

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PAULA PEREIRA DA MATTA

**Associação de diferentes hormônios esteroides e gonadotrofinas em
protocolos de sincronização do estro e indução da ovulação para IATF em
fêmeas bovinas da raça Nelore**

Pirassununga

2022

PAULA PEREIRA DA MATTA

**Associação de diferentes hormônios esteroides e gonadotrofinas em
protocolos de sincronização do estro e indução da ovulação para IATF em
fêmeas bovinas da raça Nelore**

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Ciências do programa de
Mestrado em Biociência Animal

Área de Concentração: Teriogenologia.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Andrade Silva

Pirassununga

2022

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D111a Da Matta, Paula Pereira
Associação de diferentes hormônios esteroides e gonadotrofinas em protocolos de sincronização do estro e indução da ovulação para IATF em fêmeas bovin / Paula Pereira Da Matta ; orientador Luciano Andrade Silva ; coorientador Ed Hoffmann Madureira. -- Pirassununga, 2022.
52 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. IATF. 2. Gonadotrofinas. 3. Estrogênios. 4. Reprodução animal. 5. Prenhez. I. Silva, Luciano Andrade, orient. II. Madureira, Ed Hoffmann, coorient. III. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: Da Matta, Paula Pereira

Título: Associação de diferentes hormônios esteroides e gonadotrofinas em protocolos de sincronização do estro e indução da ovulação para IATF em fêmeas bovinas da raça Nelore

Dissertação apresentada a Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biociência Animal.

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof.

Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.

Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.

Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Comparação da eficiência de diferentes gonadotrofinas em protocolos de sincronização do estro e indução da ovulação para IATF em fêmeas bovinas da raça Nelore", protocolada sob o CEUA nº 2582131119 (ID 001372), sob a responsabilidade de **Luciano Andrade Silva e equipe; Paula Pereira da Matta; Ed Hoffmann Madureira; Carlos Alberto Souto Godoi Filho; Catia Aparecida Ferreira Gallimberti** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) na reunião de 18/12/2019.

We certify that the proposal "Comparison of the efficiency of different gonadotropins in protocols of estrus synchronization and ovulation induction for TAI in Nelore cattle", utilizing 560 Bovines (560 females), protocol number CEUA 2582131119 (ID 001372), under the responsibility of **Luciano Andrade Silva and team; Paula Pereira da Matta; Ed Hoffmann Madureira; Carlos Alberto Souto Godoi Filho; Catia Aparecida Ferreira Gallimberti** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering - (São Paulo University) (CEUA/FZEA) in the meeting of 12/18/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **12/2019** a **03/2020**

Área: **Medicina Veterinária**

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **2 a 5 anos**

N: **560**

Linhagem: **Nelore**

Peso: **250 a 500 kg**

Local do experimento: Fazenda da Matta, localizada na Estrada Rural S/N, rod. MT 140, km 170. Município de Santa Rita do Trivelato - MT.

Pirassununga, 03 de janeiro de 2020

Prof. Dra. Daniele dos Santos Martins
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Prof. Dra. Cristiane Gonçalves Titto
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

DEDICATÓRIA

À Deus, pai misericordioso.

Ao meu noivo Heitor, o grande amor da minha vida.

Ao meu pai Luiz Alfredo, fonte de inspiração para todos os meus sonhos.

Dedico...

AGRADECIMENTOS

*Gostaria de agradecer primeiramente a **Deus**, pelo dom da vida e por me dar saúde e fé para buscar todos os dias a realização dos meus sonhos...*

Ao meu pai, pelos ensinamentos de vida, apoio incondicional, por acreditar sempre que sou capaz e apostar todas as suas fichas no meu futuro, eu dedico esta conquista a você...

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, que tem sido minha segunda casa desde o início da graduação, em 2013...

Ao meu orientador Prof. Dr. Luciano Andrade Silva, pelos ensinamentos, conselhos, paciência com os meus desesperos e por sempre estar à disposição para me auxiliar...

Ao meu coorientador Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira, a quem devo imensa gratidão por sempre me amparar, encaminhar, ensinar e acreditar, muito obrigada...

Ao meu colega Rudson (in memoria) e toda a equipe da Ceva Saúde Animal, por acreditarem no potencial deste trabalho e fornecerem os produtos necessários para o seu desenvolvimento...

À minha parceira de mestrado Catia Aparecida Ferreira, por encarar o mundão comigo para desenvolvimento do projeto e por toda a nossa troca boa de conhecimento...

À toda a minha equipe da Fazenda da Matta, por toda a colaboração, compreensão, competência, trabalho em equipe e amor pela profissão...

Aos membros da banca, por aceitarem o convite para compor a banca de defesa e contribuir com esse momento tão importante...

Ao meu noivo, Heitor Baldim Chaim, por estar ao meu lado em quaisquer circunstâncias, aguentar minhas oscilações de humor e cruzar o país para encarar os dias de sol no curral ao meu lado, eu te amo...

Ao meu orientador de coração de uma nova fase que se inicia, Prof. Dr. Francisco José Rocha de Sousa, por ser inspiração de excelência desde o primeiro instante e se tornar ponto de apoio nessa etapa final...

E às minhas molequinhas, Andressa Alves Soares, Fernanda Estefani Barros de Freitas Suhett e Paula Francis Pampillon, que seguraram a barra comigo em todos os aspectos possíveis, vocês fazem parte dessa conquista e eu não tenho nem palavras para agradecer...

