. 379–386, 1988.
- DRANSFIELD, M. B. G. et al. Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a

- radiotelemetric estrus detection system. **Journal of dairy science**, v. 81, n. 7, p. 1874–1882, 1998.
- EID, L. N.; LORTON, S. F.; PARRISH, J. J. Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo. **Biology of Reproduction**, v. 51, n. 6, p. 1232–1237, 1994.
- FORTUNE, J. E. Selection and maintenance of the dominant follicle: an introduction. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 3, p. 637, 2001.
- FORTUNE, J. E. et al. Differentiation of Dominant Versus Subordinate Follicles in Cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 3, p. 648–654, 1 set. 2001.
- GEARY, T. W. et al. Calf removal improves conception rates to the Ovsynch and CO-Synch protocols. **Journal of animal science**, v. 79, n. 1, p. 1–4, 2001.
- GIMENES, L. U. et al. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 852–858, 15 abr. 2008.
- GINTHER, O. J. et al. Relationships between FSH and ovarian follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle. **Reproduction**, v. 108, n. 2, p. 271–279, 1 nov. 1996.
- GINTHER, O. J. The theory of follicle selection in cattle. **Domestic animal endocrinology**, v. 57, p. 85–99, 1 out. 2016.
- GREGG, D. W. et al. Endogenous opioid modulation of luteinizing hormone and prolactin secretion in postpartum ewes and cows. **Journal of animal science**, v. 63, n. 3, p. 838–847, 1986.
- GRUMMER, R. R.; CARROLL, D. J. A review of lipoprotein cholesterol metabolism: importance to ovarian function. **Journal of animal science**, v. 66, n. 12, p. 3160–3173, 1988.
- GRUMMER, R. R.; MASHEK, D. G.; HAYIRLI, A. Dry matter intake and energy balance in the transition period. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 20, n. 3, p. 447–470, 2004.
- HALL, J. B. et al. Effects of dietary energy level on luteinizing hormone and adrenal function in the post partum beef cow. **Theriogenology**, v. 36, n. 1, p. 107–116, 1991.
- HAWK, H. W. Transport and Fate of Spermatozoa After Insemination of Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 7, p. 1487–1503, 1 jul. 1987.
- HESS, B. W. et al. Nutritional controls of beef cow reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. E90–E106, 1 jun. 2005a.
- 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. 2005b.
- KOISTINEN, H. et al. Hyperglycosylated hCG activates LH/hCG-receptor with lower activity

- than hCG. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 479, p. 103–109, 5 jan. 2019.
- LAMB, G. C.; MERCADANTE, V. R. G. Synchronization and Artificial Insemination Strategies in Beef Cattle. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 32, n. 2, p. 335–347, 1 jul. 2016.
- LICHT, P. et al. Biological and binding activities of equine pituitary gonadotrophins and pregnant mare serum gonadotrophin. **Journal of Endocrinology**, v. 83, n. 3, p. 311–322, 1979.
- LIU, T. C. et al. Human chorionic gonadotropin (hCG)-induced ovulation occurs later but with equal occurrence in lactating dairy cows: comparing hCG and gonadotropin-releasing hormone protocols. **The Journal of reproduction and development**, v. 65, n. 6, p. 507–514, 2019.
- LONG, C. R. et al. Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes matured in vitro under various conditions of fertilization. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 102, n. 2, p. 361–369, 1994.
- LUCY, M. C. et al. Follicular dynamics, plasma metabolites, hormones and insulin-like growth factor I (IGF-I) in lactating cows with positive or negative energy balance during the preovulatory period. **Reproduction, nutrition, development**, v. 32, n. 4, p. 331–341, 1992.
- MACMILLAN, K. L.; BURKE, C. R. Effects of oestrous cycle control on reproductive efficiency. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1–4, p. 307–320, 1996.
- MARTINEZ, F. et al. Effect of the interval between estrus onset and artificial insemination on sex ratio and fertility in cattle: A field study. **Theriogenology**, v. 62, n. 7, p. 1264–1270, 1 out. 2004.
- MEIKLE, A. et al. Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 127, n. 6, p. 727–737, 2004.
- MENEGHETTI, M. et al. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: basis for development of protocols. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 179–189, 15 jul. 2009.
- MOLINA, L. C. P. et al. Molecular Basis of Human Sperm Capacitation. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 6, p. 72, 2018.
- MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine Chorionic Gonadotropin. **Endocrine Reviews**, v. 12, n. 1, p. 27–44, 1 fev. 1991.
- NISWENDER, G. D. et al. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1–29, 2000.
- NOGUEIRA, E. et al. Timed artificial insemination plus heat I: Effect of estrus expression

- scores on pregnancy of cows subjected to progesterone-estradiol-based protocols. **Animal**, v. 13, n. 10, p. 2305–2312, 1 out. 2019.
- NORMAN, H. D. et al. Reproductive status of Holstein and Jersey cows in the United States. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 7, p. 3517–3528, 1 jul. 2009.
- NÚÑEZ-OLIVERA, R.; BÓ, G. A.; MENCHACA, A. Association between length of proestrus, follicular size, estrus behavior, and pregnancy rate in beef heifers subjected to fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v. 181, p. 1–7, 15 mar. 2022.
- PADULA, A. M. GnRH analogues--agonists and antagonists. **Animal reproduction science**, v. 88, n. 1–2, p. 115–126, 2005.
- PALERMO, R. Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. **Reproductive biomedicine online**, v. 15, n. 3, p. 326–337, 2007.
- PAPKOFF, H. Chemical and biological properties of the subunits of pregnant mare serum gonadotropin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 58, n. 2, p. 397–404, 20 maio 1974.
- PERRY, G. A. et al. Relationship of follicle size and concentrations of estradiol among cows exhibiting or not exhibiting estrus during a fixed-time AI protocol. **Domestic animal endocrinology**, v. 48, n. 1, p. 15–20, 2014.
- PICARD-HAGEN, N. et al. Effect of gonadorelin, lecirelin, and buserelin on LH surge, ovulation, and progesterone in cattle. **Theriogenology**, v. 84, n. 2, p. 177–183, 15 jul. 2015.
- PINHEIRO, V. G. et al. Effects of temporary calf removal and eCG on pregnancy rates to timed-insemination in progesterone-treated postpartum Nellore cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 3, p. 519–524, fev. 2009.
- PRATA, A. B. et al. Equine chorionic gonadotropin increases fertility of grazing dairy cows that receive fixed-time artificial insemination in the early but not later postpartum period. **Theriogenology**, v. 98, p. 36–40, 1 ago. 2017.
- PRATA, A. B. et al. Effect of different chorionic gonadotropins on final growth of the dominant follicle in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 111, p. 52–55, 15 abr. 2018.
- PRATA, A. B. et al. Progesterone-based timed AI protocols for *Bos indicus* cattle III: Comparison of protocol lengths. **Theriogenology**, v. 152, p. 29–35, 1 ago. 2020a.
- PRATA, A. B. et al. Progesterone-based timed AI protocols for *Bos indicus* cattle III: Comparison of protocol lengths. **Theriogenology**, v. 152, p. 29–35, 1 ago. 2020b.
- 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.

- RANDI, F. et al. Effect of equine chorionic gonadotropin treatment during a progesterone-based timed artificial insemination program on reproductive performance in seasonal-calving lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 11, p. 10526–10535, 1 nov. 2018.
- RIZKALLAH, T.; GURPIDE, E.; VANDE WIELE, R. L. Metabolism of HCG in man. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 29, n. 1, p. 92–100, 1969.
- ROELOFS, J. B. et al. Effects of insemination-ovulation interval on fertilization rates and embryo characteristics in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 66, n. 9, p. 2173–2181, dez. 2006.
- ROSSETTI, R. C. et al. Effects of flunixin meglumine, recombinant bovine somatotropin and/or human chorionic gonadotropin on pregnancy rates in Nelore cows. **Theriogenology**, v. 76, n. 4, p. 751–758, 1 set. 2011.
- SÁ FILHO, M. F. et al. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Animal reproduction science**, v. 120, n. 1–4, p. 23–30, jul. 2010a.
- SÁ FILHO, M. F. et al. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Animal reproduction science**, v. 120, n. 1–4, p. 23–30, jul. 2010b.
- 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, 2011a.
- 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. 2011b.
- 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. 2011c.
- 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, 1 ago. 2011d.
- SÁ FILHO, M. F. et al. Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for *Bos indicus* cattle. **Animal reproduction science**, v. 129, n. 3–4, p. 132–139, dez. 2011e.