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo, fará coisas admiráveis...”

José de Alencar

RESUMO

DA MATTA, P.P **Associação de diferentes hormônios esteroides e gonadotrofinas em protocolos de sincronização do estro e indução da ovulação para IATF em fêmeas bovinas da raça Nelore.** 2022. 52f. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

Ésteres de estradiol têm sido utilizados combinados com P4 no início de protocolos de sincronização do estro em vacas. Seu efeito primário é promover a atresia folicular colaborando para a emergência sincrônica da onda folicular entre os animais. O $17\beta E_2$ pode ser uma alternativa para este fim. Ademais, sabe-se que o diâmetro folicular está diretamente relacionado à capacidade ovulatória, tornando o tratamento com gonadotrofinas em protocolos de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) uma alternativa viável para estimular o desenvolvimento folicular, e consequentemente a eficiência de ovulação e concepção, otimizando resultados. Com base no exposto, o **capítulo 1** deste trabalho revisa aspectos acerca da importância das biotecnologias reprodutivas dentro da pecuária de corte, dentre elas, com destaque para a IATF. Neste contexto, são revisados também os aspectos sobre a importância dos estrogênios e gonadotrofinas que compõe estes protocolos, bem como sua composição bioquímica e mecanismo de ação. O **capítulo 2** apresenta um artigo científico cuja hipótese central é de que diferentes estrogênios e gonadotrofinas atuem de forma similar quando utilizados na sincronização da ovulação em protocolos de IATF de fêmeas bovinas da raça Nelore, resultando em uma boa eficiência reprodutiva. Um total de 587 fêmeas em atividade reprodutiva foram submetidas à IATF através de um protocolo de tratamento hormonal de 8,5 dias à base de P4 e Cloprostenol sódico, sendo administrados diferentes estrogênios no dia zero (D0), diferentes gonadotrofinas no dia 8,5 (D8,5) e inseminação artificial (IA) no dia 10 (D10). Os tratamentos foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com arranjo fatorial 2 x 2, sendo: Grupo BEE (BE + eCG), grupo BEH (BE + hCG), grupo 17EE ($17\beta E_2$ + eCG) e grupo 17EH ($17\beta E_2$ + hCG). O diâmetro folicular do folículo dominante (DFD) foi mensurado por ultrassonografia transretal modo-B em D8.5 e em D10. O diagnóstico de

gestação foi realizado 30 dias após a IA. A prenhez por inseminação artificial (P/IA), DFD em D8,5 e D10 e taxa de crescimento folicular entre D8,5 e D10 não diferiram quando comparados entre os tratamentos ($P>0,05$). Portanto, foi possível concluir que as diferentes gonadotrofinas e estrogênios utilizados neste estudo podem ser combinados e atuar de forma semelhante em protocolos de sincronização da ovulação de fêmeas bovinas da raça Nelore submetidas à IATF.

Palavras-chave: IATF, gonadotrofinas, estrógenos, vacas Nelore, sincronização do estro, protocolos, hormônios, indução da ovulação.

ABSTRACT

DA MATTA, P.P. **Association of different steroid hormones and gonadotropins in protocols of estrus synchronization and ovulation induction for FTAI in nelore bovine females.** 2022. 52f. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

Estradiol esters have been used in combination with P4 at the beginning of estrus synchronization protocols in cows. Its primary effect is to promote follicular atresia, contributing to the synchronous emergence of the follicular wave between animals. $17\beta E_2$ can be an alternative for this purpose. Furthermore, it is known that follicular diameter is directly related to ovulatory capacity, making treatment with gonadotropins in Fixed-Time Artificial Insemination (FTAI) protocols a viable alternative to stimulate follicular development, and consequently the efficiency of ovulation and conception, optimizing results. Based on the above, chapter 1 of this work reviews aspects about the importance of reproductive biotechnologies within beef cattle, among them, with emphasis on TAI. In this context, aspects about the importance of estrogens and gonadotropins that make up these protocols are also reviewed, as well as their biochemical composition and mechanism of action. Chapter 2 presents a scientific article whose central hypothesis is that different estrogens and gonadotropins act in a similar way when used in ovulation synchronization in FTAI protocols of Nelore bovine females, resulting in a good reproductive efficiency. A total of 587 females in reproductive activity were submitted to TAI through an 8.5-day hormone treatment protocol based on P4 and Cloprostenol sodium, with different estrogens being administered on day zero (D0), different gonadotropins on day 8.5 (D8.5) and artificial insemination (AI) on day 10 (D10). The treatments were distributed in a completely randomized design with a 2 x 2 factorial arrangement, as follows: EBE group (EB + eCG), EBH group (EB + hCG), 17EE group ($17\beta E_2$ + eCG) and 17EH group ($17\beta E_2$ + hCG). The follicular diameter of the dominant follicle (DFD) was measured by B-mode transrectal ultrasonography on D8.5 and on D10. Pregnancy diagnosis was performed 30 days after AI. Pregnancy by artificial insemination (P/AI), DFD on D8.5 and D10

and follicular growth rate between D8.5 and D10 did not differ when compared between treatments ($P>0.05$). Therefore, it was possible to conclude that the different gonadotropins and estrogens used in this study can be combined and act similarly in ovulation synchronization protocols of Nellore bovine females submitted to FTAI.

Keywords: FTAI, gonadotropins, estrogens, Nelore cows, estrus synchronization, protocols, hormones, ovulation induction.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Experimental design. On D0 (beginning of treatment), all animals were treated with 1mg of PGF2 α (Cioprostinn, Boehringer Ingelheim) was administered via IM and intravaginal device with 0.96g P4 (Progestar, Boehringer Ingelheim) was inserted and maintained until D8. Additionally, the experimental groups were treated on D0 with estrogen and on D8.5 with gonadotropin as follow: Group 1 (EBE) 2 mg IM of EB (Estrovulinn, Boehringer Ingelheim) and 300 IU IM of eCG (Novormon, Zoetis). Group 2 (EBH) 2 mg IM of EB (Estrovulinn, Boehringer Ingelheim) and 150 IU IM of hCG (Fertigon, Ceva). Group 3 (17EE) 2 mg IM of 17 β E₂ (Betaproginn, Boehringer Ingelheim) and 300 IU IM of eCG (Novormon, Zoetis). Group 4 (17EH) 2 mg IM of 17 β E₂ (Betaproginn, Boehringer Ingelheim) and 150 IU IM of hCG (Fertigon, Ceva).. Diameter of the largest follicle was measures by ultrasonography on D8.5 and D10. FTAI was performed on D10 e pregnancy diagnosis on D40 by ultrasonography37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mean \pm SEM of the pregnancy per artificial insemination on day 40 (day 0 = begin of treatment) by each nominal variable used in the experimental model.....39

Tabela 2. Mean \pm SEM of the diameter of the dominant follicle on day 8.5 (day 0 = begin of treatment) by each nominal variable used in the experimental model.....40

Tabela 3. Mean \pm SEM of the diameter of the dominant follicle on day 10 (day 0 = begin of treatment) by each nominal variable used in the experimental model.....40

Tabela 4. Mean \pm SEM of the dominant follicle growth rate (DFGR) from days 8.5 to 10 (day 0 = begin of treatment) by each nominal variable used in the experimental model.....40

LISTA DE ABREVIATÖES

17 β E₂ – 17 β Estradiol
AI – Artificial Insemination
BE – Benzoato de Estradiol
BSC – Body Score Condition
CE – Cipionato de Estradiol
CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais
CL – Corpo Lúteo / Corpus Luteum
DF – Dominant Follicle
E₂ – Estradiol
EB – Estradiol Benzoate
ECC – Escore de Condição Corporal
eCG – Gonadotrofina Coriônica Equina
FD – Folículo Dominante
FSH – Hormônio Folículo Estimulante
FTAI – Fixed Time Artificial Insemination
GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
hCG – Gonadotrofina Coriônica Humana
IA – Inseminação Artificial
IATF – Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IM – Intramuscular
IV – Intravenosa
LH – Hormônio Luteinizante
P4 – Progesterona
PGF₂ α – Prostaglandina F₂ α
US – Ultrassonografia / Ultrasonography

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	17
HIPÓTESE.....	19
 CAPÍTULO 1.....	 20
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
1.1. INSERMINAÇÃO ARTIFICIAL (IA).....	20
1.2. ESTRADIOL E SEUS ÉSTERES.....	21
1.3. GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA (eCG).....	22
1.4. GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA (hCG).....	24
REFERÊNCIAS.....	26
 CAPÍTULO 2.....	 32
2. ASSOCIATION OF DIFFERENT STEROID HORMONES AND GONADOTROPINS IN PROTOCOLS OF ESTRUS SYNCHRONIZATION AND OVULATION INDUCTION FOR FTAI IN NELORE BOVINE FEMALES.....	32
ABSTRACT.....	32
2.1. INTRODUCTION.....	33
2.2. MATERIAL AND METHODS.....	34
2.2.1. Animals.....	34
2.2.2. Experimental design.....	35
2.2.3. Statistical analyses.....	37
2.3. RESULTS.....	38
2.4. DISCUSSION.....	41
REFERENCES.....	45
 CAPÍTULO 3.....	 52
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52

INTRODUÇÃO

O acelerado crescimento da população mundial gera um grande aumento na demanda por alimentos, causando preocupação com a produção de proteínas de origem animal para atender esse crescente número de habitantes no planeta (FAO, 2017). Em 2022, o Brasil atingiu uma produção de 9,75 toneladas de carne bovina, valor que representa um aumento de 4,6% em relação ao ano de 2021 e colocando o Brasil em segundo lugar no ranking mundial de produção de carne. (USDA, 2022). Entretanto, a pecuária de corte brasileira ainda apresenta baixa eficiência produtiva quando comparada aos Estados Unidos, país líder no ranking mundial de produção de carne, com produção de cerca de 12,6 milhões de toneladas ao ano (FAO, 2022).