- SAACKE, R. G. Insemination factors related to timed AI in cattle. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 479–484, ago. 2008.
- SALES, J. N. S. et al. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. **Animal reproduction science**, v. 124, n. 1–2, p. 12–18, mar. 2011.
- 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.
- SARTORELLI, E. S. et al. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, n. 9, p. 2382–2394, jun. 2005.
- SARTORI, R. et al. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1403–1409, 2001.
- SARTORI, R.; BARROS, C. M. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. **Animal reproduction science**, v. 124, n. 3–4, p. 244–250, abr. 2011.
- SCHAMS, D. et al. Profiles of LH, FSH and progesterone in postpartum dairy cows and their relationship to the commencement of cyclic functions. **Theriogenology**, v. 10, n. 6, p. 453–468, 1 dez. 1978.
- SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.; VAN DEN HURK, R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. **Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1193–1208, maio 2009.
- 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, 1 ago. 2018a.
- 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, 1 ago. 2018b.
- SOUZA, A. et al. A low dose of hCG (150IU) associated to inducing ovulation with estradiol

- benzoate can successfully replace eCG in timed AI protocols in Nelore cows. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 3, p. 560, 2019.
- STENMAN, U. H. et al. The classification, functions and clinical use of different isoforms of HCG. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 6, p. 769–784, nov. 2006.
- TORRES-JÚNIOR, J. R. DE S. et al. Mitos e verdades em protocolos de IATF. **Rev. bras. reprod. anim**, p. 129–141, 2016.
- TWAGIRAMUNGU, H.; GUILBAULT, L. A.; DUFOUR, J. J. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: a review. **Journal of animal science**, v. 73, n. 10, p. 3141–3151, 1995.
- VALDÉS-ARCINIEGA, T. J. et al. Effect of using 200 µg of gonadorelin at the first gonadotropin-releasing hormone of the breeding-Ovsynch on ovulatory response and pregnancies per artificial insemination in first-service lactating Holstein cows. **Journal of dairy science**, v. 106, n. 12, p. 9718–9732, 1 dez. 2023.
- 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.
- VASCONCELOS, J. L. M. et al. Relationships between growth of the preovulatory follicle and gestation success in lactating dairy cows. **Animal Reproduction (AR)**, v. 10, n. 3, p. 206–214, 26 jul. 2018.
- WHISNANT, C. S. et al. Effect of nutrition on the LH response to calf removal and GnRH. **Theriogenology**, v. 24, n. 5, p. 565–573, 1985.
- WILLIAMS, G. L. et al. Coincident secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in early postpartum beef cows: effects of suckling and low-level increases of systemic progesterone. **Biology of reproduction**, v. 29, n. 2, p. 362–373, 1983.
- WILLIAMS, G. L. et al. Mechanisms regulating suckling-mediated anovulation in the cow. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1–4, p. 289–297, 1 abr. 1996.
- WILMUT, I.; HUNTER, R. H. F. Sperm transport into the oviducts of heifers mated early in oestrus. **Reproduction Nutrition Developpement**, v. 24, n. 4, p. 461–468, 1984.
- WILSHER, S.; ALLEN, W. R. Factors influencing equine chorionic gonadotrophin production in the mare. **Equine veterinary journal**, v. 43, n. 4, p. 430–438, jul. 2011.
- 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

hCG is not an alternative to eCG in the TAI protocol in *Bos indicus* cows, but it increases the efficiency of TAI protocols in cows that do not show estrus.

1. Introduction

Most *Bos indicus* cows experience prolonged anestrus after calving due mainly to nutritional deficits (HESS et al., 2005b) and inhibition of GnRH release by the presence of the calf (WILLIAMS et al., 1983). In this condition, the cows have low LH pulsatility, which results in a lower rate of follicular growth and ovulatory failures, especially in cows with low body condition score (SIMÕES et al., 2018b) and in primiparous cows (SALES et al., 2016). Currently, there is a biotechnology (fixed-time artificial insemination - TAI) that allows for the early induction and synchronization of ovulation, around 40 days postpartum, and also enables insemination to be performed without the observation of estrus (BARUSELLI et al., 2004b).

Ovulation synchronization protocols that combine estrogen and progesterone are widely used in beef cows to promote the anticipation of the first postpartum ovulation and increase reproductive efficiency (BARUSELLI et al., 2004a; LAMB; MERCADANTE, 2016; MENEGHETTI et al., 2009). Additionally, the association of equine chorionic gonadotropin (eCG) with TAI protocols is an important strategy to increase final follicular growth rates, ovulation, and pregnancy (BOTTINO et al., 2021b; SALES et al., 2011, 2016). However, since eCG is produced by a pregnant mare, its extraction and purification methods hinder the standardized production of the commercial product (WILSHER; ALLEN, 2011) and negatively impact animal welfare. Thus, alternatives to eCG have been sought offering the same efficiency with better production and purification methods. In this context, human chorionic gonadotropin (hCG) emerges as a substitute for eCG, supporting stimuli to LH receptors for final follicular growth (KOISTINEN et al., 2019). In these protocols, a high synchronization rate is observed; above 80% (DE SOUSA SALES et al., 2024b).

Despite the high efficiency of TAI protocols, some cows do not respond adequately to the protocol and do not exhibit estrus in the pre-ovulatory period. These animals have lower pregnancy rates to TAI (SÁ FILHO et al., 2011c). In recent years, the use of GnRH analogs in cows that do not express estrus during the protocol has been widely discussed (ALVES et al., 2021b; PRATA et al., 2020b; SÁ FILHO et al., 2011d). However, the results are still inconsistent. Thus, other hormones are being sought that could improve the pregnancy rate in cows that do not respond well to the TAI protocol. A potential alternative to GnRH in cows that do not express estrus during the protocol is the use of hCG, as it has high biological similarity to LH (DE MEDEIROS; NORMAN, 2009). Previous results demonstrated the efficacy of hCG in inducing ovulations in dairy and beef cows when administered between days

5 and 10 of the estrous cycle (LIU et al., 2019; ROSSETTI et al., 2011). In this context, two experiments were conducted to evaluate the effect of hCG administration in ovulation synchronization protocols in *Bos indicus* cows. Experiment 1: the substitution of eCG at the time of removal of the intravaginal P4 device was evaluated, and Experiment 2: the administration at of hCG the time of TAI in *Bos indicus* cows that did not show estrus was evaluated. The hypothesis of the present study was that hCG would increase the final growth rate of the dominant follicle as an alternative to eCG and would enhance the fertility when administered at TAI in cows that do not express estrus during the ovulation synchronization protocols in *Bos indicus* cows.

2. Material and Methods

The hormones used in the experiments were provided by the MSD Laboratory (São Paulo, Brazil), including an intravaginal progesterone device (DP4) of 0.6 g (Fertilcare 600®), 1.2 g (Fertilcare 1200®), and 1.0 g (Crestar IVG 1g®), sodium cloprostenol (PGF, Ciosin®), estradiol benzoate (EB, Fertilcare sincronização®), estradiol cypionate (EC, Fertilcare ovulação®), equine chorionic gonadotropin (eCG, Folligon®), gonadorelin (GnRH, Fertagyl®), and human chorionic gonadotropin (hCG, Chorulon®).

2.1 Experiment 1: hCG at P4 device removal; follicular dynamics and fertility

2.1.1 Study A: hCG at P4 device removal in 8.5 days-protocols using EB for ovulation induction

2.1.1.1 Animals and study location

The study was conducted on four commercial farms located in the Midwest of Brazil. A total of 957 lactating Nelore cows (*Bos indicus*) were used (338 primiparous and 619 multiparous) with postpartum periods between 30 and 60 days and an average BCS of 2.76 ± 0.01 (scale of 1 to 5, (AYRES et al., 2009)). All the animals were kept in continuous grazing of *Brachiaria brizantha* or *Brachiaria humidicola* and had free access to water and mineral supplementation.