O rebanho brasileiro atual apresenta baixa eficiência reprodutiva (Bó et al., 2003; Baruselli et al., 2004c; Junqueira e Alfieri, 2006), muitas das vezes decorrente de longos períodos de anestro pós-parto e baixo ECC provocados pela falta na oferta de alimentos nas épocas de seca. Como alternativa para correção desses deficits, os protocolos de IATF foram desenvolvidos, para a melhora dos índices produtivos e reprodutivos deste período crítico, através de um eficiente programa de sincronização da ovulação, que deve combinar três princípios básicos: I) sincronização do surgimento da onda de crescimento folicular, II) controle sincrônico da fase progesterônica e III) indução sincronizada da ovulação (SANTOS et. al, 2021). Segundo Mello et. al, (2014) gonadotrofinas como a eCG tem sido utilizadas, especialmente em protocolos à base de progesterona (P4) e E₂ devido a seus benefícios nas funções reprodutivas atribuídos à dupla atividade do tipo FSH e LH e à sua longa meia-vida, enquanto a hCG, por se ligar aos receptores de LH nas células da granulosa e teca dos folículos ovarianos com alta afinidade, promovendo benefícios no estímulo do crescimento folicular durante os protocolos da IATF e promover um CL de melhor qualidade após a ovulação.

Com base nisto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o desempenho reprodutivo de fêmeas de bovinos Nelore submetidas à IATF

utilizando protocolos hormonais com diferentes combinações de estrogênios (BE e $17\beta E_2$) e gonadotrofinas (eCG e hCG). O desempenho reprodutivo entre os tratamentos hormonais será avaliado com base na prenhez por IA (P/AI) e no diâmetro do folículo dominante no momento e após o tratamento com gonadotrofina.

HIPÓTESE

A combinação de diferentes estrogênios ($17\beta E_2$ e BE) e diferentes gonadotrofinas (eCG e hCG) em protocolos de sincronização da ovulação resultam em uma boa eficiência reprodutiva quando utilizados em programas de IATF de fêmeas bovinas da raça Nelore.

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (IA)

Segundo os últimos dados divulgados pela ASBIA (INDEX CEPEA/ASBIA 2021), foram comercializadas 28,7 milhões de doses de sêmen, número 21% superior em relação ao ano anterior. Ao comparar os dados de 2021 com os obtidos em 2002, o crescimento foi de 410%. Essas informações comprovam que a inseminação artificial tem sido incorporada de forma crescente ao longo das últimas duas décadas no rebanho bovino brasileiro. (BARUSELLI, et al., 2022). Este aumento no mercado da IA no Brasil ocorreu simultaneamente com a introdução da tecnologia da IATF nas fazendas, pois no que se refere à IA, diferentes partes do mundo relatam baixas taxas de serviço e isto se deve a falhas na detecção de estro e à alta incidência de anestro pós-parto, principalmente em fêmeas *Bos indicus* devido à grande expressão de cio noturno e de curta duração (BARUSELLI et al., 2004a). Como no Brasil as fêmeas bovinas em reprodução possuem prevalência de 80% de sangue zebuino (*Bos taurus indicus*) e são criadas, em grande maioria à pasto, ocorrem significativos comprometimentos nas taxas de detecção de estro e na eficiência dos programas de IA (CREPALDI et al., 2009). Pensando nisso, os programas de IATF passaram por várias modificações com o objetivo de facilitar os manejos e de melhorar as taxas de prenhez (BARUSELLI et al., 2004; SÁ FILHO et al., 2009).

Em 2002, conforme dados obtidos pelo Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP (BARUSELLI et al., 2019a), o número de protocolos comercializados foi de 100 mil, o que demonstra que apenas 1% das inseminações no Brasil foram realizadas por IATF naquele ano. Em 2018, esse número chegou a 13,3 milhões de procedimentos, indicando que 86% das inseminações foram realizadas por IATF no Brasil e constatando que o

crescimento da IATF nos últimos 16 anos chegou a 130 vezes, trazendo grandes avanços e benefícios para toda a cadeia produtiva de carne e leite, além de promover um crescimento considerável na cadeia de comercialização de doses de sêmen e eliminar um dos grandes limitantes da IA na pecuária de corte, que são as falhas de detecção de estro. Com o progresso dessas tecnologias, projetam-se perspectivas positivas para os próximos anos, considerando os dados de mercado no ano de 2018 e estabelecendo um cenário com taxa anual de crescimento de 5% para doses de sêmen comercializadas e de 6% para IATF. Estima-se que o percentual de matrizes inseminadas passe dos atuais 13% para 20% nos próximos 10 anos. Com isso, o Brasil alcançaria a média mundial de fêmeas inseminadas que é de 20 a 22% (THIBIER, WAGNER; 2002).

Atualmente, inúmeros protocolos hormonais para sincronização do estro e indução da ovulação foram desenvolvidos para diferentes raças, categorias e para que o produtor possa adequar o melhor manejo reprodutivo ao seu sistema de produção. Crepaldi et al. (2009) relataram que o protocolo de indução da ovulação com BE em 8,5 dias e IA 36h após a retirada do dispositivo mostrou-se uma alternativa eficaz para a IATF. Contudo, em algumas situações, o protocolo com Cipionato de Estradiol (CE) no D8 e IA 48 horas após a remoção do dispositivo pode ser considerado mais adequado, como por exemplo em grandes rebanhos, possibilitando que mais animais sejam inseminados por uma mesma equipe de IATF em um menor período de tempo.

1.2. ESTRADIOL E SEUS ÉSTERES

Os estrogênios são esteroides naturais constituídos por 18 átomos de carbono e têm como principais compostos o $17\beta E_2$, estrona e estriol, que são produzidos pelo organismo, principalmente nos ovários, porém estão presentes também na placenta e adrenais (CREPALDI, 2009). O estrógeno desempenha funções importantes na fisiologia reprodutiva da fêmea, tais como a expressão de estro, características sexuais secundárias e liberação de GnRH e LH pelo

hipotálamo e hipófise, respectivamente, além da inibição da liberação de FSH pela hipófise anterior (CREPALDI, 2009).