2.1.1.2 Experimental desing

On a random day of the estrous cycle (D0), lactating *Bos indicus* cows received an intravaginal device containing 0.6 g of P4 and 2 mg of EB. Eight and a half days later (D8.5), the intravaginal P4 device was removed, and 1mg of EB and 500 μ g of PGF were administered. At that same moment, the animals were divided into three experimental groups, with the Control group (n=320) not receiving any treatment, the eCG group (n=316) receiving 300IU of eCG, and the hCG group (n=321) receiving 150IU of hCG. Artificial insemination was performed 36 hours after the removal of the P4 device (D10; Figure 1).

2.1.2 Study B: hCG at P4 device removal in protocols (D7) using EC as the ovulation inducer

2.1.2.1 Animals and study location

The study was conducted on a commercial farm located in the Midwest of Brazil. A total of 457 lactating Nelore cows (*Bos indicus*) with postpartum periods between 30 and 60 days and an average BCS of 2.64 ± 0.01 (scale of 1 to 5, (AYRES et al., 2009)) were used. All the animals were kept on continuous grazing of *Brachiaria brizantha* and had free access to water and mineral supplementation.

2.1.2.2 Experimental design

On a random day of the estrous cycle (D0), the cows received an intravaginal device containing 0.6 g of P4 and 2 mg of EB. Seven days later (D7), the intravaginal P4 device was removed, and 1mg of EC and 500 μ g of PGF were administered. At that moment, the animals were divided into three experimental groups, with the Control group (n=146) not receiving any treatment, the eCG group (n=151) receiving 300IU of eCG, and the hCG group (n=151) receiving 150IU of hCG. Artificial insemination was performed 48 hours after the removal of the P4 device (D9; Figure 1).

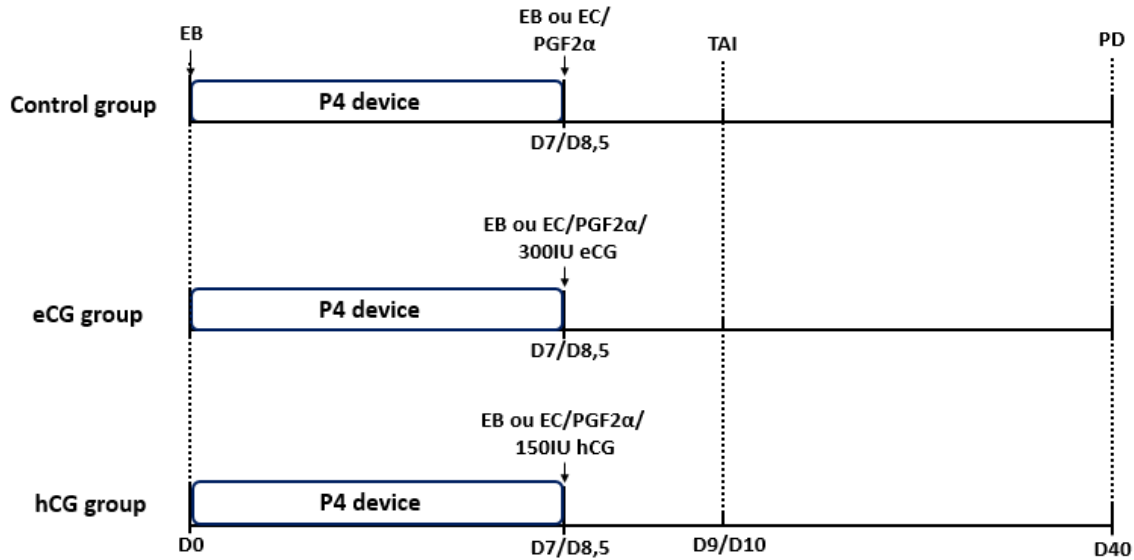


Figure 1. Experimental design. EB - 2mg or 1mg of estradiol benzoate; Intravaginal P4 device of 0.6 g; PGF2 α - 500 μ g of cloprostenol; EC - 1mg of estradiol cypionate; eCG – 300IU of equine chorionic gonadotropin; hCG – 150IU of human chorionic gonadotropin; TAI - timed artificial insemination; PD - pregnancy diagnosis.

2.2 Experiment 2: hCG at TAI

Experiment 2 was subdivided into three studies: A, B, and C. In all studies, the cows received a 1 g intravaginal device (Study A) or 1.2 g of P4 (Studies B and C) and 2 mg of EB on a random day of the estrous cycle (D0). Eight days later (D8), the intravaginal P4 device was removed, and 1 mg of EC, 500 μ g of PGF, and 300 IU of eCG were administered. In study A, the cows were allocated to experimental groups regardless of estrus expression, and in studies B and C, only cows that did not show estrus during the TAI protocol were selected.

2.2.1 Study A: hCG at TAI; follicular dynamics and corpus luteum quality

2.2.1.1 Animals and study location

The study was conducted on a commercial farm located in the southeast of Brazil. In the study, 127 lactating Nelore cows (*Bos indicus*) between 30 and 60 days postpartum and an average BCS of 2.70 ± 0.01 (scale of 1 to 5; (AYRES et al., 2009)) were used. All the animals were kept on continuous grazing of *Brachiaria brizantha* and had free access to water and mineral supplementation.

2.2.1.2 *Experimental design*

At the time of AI, the cows were randomly divided into three experimental groups, with the control group (n = 42) not receiving any additional treatment, the GnRH group (n = 44) receiving 100 µg of gonadorelin, and the hCG group (n = 41) receiving 1000 IU of hCG (Figure 2).

2.2.2 *Study B: hCG at TAI and fertility*

2.2.2.1 *Animals and study location*

The study was conducted on a commercial farm located in the southeast of Brazil. In the study, 1,950 lactating Nelore cows (*Bos indicus*) with between 30 and 60 days postpartum were used. All the animals were kept in continuous grazing of *Brachiaria brizantha* and had free access to water and mineral supplementation.

2.2.2.2 *Experimental design*

At the time of AI, the cows that did not express estrus were randomly distributed into three experimental groups, with the control group (n = 228) receiving no additional treatment, the GnRH group (n = 227) receiving 100 µg of gonadorelin, and the hCG group (n = 229) receiving 1000 IU of hCG (Figure 2).

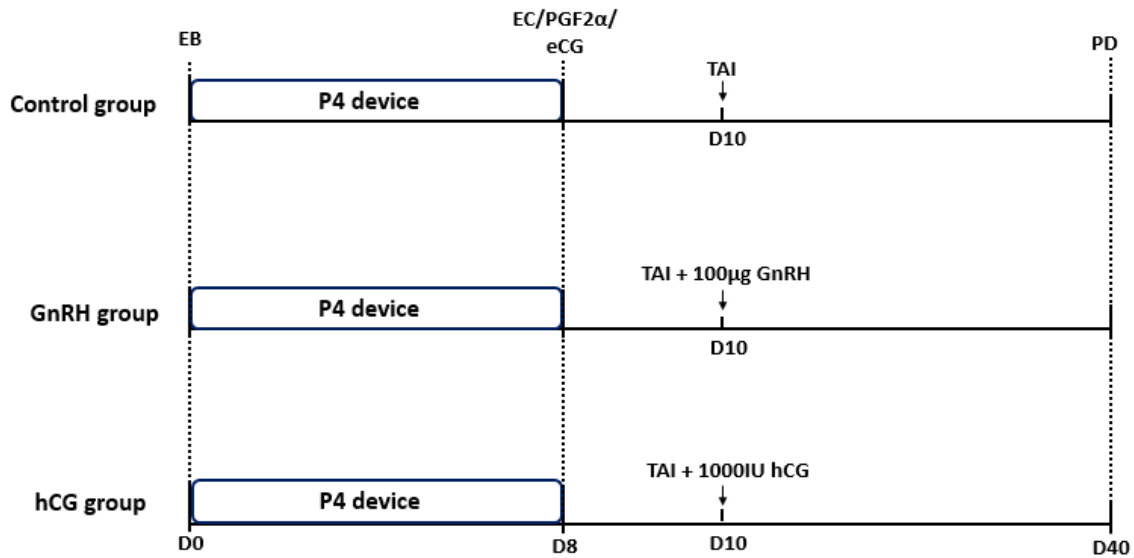


Figure 2. Experimental design. EB - 2mg of estradiol benzoate; Intravaginal P4 device of 1.2g; PGF2 α - 500 μ g of cloprostenol; EC - 1mg of estradiol cypionate; eCG – 300IU of equine chorionic gonadotropin; hCG – 1000IU of human chorionic gonadotropin; GnRH - 100 μ g of gonadorelin; TAI - timed artificial insemination; PD - pregnancy diagnosis.