No mercado atual existem diversos compostos sintéticos que possuem as mesmas atividades biológicas dos estrogênios naturais. Estes compostos têm sido frequentemente empregados em biotecnologias reprodutivas para promover o controle farmacológico do ciclo estral em fêmeas bovinas, uma vez que, na ausência de progesterona a administração de estrógeno pode estimular a liberação de GnRH e LH, causando a ovulação do folículo dominante (MOENTER et al., 1990). Os estrógenos mais utilizados com esta finalidade são o $17\beta E_2$ e os ésteres de E_2 , como o BE e CE, substitutos ao tratamento com GnRH como indutores da ovulação em protocolos de IATF, com menor custo (CREPALDI et al., 2009). Larson et al. (1992), observaram que a administração intravenosa (IV) de 3 miligramas (mg) de $17\beta E_2$ promove um pico nas concentrações plasmáticas de 50 picogramas por mililitro (pg/mL) de E_2 em até 2 horas (h) depois, com o retorno às concentrações basais em 6h após o tratamento. Já Burke et al. (2000), verificaram que 1mg de BE por via intramuscular (IM) promove um rápido aumento nas concentrações plasmáticas de E_2 , atingindo a concentração máxima de 12,6 pg/mL em até 4h após, permanecendo elevada (12pg/mL) por 24h. Ainda, Lopes et al., (2000) verificaram que 2mg de CE por via IM promovem aumento nas concentrações plasmáticas de E_2 (25pg/mL) 12h após a aplicação e pico (33pg/mL) 36h após a administração, permanecendo elevada por mais de 96h (15pg/mL). Portanto, as características farmacocinéticas específicas dos diferentes ésteres de E_2 são de grande importância e devem ser consideradas na determinação das estratégias que objetivem a sincronização do estro, pois o seu pico de concentração e a sua meia-vida influenciam diretamente no resultado.

1.3. GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA (eCG)

A gonadotrofina coriônica equina é um hormônio glicoproteico de meia vida longa (atua por até 3 dias), é produzida nos cálices endometriais de éguas

prenhes, e possui efeitos similares ao LH e FSH em uma mesma molécula (MURPHY; MARTINUK, 1991). Portanto, quando utilizados em programas de IATF no momento da retirada da P4, confere uma ação luteinizante e folículo estimulante (BARUSELLI et al., 2008). De acordo com Murphy e Martinuk (1991), a eCG é composta de duas subunidades (α - composta por 96 aminoácidos; e β - composta por 149 aminoácidos). Uma característica importante da molécula de eCG é a existência de uma grande quantidade de carboidratos (aproximadamente 45% de sua massa) principalmente a N-acetil neuramina (ou ácido siálico), primordialmente presente na subunidade β da molécula, o que proporciona uma meia vida mais longa. Ainda, devido ao alto peso molecular e à presença de ácido siálico, a molécula de eCG é carregada negativamente, o que dificulta a sua filtração glomerular e aumenta ainda mais sua meia-vida. Devido a todos estes fatores, a meia-vida da eCG quando aplicado em bovinos é longa, aproximando-se a 46h.

Este hormônio gonadotrófico é importante para o estímulo do crescimento folicular, conferido por seu efeito inicial de FSH e de LH após o desvio, além de incrementar as taxas de ovulação e prenhez de fêmeas que apresentam escore de condição corporal (ECC) insatisfatório e com alta incidência de anestro (MADUREIRA; PIMENTEL, 2005; SÁ FILHO et al. 2010, SALES et al., 2011; SALES et al., 2012, SALES et al. 2016). Vários autores (BARUSELLI et al., 2003; SÁ FILHO et al., 2004; PENTEADO et al., 2005) relatam estes aumentos na taxa de concepção em vacas e novilhas de corte, especialmente em animais em anestro e de baixa condição corporal (BARUSELLI et al., 2004), que receberam eCG na retirada do dispositivo intravaginal de P4. Além disso, outros estudos utilizando receptoras de embrião também relataram o efeito luteotrófico da eCG resultando no aumento da taxa de concepção após sua utilização em associação ao protocolo de sincronização de receptoras de corte (BARUSELLI; MADUREIRA., 2000).

Sales et al. (2009) avaliaram o efeito da eCG e do FSH na taxa de ovulação e de concepção de vacas de corte, comprovando que a eCG foi eficiente em aumentar a taxa de concepção quando comparada ao grupo controle, além de aumentar a taxa de ovulação e o crescimento diário dos

folículos entre a retirada do dispositivo e a ovulação, fato que não ocorreu com o uso do FSH devido ao seu curto tempo de meia-vida, comprovando assim, a importância econômica da utilização da eCG em protocolos de IATF.