2.2.3 Study C: Different hCG doses at TAI and fertility

2.2.3.1 Animals and study location

The study was conducted on a commercial farm located in the northern region of Brazil. In the study, 1,860 lactating Nelore cows (*Bos indicus*) between 30 and 60 days postpartum were used. All the animals were kept on continuous grazing of *Brachiaria brizantha* and had free access to water and mineral supplementation.

2.2.3.2 Experimental Design

At the time of AI, the cows that did not express estrus were randomly distributed into four experimental groups, with the Control group (n=158) receiving no treatment, the hCG500 group (n=162) receiving 500 IU of hCG, the hCG800 group (n=165) receiving 800 IU of hCG, and the hCG1000 group (n=168) receiving 1000 IU of hCG. Ten days after the TAI, the cows were exposed to the clean-up bulls.

2.2 Detection of estrus

In all studies, at removal of the intravaginal device, the tailhead was marked with chalk (Raidl-Maxi, RAIDEX GmbH, Dettingen/Erms, Germany). Estrus was deemed to have occurred by the total or partial (90 %) chalk paint removal at TAI.

2.4 Ultrasound exams

2.4.1 Follicular growth evaluation

In a subgroup of cows in study A (n=176) and in study B (n=213) of experiment 1, ultrasonographic examinations (Mindray DP-2200VET, 5-MHz linear transducer, China) were performed at the removal of the P4 device and at the time of TAI to evaluate the diameter of the largest follicle and the growth rate between these two moments. The daily follicular growth rate was calculated by the difference between the diameter of the largest follicle at the removal of the P4 device and at the time of TAI divided by 2. In both studies of experiment 1, anticipated (premature) ovulations were determined by the visualization of the DF at the time of the removal of the P4 device (D8.5; study A and D7; study B) and the absence of DF at the time of TAI (D10; study A and D9; study B).

In experiment 2, in the animals of study A, ultrasonographic examinations (Mindray DP-10 VETPOWER, 5-MHz linear transducer, China) were performed to evaluate the reproductive system on D0 and to assess the follicular diameter at the removal of the P4 device (D8) and at the time of TAI (D10). Starting from D10, ultrasonographic examinations were performed every 12 hours to evaluate the timing of ovulation. The moment of ovulation was defined as the interval from the disappearance of a dominant follicle in a subsequent evaluation to its visualization, minus 6 hours. Additionally, on D22, in a subgroup of cows (n = 64), an ultrasonographic examination was performed using a Color Doppler device (Mindray DP-50, 5-MHz linear transducer, China) to evaluate the vascularization score (score of 0-4; Pugliese et al., 2014) and the diameter (mm) of the corpus luteum.

2.4.2 Pregnancy diagnosis

In all experiments, the pregnancy diagnosis was performed 30 days after artificial insemination (D40) by ultrasonography (Mindray DP-2200VET, 5-MHz linear transducer, China).

2.4.3 Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using the Statistical Analysis System (SAS®) for Windows. In all studies, continuous data were tested for the normality of residuals, analyzed using the UNIVARIATE procedure (transformed when necessary), and subjected to the Bartlett test to assess the homogeneity of variances. The GLIMMIX procedure with Tukey adjustment was used to check for differences between the treatment means. The binomial data were analyzed using multivariate logistic regression with the SAS LOGISTIC procedure. The variables were removed by backward elimination based on the Wald statistical criterion when $P > 0.20$. In study A of experiment 1, the variables: diameter of the largest follicle at the time of P4 device removal (D8.5) and at the time of TAI (D10), follicular growth rate, rates of anticipated ovulation, estrus, and pregnancy were evaluated. For the analysis of the early ovulation rate and estrus rate, only the treatment variable was included in the final model. For the analysis of the pregnancy rate, the final model included the variables body condition score, animal category, bull, treatment, and interactions. In study B of experiment 1, the evaluated variables were the diameter of the largest follicle at the time of removal of the P4 device (D7) and at the time of TAI (D9), follicular growth rate, rates of early ovulation, and pregnancy. For the analysis of the early ovulation rate, only the treatment variable was included in the final model. For the analysis of the pregnancy rate, the final model included the variables body condition score, treatment, and interactions. In study B of experiment 2, for the variable pregnancy rate, the initial model included the effects of treatment (Control, GnRH, and hCG), P4 device (New, Previously Used 1X, and Previously Used 2X), bull, inseminator, and interactions. After analysis using the LOGISTIC procedure, the variables included in the final model were treatment, P4 device, bull, and interactions. In study C of experiment 2, for the variable pregnancy rate, the initial model included the effects of treatment (Control, hCG500, hCG800, and hCG1000), P4 device (New, Previously Used 1X, and Previously Used 2X), bull, inseminator, and interactions. After analysis using the LOGISTIC procedure, the variables included in the final model were treatment, P4 device, and interactions. After defining the final model, the binomial variables were analyzed using the GLIMMIX procedure in SAS. Continuous variables were presented as mean \pm standard error of the mean and binomial variables as percentages. Differences with $P < 0.05$ were considered statistically significant and P values between 0.05 and 0.1 were considered a trend.

3. Results

3.1 Experiment 1: hCG at P4 device removal; follicular dynamics and fertility

3.1.1 Study A: hCG at P4 device removal in 8.5 days-protocols using EB for ovulation induction

There was no interaction between treatment and explanatory variables on the dependent variables studied. The diameter of the dominant follicle at the removal of the progesterone device did not differ between the experimental groups ($P = 0.80$). However, the follicular growth rate ($P=0.003$) and the diameter of the dominant follicle at the time of TAI ($P=0.03$) were greater in the cows from the eCG and hCG groups (Table 1). Furthermore, the estrus expression rates were greater in the cows of the hCG group than in those of the eCG group ($P=0.006$). The rate of anticipated ovulation was greater in the hCG group than in the Control group ($P=0.001$). However, the pregnancy rate was greater in the eCG group than in the others ($P=0.01$; table 1). No effect of body score ($P=0.14$) and animal category ($P=0.45$) on the pregnancy rate was observed.

Table 1. Ovarian follicular response (mean \pm SEM) and rates of early ovulation, estrus, and conception in *Bos indicus* cows subjected to the ovulation synchronization protocol using eCG or hCG at the time of removal of the intravaginal P4 device (D8.5).

	Control	eCG	hCG	<i>P</i>
DF Diameter (mm)				
Day 8.5	12.1 \pm 0.4	12.1 \pm 0.3	11.8 \pm 0.2	0.80
Day 10	12.4 \pm 0.4 ^b	13.7 \pm 0.3 ^a	13.6 \pm 0.3 ^a	0.03
Rates				

Follicular growth (mm/day)	0.6 ± 0.1 ^b	1.2 ± 0.1 ^a	1.4 ± 0.2 ^a	0.003
Anticipated ovulation (%)	1.5 ^b (1/64)	8.3 ^b (5/60)	21.2 ^a (14/66)	0.001
Estrus expression (%)	75.6 ^{ab} (149/197)	71.8 ^b (139/194)	84.4 ^a (167/199)	0.006
Conception (%)	39.7 ^b (127/320)	51.6 ^a (163/316)	42.1 ^b (135/321)	0.01

^{a-b} Values with different superscripts differ ($P \leq 0.05$).

3.1.2 Study B: hCG at P4 device removal in seven days-protocols (D7) using EC as the ovulation inducer

There was no interaction between treatment and explanatory variables on the studied dependent variables. The diameter of the dominant follicle at the removal of the progesterone device did not differ between the experimental groups ($P=0.91$). However, the rate of follicular growth ($P=0.001$) and the diameter of the dominant follicle at the time of TAI ($P=0.05$) were greater in the cows from the eCG and hCG groups (Table 2). Moreover, the rate of early ovulation was greater in the cows of the hCG group ($P=0.001$). However, the pregnancy rate was greater in the eCG group ($P=0.04$; table 2) and in cows with a body condition score above 2.75 [$BCS < 2.75$: 27.7% (59/213) and $BCS \geq 2.75$: 44.1% (104/236); $P=0.0002$].