1.4. GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA (hCG)

A hCG é uma gonadotrofina de origem coriônica como a eCG, que possui 70% de sua estrutura representada pelo arcabouço proteico e 30% pelas ramificações e unidades de carboidratos. Da mesma forma que a eCG, a hCG está estruturada em duas subunidades, α e β , além de possuir características estruturais que a tornam semelhante ao FSH e LH. Entretanto, de acordo com Medeiros et. al. (2006), ainda que as subunidades α e β sejam consideradas semelhantes na sequência de aminoácidos, podem existir diferenças marcantes na composição e complexidade das cadeias laterais de oligossacarídeos do LH e FSH, como o conteúdo de carboidrato, por exemplo. Sabe-se que a meia-vida circulante de uma gonadotrofina é principalmente proporcional à sua quantidade de ácido siálico. A hCG possui grandes quantidades de ácido siálico e, por conseguinte, tem meia-vida longa, de aproximadamente 24h de acordo com Nascimento et al. (2013).

Autores como De Rensis et al., (2008) e Fischer-Tenhagen et al., (2010) buscaram a melhoria de protocolos reprodutivos através da utilização da hCG, uma vez que estudos demonstram sua atuação mediante a formação de corpos lúteos (CLs) de melhor qualidade em termos de estrutura e, consequentemente, produção de P4 (BREUEL.,1989; FRICKE.,1993). Sianangama e Rajamahendran, (1992) e Machado (2012) também relatam que a administração da hCG pode prolongar a vida útil do CL, além de estimular a ovulação de um CL acessório por meio da indução da ovulação de folículos de segunda onda, além do recrutamento da terceira onda nos dias 14 ou 15 do ciclo.

Portanto, além de sua grande importância como agente luteotrófico e indutor da ovulação, conforme mencionados anteriormente, ainda não se sabe ao certo se a hCG pode também ser utilizada na indução do crescimento folicular

de forma semelhante à eCG, uma vez que ambas as gonadotrofinas possuem afinidade por receptores FSH e LH. Estudos preliminares recentes de Prata, (2018) e Souza, (2019) apontam para essa possibilidade, porém, com redução considerável de sua dose quando utilizada em protocolos de IATF.

Prata, (2018) avaliou a utilização da hCG comparativamente à eCG em termos de crescimento folicular final em fêmeas bovinas da raça Nelore submetidas à IATF, verificando a sua alta capacidade de induzir a ovulação prematura em doses de 300UI e 200UI, não podendo ser utilizada, nestas doses, como alternativa para substituir a eCG em protocolos reprodutivos. Ao contrário, estudos de Souza, (2019) demonstraram que a administração da hCG em baixas doses (150UI) para indução da ovulação em protocolos de IATF de fêmeas zebuínas (*Bos taurus indicus*), se mostrou uma alternativa viável para esta finalidade no momento da retirada do dispositivo intravaginal de P4, em associação ao BE. Portanto, é fundamental que haja uma melhor compreensão da ação biológica da hCG em associação a diferentes ésteres de estradiol, além da realização de mais estudos para comprovar a sua eficácia e segurança para esta finalidade.

REFERÊNCIAS

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Sumário 2018.

ASBIA. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Index ASBIA Mercado, 2021.

BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA, E.H. **Controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes**. 2000, Anais. São Paulo: Fundação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, 2000.

BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; NASSER, L.F.; REIS, E.L.; BÓ, G.A. Effect of eCG on pregnancy rates of lactating zebu beef cows treated with cidr-b devices for timed artificial insemination. **Theriogenology**, v.59, p.214, 2003.

BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O.; NASSER, L.F.; BÓ, G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Anim Reprod Sci**, v.82, p.479-486, 2004.

BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA, E.H.; MARQUES, M.O.; RODRIGUES, C.A.; NASSER, L.F.; SILVA, R.C.P.; REIS, E.L.; SÁ FILHO, M.F. Efeito do tratamento com eCG conforme o escore de condição corporal na taxa de concepção de vacas Nelore inseminadas em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 228, 2004a.

BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O.; NASSER, L.F.T.; BÓ, G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Anim Reprod Sci**, v.82, p.479-486, 2004c.

BARUSELLI, P. S.; JACOMINI, J. O.; SALES, J. N. S.; CREPALDI, G. A. Importância do emprego da ECG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. **Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. Londrina, UEL, p.146-166, 2008.

BARUSELLI, P.S. Avaliação do mercado de IATF no Brasil. **Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP**, 1. ed., 2019a.

BARUSELLI, P.S.; SANTOS, G.F.F.; CREPALDI, G.A.; CATUSSI, B.L.C.; OLIVEIRA, A.C.S. **IATF em números: evolução e projeção futura**. Anais da VI Reunião Anual da Associação Brasileira de Andrologia Animal. Campinas, SP, 2022.

BREUEL, K.F.; SPITZER, J.C.; HENRICKS, D.M. Systemic progesterone concentration following human chorionic gonadotropin administration at various times during the estrous cycle in beef heifers. **J Anim Sci**, v. 67, p. 1564–72, 1989.

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTINEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Anim Reprod Sci**, v.78, p.307-326, 2003.

BURKE, C. R.; DAY, M. L.; BUNT, C. R.; MACMILLAN, K. L. 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, p. 145-151, 2000.

CREPALDI, G. A. **Eficácia de diferentes protocolos de indução da ovulação e de intervalos de inseminação em vacas de corte submetidas à IATF**. Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2009.

DE RENSIS, F.; VALENTINI, R.; GORRIERI, F.; BOTTARELLI, E.; LOPEZ-GATIUS, F. Inducing ovulation with hCG improves the fertility of dairy cows during the warm season. **Theriogenology**, v. 69, p. 1077-1082, 2008.