Table 2. Ovarian follicular response (mean ± SEM) and rates of early ovulation, estrus, and conception in *Bos indicus* cows subjected to the ovulation synchronization protocol using eCG or hCG at the time of removal of the intravaginal P4 device (D7).

	Control	eCG	hCG	<i>P</i>
DF Diameter (mm)				
Day 7	9.9 ± 0.2	9.9 ± 0.2	9.9 ± 0.2	0.91
Day 9	11.9 ± 0.3 ^b	13.2 ± 0.3 ^a	12.5 ± 0.3 ^a	0.005
Rates				
Follicular growth (mm/dia)	1.0 ± 0.1 ^b	1.5 ± 0.1 ^a	1.5 ± 0.1 ^a	0.001
Anticipated ovulation (%)	1.5 ^b (1/68)	1.4 ^b (1/74)	15.1 ^a (11/73)	0.001

Conception (%)	32.9 ^b (48/146)	43.7 ^a (66/151)	32.2 ^b (49/152)	0.04
----------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	------

^{a-b} Values with different superscripts differ ($P \leq 0.05$).

3.2 Experiment 2: hCG at TAI

3.2.1 Study A: hCG at TAI on follicular dynamics and corpus luteum quality

In terms of follicular dynamics, the diameter of the ovulatory follicle ($P=0.83$), the timing of ovulation after the removal of the P4 device ($P=0.28$), and the diameter of the CL ($P=0.14$) did not differ between the experimental groups. Furthermore, there was an interaction between the treatment and the manifestation of estrus in both the CL vascularization score ($P=0.02$) and the ovulation rate ($P=0.02$). However, among the cows that exhibited estrus, no significant differences were observed between the treatments in the average vascularization score of the CL ($P=0.33$) and the ovulation rate ($P=0.29$). However, the treatment with hCG at the time of TAI in females that did not show estrus increased the vascularization score of the CL ($P=0.05$) and the ovulation rate ($P=0.03$; Table 3). Moreover, the ovulation rate was greater [$2.5=48.6\%$ (17/35)^b, $2.75=73.5\%$ (36/49)^a, and $3.00=83.7\%$ (36/43)^a; $P=0.02$] in cows with better BCS.

Table 3. Effect of treatment with different ovulation inductors at the time of TAI on ovarian response (mean \pm SEM) in Nelore cows (*Bos indicus*) subjected to the ovulation synchronization protocol.

	Control	GnRH	hCG	<i>P</i>	
				Treat	Treat*Estrus
n	21	22	21		
Ø Ovulatory follicle (mm)	13.6 \pm 0.3	13.9 \pm 0.5	13.6 \pm 0.3	0.83	0.15
Ovulation post P4 removal (h)	66.4 \pm 1.7	68.4 \pm 1.9	71.4 \pm 1.7	0.28	0.36

CL Diameter (mm)	21.2±0.5	20.1±0,5	19.4±0.5	0.14	0.13
CL vascularization score					0.02
Estrus	1.7±0.2	2.2±0,2	2.0±0.2	0.33	
No estrus	2.1 ^{ab} ±0.2	1.6 ^b ±0.2	2.4 ^a ±0.3	0.05	
Ovulation rate (%)					0.02
Estrus	85.7 (18/21)	81.8 (18/22)	66.7 (14/21)	0.29	
No estrus	47.6 ^b (10/21)	54.5 ^b (12/22)	85.0 ^a (17/20)	0.03	

^{a-b} Values with different superscripts differ ($P \leq 0.05$).

3.2.2 Studies B and C: hCG and different hCG doses at TAI on fertility

In study B, the pregnancy rate was greater in cows that received the hCG treatment compared to the control group ($P=0.04$; Figure 3). Additionally, in study C, a trend of greater pregnancy rate was observed in cows treated with 1000 IU of hCG ($P=0.07$; Figure 3). In this study, no difference was observed between the experimental groups in the pregnancy rate after the use of the cleanup bull [Control=11.1% (12/108), hCG500=17.2% (19/111), hCG800=18.6% (21/113), and hCG1000=15.3% (15/98); $P=0.45$]. However, the pregnancy rate at the end of the breeding season was greater in cows treated with 1000 IU of hCG compared to the control group [Control=39.2% (62/158)^b, hCG500=43.2% (70/162)^{ab}, hCG800=44.2% (73/165)^{ab}, and hCG1000=50.0% (83/166)^a, $P=0.05$].

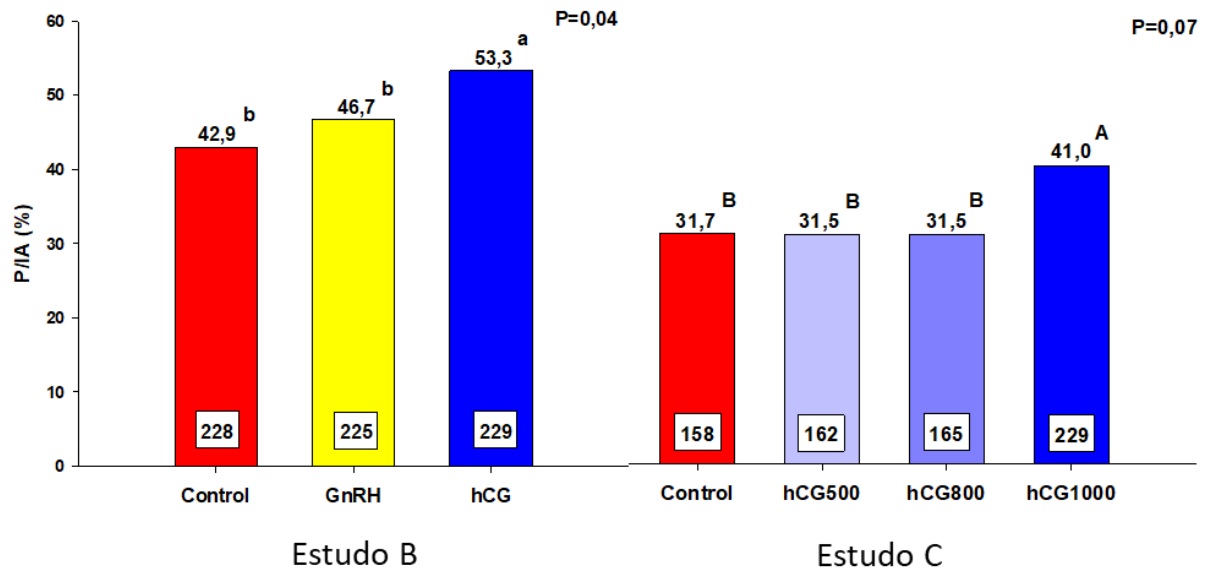


Figure 3. Effect of hCG and GnRH administration at the time of TAI on the pregnancy rate of *Bos indicus* cows that did not show estrus.

4. Discussion

To our knowledge, this is the first study that evaluated the administration of hCG at the time of removal of the intravaginal P4 device using different ovulation inducers (EB and EC) associated with different durations of the TAI protocol (D7 and D8.5). Moreover, this is the first study that evaluated the use of hCG at the time of AI in *Bos indicus* cows not exhibiting estrus during the TAI protocol.

In study A of experiment 1, EB was used as the ovulation inducer and the device was removed in the afternoon (D8.5) so that artificial insemination could be performed earlier (36 hours vs 48 hours;; (CREPALDI et al., 2019b)) and before ovulation, since a previous study demonstrated 44.4% early ovulations (before AI) in *Bos indicus* cows treated with 300UI of hCG at the time of removal of the intravaginal P4 device when CE was used as an ovulation inducer (PRATA et al., 2018). Despite these adjustments in the protocol, 21.2% of early ovulations (before AI) were still observed in this study. Based on these findings, it was proposed in study B of experiment 1 to reduce the duration of the intravaginal P4 device maintenance (7 days) with the aim of reducing the size of the dominant follicle at the time of P4 device removal

and, consequently, decreasing the rate of early ovulation in cows that received hCG, since the follicular diameter is directly related to the probability of ovulation (GIMENES et al., 2008). Despite this adjustment resulting in a smaller follicular diameter at the time of device removal, 15.1% of early ovulations were still observed in the cows that received hCG. The smaller follicular diameter observed in study B is due to a reduction of 1.5 days in the follicular growth phase, since the daily follicular growth rate in *Bos indicus* corresponds to 1.1 mm per day during the ovulation synchronization protocol (BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003b).

In addition to these findings observed in both studies (A and B), the administration of hCG or eCG increased the rate of follicular growth between the removal of the intravaginal P4 device and TAI and consequently resulted in a larger DF diameter at the time of TAI. Similar results were observed in previous studies where the use of hCG or eCG promoted the final growth of the follicle (BOTTINO et al., 2021b; PRATA et al., 2018; SALES et al., 2011, 2016; SOUZA et al., 2019). The hCG is a glycoprotein and has a high similarity (80%) with the β -subunit of LH and therefore has a high affinity for LH receptors in follicular cells (DE RENSIS et al., 2008; KOISTINEN et al., 2019). Similarly, eCG has affinity for FSH and LH receptors in follicular cells (LICHT et al., 1979; MURPHY; MARTINUK, 1991). Thus, by binding to the receptors in the ovarian cells, eCG and hCG perform the same function as LH in promoting the final growth of the dominant follicle. Studies have shown that LH, when binding to its receptors, triggers a cascade of molecular reactions induced by enzymes responsible for the production of estradiol, the final development of the follicle, and ovulation (CARROLL; GRUMMER; MAO, 1992; GRUMMER; CARROLL, 1988). However, the type and timing of stimulation by eCG and hCG are different. The half-life of hCG after treatment (24 to 33 hours; (RIZKALLAH; GURPIDE; VANDE WIELE, 1969; STENMAN et al., 2006)) is shorter than the half-life of eCG (45.6 hours; (SCHAMS et al., 1978)). This difference in persistence in the bloodstream is due to the extensive glycosylation of the eCG molecule, which represents 45% of its molecular weight (PAPKOFF, 1974). Moreover, hCG stimulates LH receptors in a manner similar to what occurs at the peak of ovulation induction (DE MEDEIROS; NORMAN, 2009; NORMAN et al., 2009) while eCG has a more subtle stimulation akin to the tonic release of LH. This characteristic of ovarian stimulation performed by hCG must be responsible for the greater rate of early ovulation in the cows of the hCG group, which resulted in a lower pregnancy rate, despite the greater rate of follicular growth observed in that group. Studies have shown that the conception rate of cows inseminated after ovulation is lower due to the asynchrony between the optimal timing of the oocyte and the presence of capacitated sperm (DALTON et al., 2001;

DRANSFIELD et al., 1998). Such a condition results in a decrease in the fertilization rate or impairment of early embryonic development due to the reduction in oocyte quality (MARTINEZ et al., 2004; ROELOFS et al., 2006). In mammals, spermatozoa acquire the ability to fertilize the oocyte during their transport through the female reproductive tract through a process called sperm capacitation, which can last from 6 to 10 hours (C. THIBAUT, 1973; EID; LORTON; PARRISH, 1994; HAWK, 1987; MOLINA et al., 2018; WILMUT; HUNTER, 1984). Furthermore, the viability time of the oocyte after ovulation is low, around 8 hours (BRACKETT et al., 1980) and the quality of the oocyte decreases as time increases after ovulation (SAACKE, 2008). Thus, inseminations performed close to or after ovulation result in compromised fertility due to the aging of the oocyte, which leads to failures in early embryonic development (CHIAN et al., 1992; DALTON et al., 2001; DRANSFIELD et al., 1998; LONG et al., 1994).

Regarding the use of hCG at the time of AI, it was observed that the administration of 1000 IU of hCG in cows that did not express estrus increased the ovulation rate, the vascularization score of the corpus luteum, and the pregnancy rate without interfering with the diameter of the ovulatory follicle and the timing of ovulation. However, reducing the dose to 500 or 800 IU of hCG did not increase fertility, demonstrating that 1000 IU of hCG is the recommended dose for cows that do not express estrus during the TAI protocol. Also, no increase in fertility was observed in cows that received GnRH. Similar results were observed in previous studies where the administration of GnRH did not increase the fertility of beef cows that did not show estrus at the end of the TAI protocol (PRATA et al., 2020b; SÁ FILHO et al., 2011c). These results can be explained by the high similarity between the molecular structures of hCG and LH, as both are glycoproteins formed by two subunits (alpha and beta) that bind to the same receptor in follicular cells, acting as direct inducers of ovulation (DE RENSIS et al., 2010). GnRH, on the other hand, needs to stimulate the gonadotropic cells of the pituitary to produce LH to perform the same biological function as hCG. However, data from the literature have shown that *Bos indicus* cows in the early postpartum period have low LH reserves, which impacts the rate of follicular growth and ovulation (YAVAS; WALTON, 2000). Thus, the administration of GnRH may not have induced ovulation due to the reduced LH stock in these animals, especially in cows that did not express estrus during the protocol (SÁ FILHO et al., 2010b). Previous studies reported the efficiency of hCG in inducing ovulation in dairy and beef cows when administered between days 5 and 10 of the estrous cycle, inducing ovulation and the formation of an accessory CL (LIU et al., 2019; ROSSETTI et al., 2011). In addition to

increasing the ovulation rate, hCG may have a luteotropic effect on the corpus luteum by stimulating vascular endothelial growth factor (VEGF), which increases the proliferation of endothelial cells in the blood vessels present in the CL, improving the vascularization and nutrition of this endocrine gland (NISWENDER et al., 2000), which is not observed in cows that received GnRH administration.

In conclusion, despite promoting follicular growth between the removal of the intravaginal P4 device and the TAI, hCG does not have the same efficiency as eCG in ovulation synchronization protocols in *Bos indicus* cows, showing a greater rate of early ovulation and a lower pregnancy rate. However, the administration of 1000 IU of hCG at the time of TAI increased the rates of ovulation and pregnancy in *Bos indicus* cows that did not show estrus.

REFERÊNCIAS

- ALVES, R. L. O. R. et al. Hormonal combinations aiming to improve reproductive outcomes of *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed AI protocols. *Theriogenology*, v. 169, p. 89–99, 15 jul. 2021a.
- ALVES, R. L. O. R. et al. Hormonal combinations aiming to improve reproductive outcomes of *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed AI protocols. *Theriogenology*, v. 169, p. 89–99, 15 jul. 2021b.
- AYRES, H. et al. Effect of timing of estradiol benzoate administration upon synchronization of ovulation in suckling Nelore cows (*Bos indicus*) treated with a progesterone-releasing intravaginal device. *Animal reproduction science*, v. 109, n. 1–4, p. 77–87, dez. 2008.
- 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.
- BARREIROS, T. R. R. et al. Dynamics of follicular growth and progesterone concentrations in cyclic and anestrous suckling Nelore cows (*Bos indicus*) treated with progesterone, equine chorionic gonadotropin, or temporary calf removal. *Theriogenology*, v. 81, n. 5, p. 651–656, 15 mar. 2014.
- BARUSELLI, P. S. et al. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Animal Reproduction Science*, v. 82–83, p. 479–

486, jul. 2004a.

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. 2004b.

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.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. DE S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, n. 2, p. 205–211, 2007.

BÓ, G. A. et al. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, v. 57, n. 1, p. 53–72, 1 jan. 2002.

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. 2003a.

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. 2003b.

BÓ, G. A.; MAPLETOFT, R. J. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*, v. 81, n. 1, p. 38–48, 1 jan. 2014.

BOTTINO, M. P. et al. Effects of eCG and FSH in timed artificial insemination treatment regimens on estrous expression and pregnancy rates in primiparous and multiparous *Bos indicus* cows. *Animal reproduction science*, v. 228, 1 maio 2021a.

BOTTINO, M. P. et al. Effects of eCG and FSH in timed artificial insemination treatment regimens on estrous expression and pregnancy rates in primiparous and multiparous *Bos indicus* cows. *Animal reproduction science*, v. 228, 1 maio 2021b.

BRACKETT, B. G. et al. Fertilization and early development of cow ova. *Biology of Reproduction*, v. 23, n. 1, p. 189–205, 1980.

BURKE, C. R. et al. Use of a small dose of estradiol benzoate during diestrus to synchronize development of the ovulatory follicle in cattle. *Journal of animal science*, v. 78, n. 1, p. 145–

151, 2000.

C. THIBAUT. Sperm transport and storage in vertebrates. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 18, p. 39–53, 1973.

CAMPOS, J. T. et al. Resynchronization of estrous cycle with eCG and temporary calf removal in lactating *Bos indicus* cows. *Theriogenology*, v. 80, n. 6, p. 619–623, 1 out. 2013.

CARROLL, D. J.; GRUMMER, R. R.; MAO, F. C. Progesterone production by cultured luteal cells in the presence of bovine low- and high-density lipoproteins purified by heparin affinity chromatography. *Journal of animal science*, v. 70, n. 8, p. 2516–2526, 1992.

CHIAN, R. C. et al. Fertilization and early cleavage in vitro of ageing bovine oocytes after maturation in culture. *Theriogenology*, v. 37, n. 3, p. 665–672, 1992.

CREPALDI, G. A. et al. Effect of induction of ovulation with estradiol benzoate at P4 device removal on ovulation rate and fertility in *Bos indicus* cows submitted to a TAI protocol. *Animal reproduction science*, v. 209, 1 out. 2019a.

CREPALDI, G. A. et al. Effect of induction of ovulation with estradiol benzoate at P4 device removal on ovulation rate and fertility in *Bos indicus* cows submitted to a TAI protocol. *Animal reproduction science*, v. 209, 1 out. 2019b.

CREPALDI, G. A.; BARUSELLI, P. S. Eficácia de diferentes protocolos de indução da ovulação e de intervalos de inseminação em vacas de corte submetidas à IATF, 2009. Disponível em: <<https://repositorio.usp.br/item/001834115>>. Acesso em: 10 dez. 2024

CROWE, M. A. et al. Resumption of follicular waves in beef cows is not associated with periparturient changes in follicle-stimulating hormone heterogeneity despite major changes in steroid and luteinizing hormone concentrations. *Biology of reproduction*, v. 58, n. 6, p. 1445–1450, jun. 1998.

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.

CROWE, M. A.; DISKIN, M. G.; WILLIAMS, E. J. Parturition to resumption of ovarian cyclicity: comparative aspects of beef and dairy cows. *Animal*, v. 8, n. SUPPL. 1, p. 40–53, 1 jan. 2014.

CUNHA, T. O. et al. Effects of GnRH and hCG administration during early luteal phase on

estrous cycle length, expression of estrus and fertility in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v. 173, p. 23–31, 1 out. 2021.

DALTON, J. C. et al. Effect of time of insemination on number of accessory sperm, fertilization rate, and embryo quality in nonlactating dairy cattle. *Journal of dairy science*, v. 84, n. 11, p. 2413–2418, 2001.

DE MEDEIROS, S. F.; NORMAN, R. J. Human choriogonadotrophin protein core and sugar branches heterogeneity: basic and clinical insights. *Human reproduction update*, v. 15, n. 1, p. 69–95, 2009.

DE RENSIS, F. et al. Inducing ovulation with hCG improves the fertility of dairy cows during the warm season. *Theriogenology*, v. 69, n. 9, p. 1077–1082, jun. 2008.

DE RENSIS, F. et al. Clinical use of human chorionic gonadotropin in dairy cows: An update. *Theriogenology*, v. 73, n. 8, p. 1001–1008, maio 2010.

DE SOUSA SALES, J. N. et al. Is estradiol valerate an alternative to estradiol benzoate in promoting the synchronization of ovulation and timed artificial insemination in suckled *Bos indicus* beef cows? *Theriogenology*, v. 218, p. 56–61, 1 abr. 2024a.

DE SOUSA SALES, J. N. et al. Evolution over the last 40 years of the assisted reproduction technologies in cattle - the Brazilian perspective I - timed artificial insemination. *Animal Reproduction*, v. 21, n. 3, p. e20240034, 12 ago. 2024b.

DEMOUSTIER, M. M. et al. Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology*, v. 30, n. 2, p. 379–386, 1988.

DRANSFIELD, M. B. G. et al. Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. *Journal of dairy science*, v. 81, n. 7, p. 1874–1882, 1998.

EID, L. N.; LORTON, S. F.; PARRISH, J. J. Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo. *Biology of Reproduction*, v. 51, n. 6, p. 1232–1237, 1994.

FORTUNE, J. E. Selection and maintenance of the dominant follicle: an introduction. *Biology of reproduction*, v. 65, n. 3, p. 637, 2001.

FORTUNE, J. E. et al. Differentiation of Dominant Versus Subordinate Follicles in Cattle. *Biology of Reproduction*, v. 65, n. 3, p. 648–654, 1 set. 2001.

- GEARY, T. W. et al. Calf removal improves conception rates to the Ovsynch and CO-Synch protocols. *Journal of animal science*, v. 79, n. 1, p. 1–4, 2001.
- GIMENES, L. U. et al. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, v. 69, n. 7, p. 852–858, 15 abr. 2008.
- GINTHER, O. J. et al. Relationships between FSH and ovarian follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle. *Reproduction*, v. 108, n. 2, p. 271–279, 1 nov. 1996.
- GINTHER, O. J. The theory of follicle selection in cattle. *Domestic animal endocrinology*, v. 57, p. 85–99, 1 out. 2016.
- GREGG, D. W. et al. Endogenous opioid modulation of luteinizing hormone and prolactin secretion in postpartum ewes and cows. *Journal of animal science*, v. 63, n. 3, p. 838–847, 1986.
- GRUMMER, R. R.; CARROLL, D. J. A review of lipoprotein cholesterol metabolism: importance to ovarian function. *Journal of animal science*, v. 66, n. 12, p. 3160–3173, 1988.
- GRUMMER, R. R.; MASHEK, D. G.; HAYIRLI, A. Dry matter intake and energy balance in the transition period. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, v. 20, n. 3, p. 447–470, 2004.
- HALL, J. B. et al. Effects of dietary energy level on luteinizing hormone and adrenal function in the post partum beef cow. *Theriogenology*, v. 36, n. 1, p. 107–116, 1991.
- HAWK, H. W. Transport and Fate of Spermatozoa After Insemination of Cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 70, n. 7, p. 1487–1503, 1 jul. 1987.
- HESS, B. W. et al. Nutritional controls of beef cow reproduction. *Journal of Animal Science*, v. 83, p. E90–E106, 1 jun. 2005a.
- 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. 2005b.
- KOISTINEN, H. et al. Hyperglycosylated hCG activates LH/hCG-receptor with lower activity than hCG. *Molecular and cellular endocrinology*, v. 479, p. 103–109, 5 jan. 2019.
- LAMB, G. C.; MERCADANTE, V. R. G. Synchronization and Artificial Insemination Strategies in Beef Cattle. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, v. 32, n. 2, p. 335–347, 1 jul. 2016.

- LICHT, P. et al. Biological and binding activities of equine pituitary gonadotrophins and pregnant mare serum gonadotrophin. *Journal of Endocrinology*, v. 83, n. 3, p. 311–322, 1979.
- LIU, T. C. et al. Human chorionic gonadotropin (hCG)-induced ovulation occurs later but with equal occurrence in lactating dairy cows: comparing hCG and gonadotropin-releasing hormone protocols. *The Journal of reproduction and development*, v. 65, n. 6, p. 507–514, 2019.
- LONG, C. R. et al. Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes matured in vitro under various conditions of fertilization. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 102, n. 2, p. 361–369, 1994.
- LUCY, M. C. et al. Follicular dynamics, plasma metabolites, hormones and insulin-like growth factor I (IGF-I) in lactating cows with positive or negative energy balance during the preovulatory period. *Reproduction, nutrition, development*, v. 32, n. 4, p. 331–341, 1992.
- MACMILLAN, K. L.; BURKE, C. R. Effects of oestrous cycle control on reproductive efficiency. *Animal Reproduction Science*, v. 42, n. 1–4, p. 307–320, 1996.
- MARTINEZ, F. et al. Effect of the interval between estrus onset and artificial insemination on sex ratio and fertility in cattle: A field study. *Theriogenology*, v. 62, n. 7, p. 1264–1270, 1 out. 2004.
- MEIKLE, A. et al. Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction (Cambridge, England)*, v. 127, n. 6, p. 727–737, 2004.
- MENEGHETTI, M. et al. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: basis for development of protocols. *Theriogenology*, v. 72, n. 2, p. 179–189, 15 jul. 2009.
- MOLINA, L. C. P. et al. Molecular Basis of Human Sperm Capacitation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 6, p. 72, 2018.
- MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine Chorionic Gonadotropin. *Endocrine Reviews*, v. 12, n. 1, p. 27–44, 1 fev. 1991.
- NISWENDER, G. D. et al. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews*, v. 80, n. 1, p. 1–29, 2000.
- NOGUEIRA, E. et al. Timed artificial insemination plus heat I: Effect of estrus expression

scores on pregnancy of cows subjected to progesterone-estradiol-based protocols. *Animal*, v. 13, n. 10, p. 2305–2312, 1 out. 2019.

NORMAN, H. D. et al. Reproductive status of Holstein and Jersey cows in the United States. *Journal of Dairy Science*, v. 92, n. 7, p. 3517–3528, 1 jul. 2009.

NÚÑEZ-OLIVERA, R.; BÓ, G. A.; MENCHACA, A. Association between length of proestrus, follicular size, estrus behavior, and pregnancy rate in beef heifers subjected to fixed-time artificial insemination. *Theriogenology*, v. 181, p. 1–7, 15 mar. 2022.

PADULA, A. M. GnRH analogues--agonists and antagonists. *Animal reproduction science*, v. 88, n. 1–2, p. 115–126, 2005.

PALERMO, R. Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. *Reproductive biomedicine online*, v. 15, n. 3, p. 326–337, 2007.

PAPKOFF, H. Chemical and biological properties of the subunits of pregnant mare serum gonadotropin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 58, n. 2, p. 397–404, 20 maio 1974.

PERRY, G. A. et al. Relationship of follicle size and concentrations of estradiol among cows exhibiting or not exhibiting estrus during a fixed-time AI protocol. *Domestic animal endocrinology*, v. 48, n. 1, p. 15–20, 2014.

PICARD-HAGEN, N. et al. Effect of gonadorelin, lecorelin, and buserelin on LH surge, ovulation, and progesterone in cattle. *Theriogenology*, v. 84, n. 2, p. 177–183, 15 jul. 2015.

PINHEIRO, V. G. et al. Effects of temporary calf removal and eCG on pregnancy rates to timed-insemination in progesterone-treated postpartum Nellore cows. *Theriogenology*, v. 71, n. 3, p. 519–524, fev. 2009.

PRATA, A. B. et al. Equine chorionic gonadotropin increases fertility of grazing dairy cows that receive fixed-time artificial insemination in the early but not later postpartum period. *Theriogenology*, v. 98, p. 36–40, 1 ago. 2017.

PRATA, A. B. et al. Effect of different chorionic gonadotropins on final growth of the dominant follicle in *Bos indicus* cows. *Theriogenology*, v. 111, p. 52–55, 15 abr. 2018.

PRATA, A. B. et al. Progesterone-based timed AI protocols for *Bos indicus* cattle III: Comparison of protocol lengths. *Theriogenology*, v. 152, p. 29–35, 1 ago. 2020a.

- PRATA, A. B. et al. Progesterone-based timed AI protocols for *Bos indicus* cattle III: Comparison of protocol lengths. *Theriogenology*, v. 152, p. 29–35, 1 ago. 2020b.
- 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.
- RANDI, F. et al. Effect of equine chorionic gonadotropin treatment during a progesterone-based timed artificial insemination program on reproductive performance in seasonal-calving lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 101, n. 11, p. 10526–10535, 1 nov. 2018.
- RIZKALLAH, T.; GURPIDE, E.; VANDE WIELE, R. L. Metabolism of HCG in man. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, v. 29, n. 1, p. 92–100, 1969.
- ROELOFS, J. B. et al. Effects of insemination-ovulation interval on fertilization rates and embryo characteristics in dairy cattle. *Theriogenology*, v. 66, n. 9, p. 2173–2181, dez. 2006.
- ROSSETTI, R. C. et al. Effects of flunixin meglumine, recombinant bovine somatotropin and/or human chorionic gonadotropin on pregnancy rates in Nelore cows. *Theriogenology*, v. 76, n. 4, p. 751–758, 1 set. 2011.
- SÁ FILHO, M. F. et al. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Animal reproduction science*, v. 120, n. 1–4, p. 23–30, jul. 2010a.
- SÁ FILHO, M. F. et al. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Animal reproduction science*, v. 120, n. 1–4, p. 23–30, jul. 2010b.
- 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, 2011a.
- 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. 2011b.
- 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. 2011c.

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, 1 ago. 2011d.

SÁ FILHO, M. F. et al. Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for *Bos indicus* cattle. *Animal reproduction science*, v. 129, n. 3–4, p. 132–139, dez. 2011e.

SAACKE, R. G. Insemination factors related to timed AI in cattle. *Theriogenology*, v. 70, n. 3, p. 479–484, ago. 2008.

SALES, J. N. S. et al. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. *Animal reproduction science*, v. 124, n. 1–2, p. 12–18, mar. 2011.

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.

SARTORELLI, E. S. et al. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology*, v. 63, n. 9, p. 2382–2394, jun. 2005.

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

SARTORI, R.; BARROS, C. M. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Animal reproduction science*, v. 124, n. 3–4, p. 244–250, abr. 2011.

SCHAMS, D. et al. Profiles of LH, FSH and progesterone in postpartum dairy cows and their relationship to the commencement of cyclic functions. *Theriogenology*, v. 10, n. 6, p. 453–468,

1 dez. 1978.

SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.; VAN DEN HURK, R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology*, v. 71, n. 8, p. 1193–1208, maio 2009.

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, 1 ago. 2018a.

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, 1 ago. 2018b.

SOUZA, A. et al. A low dose of hCG (150IU) associated to inducing ovulation with estradiol benzoate can successfully replace eCG in timed AI protocols in Nelore cows. *Animal Reproduction*, v. 16, n. 3, p. 560, 2019.

STENMAN, U. H. et al. The classification, functions and clinical use of different isoforms of HCG. *Human Reproduction Update*, v. 12, n. 6, p. 769–784, nov. 2006.

TORRES-JÚNIOR, J. R. DE S. et al. Mitos e verdades em protocolos de IATF. *Rev. bras. reprod. anim*, p. 129–141, 2016.

TWAGIRAMUNGU, H.; GUILBAULT, L. A.; DUFOUR, J. J. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: a review. *Journal of animal science*, v. 73, n. 10, p. 3141–3151, 1995.

VALDÉS-ARCINIEGA, T. J. et al. Effect of using 200 µg of gonadorelin at the first gonadotropin-releasing hormone of the breeding-Ovsynch on ovulatory response and pregnancies per artificial insemination in first-service lactating Holstein cows. *Journal of dairy science*, v. 106, n. 12, p. 9718–9732, 1 dez. 2023.

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.

VASCONCELOS, J. L. M. et al. Relationships between growth of the preovulatory follicle and gestation success in lactating dairy cows. *Animal Reproduction (AR)*, v. 10, n. 3, p. 206–214, 26 jul. 2018.

WHISNANT, C. S. et al. Effect of nutrition on the LH response to calf removal and GnRH. *Theriogenology*, v. 24, n. 5, p. 565–573, 1985.

WILLIAMS, G. L. et al. Coincident secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in early postpartum beef cows: effects of suckling and low-level increases of systemic progesterone. *Biology of reproduction*, v. 29, n. 2, p. 362–373, 1983.

WILLIAMS, G. L. et al. Mechanisms regulating suckling-mediated anovulation in the cow. *Animal Reproduction Science*, v. 42, n. 1–4, p. 289–297, 1 abr. 1996.

WILMUT, I.; HUNTER, R. H. F. Sperm transport into the oviducts of heifers mated early in oestrus. *Reproduction Nutrition Developpement*, v. 24, n. 4, p. 461–468, 1984.

WILSHER, S.; ALLEN, W. R. Factors influencing equine chorionic gonadotrophin production in the mare. *Equine veterinary journal*, v. 43, n. 4, p. 430–438, jul. 2011.

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