FAO. Food and agriculture organization. Cenário da demanda por alimentos no Brasil, 2017. Rome: FAO, 2017.

FISCHER-TENHAGEN, C.; THIELE, G.; HEUWIESER, W.; TENHAGEN, B.A. Efficacy of a Treatment with hCG 4 days After AI to Reduce Pregnancy Losses

in Lactating Dairy Cows After Synchronized Ovulation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, n.3, p.468-472, 2010.

FRICKE, P.M.; REYNOLDS, L.P.; REDMER, D.A. Effect of human chorionic gonadotropin administered early in the estrous cycle on ovulation and subsequent luteal function in cows. **Journal of Animal Science**, v.71, n.5, p.1242-1246, 1993.

JUNQUEIRA, J.R.C.; ALFIERI, A.A. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. **Semina: Ciênc Agrár**, v.27, p.289-298, 2006.

LARSON, L. L.; BALL, P. J. H. Regulation of estrus cycle in dairy cattle: a review. **Theriogenology**, v. 38, p. 255-267, 1992.

LOPES, F. L.; ARNOLD, D. R.; WILLIAMS, J.; PANCARCI, S. M.; THATCHER, M. J.; DROST, M.; THATCHER, W. W. Use of estradiol cypionate for timed insemination. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 216, 2000.

MACHADO, R. Protocolos para otimizar a fertilidade de vacas de corte e de leite. **Embrapa Pecuária Sudeste**, São Carlos-SP, v.70, p.3, 2012.

MADUREIRA, E. H.; PIMENTEL, J. R. V. **IATF como uma ferramenta para melhorar a eficiência reprodutiva** In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, v.16, p.120, 2005.

MEDEIROS, S. F.; NORMAN, R. J. Formas moleculares da gonadotrofina coriônica humana: características, ensaios e uso clínico. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** v.28, n.4, 2006.

MELLO, R.R.C.; FERREIRA, J.E.; MELLO, M.R.B.; PALHANO, H.B. Utilização da gonadotrofina coriônica equina (eCG) em protocolos de sincronização da ovulação para IATF em bovinos: revisão **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.38, n.3, p.129-134, 2014

MOENTER, S. M.; CARATY, A.; KARSCH, F. J. The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. **Endocrinology**, v. 127, p. 1375-1384, 1990.

MURPHY, D. B.; MARTINUK, S. D. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrine Reviews**, v. 12, n. 1, p. 27-44, 1991.

NASCIMENTO, A. B.; BENDER, R. W.; SOUZA, A.H.; AYRES, H.; ARAUJO, R.R.; GUENTHER, J.N.; SARTORI, R.; WILTBANK, M. C. Effect of treatment with human chorionic gonadotropin on day 5 after timed artificial insemination on fertility of lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.** v.96, p. 2873–2882, 2013.

PENTEADO, L.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. L.; GIMENES, L. U.; AYRES, H.; BARUSELLI, P. S. Conception rates in lactating Nelore cows treated with intravaginal progesterone device associated with estradiol benzoate or estradiol cypionate. Annual meeting of Brazilian Technology Society. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 260, 2005.

PRATA, A.B.; DRUM, J.N.; MELO, L.F.; ARAUJO, E.R.; SARTORI, R. Effect of different chorionic gonadotropins on final growth of the dominant follicle in *Bos indicus* cows. **Department of Animal Science**, Luiz de Queiroz College of Agriculture (ESALQ), University of São Paulo, Piracicaba, 2018.

RAJAMAHENDRAN, R.; SIANANGAMA, P.C. Effect of human chorionic gonadotrophin (hCG) on dominant follicles in cows: accessory corpus luteum formation, progesterone production and pregnancy rate. **J Reprod Fertil**, v. 95, p. 577–84, 1992.

SÁ FILHO, M. F.; REIS, E. L.; VIEL JR., J. O.; NICHI, M.; MADUREIRA, E. H.; BARUSELLI, P. S. Follicular dynamics in anestrus lactating Nelore treated with ear implant, eCG and GnRH. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 235, 2004.

SÁ FILHO, O.G.; MENEGHETTI, M.; PERES, R.F.G.; LAMB, G.C.; VASCONCELOS, J.L.M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v.72, p.210-218, 2009.

SÁ FILHO, M.F.; AYRESA, H.; FERREIRA, R.M.; MARQUES, M.O.; REISA, E.L.; SILVA, R.C.P.; RODRIGUES, C.A.; MADUREIRA, E.H.; BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. **Theriogenology**, v. 73, p. 651-658, 2010.

SÁ FILHO, M.F.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; PENTEADO, L.; GIMENES, L.U.; FERREIRA, R.M.; AYRESA, H.; CASTRO E PAULA, L.A.; SALES, J.N.S.; BARUSELLI, P.S. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 182-187, 2010.

SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A.; MAIO, J.R.G.; SOUZA, E.F.D.; CARREIRO, S.S.; VERONEZ, D.G.; NOGUEIRA, G.P.; BARUSELLI, P.S. Perfil de liberação de LH após o tratamento com cipionato de estradiol em novilhas Nelore ovariectomizadas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, p.1028, 2007.

SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A.; GIROTTI, R.W. ; BARUSELLI, P.S. **Effect of FSH and eCG on follicular dynamic and pregnancy rate in fixed-time AI protocol in anestrous beef cows**. In: VIII Simposio Internacional de Reproducción Animal, 2009.

SALES, J.N.S.; CREPALDI, G. A.; GIROTTI, R. W.; SOUZA, J. C.; BARUSELLI, P. S. 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, p. 12-18, 2011.

SALES, J.N.S.; CARVALHO, J.B.P.; CREPALDI, G.A.; CIPRIANO, R.S.; JACOMINI, J.O.; MAIO, J.R.G.; SOUZA, J.C.; NOGUEIRA, G.P.; BARUSELLI, P.S. 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, p. 510-516, 2012.

SALES, J.N.S.; BOTTINO, M.P.; SILVA, L.A.C.L.; GIROTTI, R.W.; MASSONETO, J.P.M.; SOUZA, J.C.; BARUSELLI, P.S. Effects of eCG are more

pronounced in primiparous than multiparous *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v.86, p. 2290-2295, 2016.

SANTOS, G.M.; SILVA-SANTOS, K.C.; YOKOMIZO, D.N.; DOS ANJOS, M.M.; SENEDA, M.M. **Importância dos índices reprodutivos e fundamentos do programa de IATF em sistemas de cria**. Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA-2021). Belo Horizonte-MG, 2021.

SOUZA, A.L.; VALENZA, A.; CARNEIRO, T.; ZANATTA, G.M.; MINGOTI, R.D.; SILVA, L.G.; BATISTA, E.O.S.; BARUSELLI, P.S. 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**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA, 2019.

THIBIER, M.; WAGNER, H.G. World Statistics for artificial insemination in cattle. **Livest Prod Sci**, v.74, n.2, p.203- 2012, 2002.

WALTON, J.S.; HOLBERT, G.W.; ROBINSON, N.A.; LESLIE, K.E. Effects of progesterone and human chorionic gonadotropin administration five days post insemination on plasma and milk concentrations of progesterone and pregnancy rates of normal and repeat breeder dairy cows. **Can J Vet Res**, v. 54, p. 305–8, 1990.

CAPÍTULO 2

2. ASSOCIATION OF DIFFERENT STEROID HORMONES AND GONADOTROPINS IN PROTOCOLS OF ESTRUS SYNCHRONIZATION AND OVULATION INDUCTION FOR FTAI IN NELORE BOVINE FEMALES

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the reproductive performance of Nelore bovine females submitted to four different hormonal protocols of Fixed Time Artificial Insemination (FTAI). The females were treated with different estrogens (EB and $17\beta E_2$) and gonadotropins (eCG and hCG) and the pregnancy per AI (P/AI) and the diameter of the dominant follicle on days 8.5 (D8.5) and 10 (D10) were compared among the treatments. A total of 587 Nelore females in reproductive activity were submitted to FTAI using an 8.5-day hormonal treatment protocol based on P4 and sodium Cloprostenol. The estrogens were administered on day 0, gonadotropins on D8.5 and artificial insemination (AI) performed on D10. Treatments were distributed in a completely randomized design with a 2 x 2 factorial arrangement, being estrogens by EB and $17\beta E_2$, and gonadotropins by eCG and hCG. The diameter of the dominant follicle (DDF) was measured by mode-B transrectal ultrasonography on D8.5 and D10. Pregnancy diagnosis was performed 40 days after AI. The general P/AI was 46.3% (272/587). Pregnancy rates by estrogens were 46.3% (131/283) for EB and 46.4% (141/304) for $17\beta E_2$, and by gonadotropins were 48.2% (144/299) for eCG and 44.4% (128/288) for hCG. The P/AI did not differ among the treatments or their associations ($P > 0.05$). Therefore, it can be concluded that the studied hormonal protocols with estrogens and gonadotropins result in similar reproductive efficiency when used for estrus synchronization and ovulation induction in Nelore bovine females submitted to FTAI.

Keywords: Animal reproduction, beef cattle, hormones, pregnancy, steroids.

2.1. INTRODUCTION

The beef chain has a prominent position in the context of Brazilian agribusiness, occupying a vast area of its territory and accounting for the generation of employment and income for millions of Brazilians (LIMA, et al. 2022). However, the national tropical cattle breeding system still presents low reproductive efficiency, often with precarious management, and little or no control over the different phases that involve the reproductive and productive chains (CASTRO, et al., 2018 and MALAFAIA, et al, 2019). Based on this, the development and improvement of new technologies that contribute to increased productivity and optimization of breeding systems is essential to increase the profitability of the herds. Among the reproductive biotechnologies, the FTAI stands out, bringing great advantages to herd's performance when compared to natural mating (LIMA et al., 2010; LAMB and MERCADANTE, 2016; BARUSELLI et al.,2018)

The association between E₂ and progesterone (P₄) has been widely used in FTAI protocols in dairy and beef cows. This association acts by suppressing the support of follicle-stimulating (FSH) and luteinizing hormones (LH), promoting atresia of existing follicles, followed by the emergence of a new wave of follicular growth (MACMILLAN et al., 1999; BARUSELLI et al., 2001; BÓ, et al., 2002). For the synchronization of a new follicular wave to occur properly, it is necessary for the synchronizer to act within a minimum time variation among all animals. In this context, EB is highly effective in inducing the emergence of a new follicular wave in protocols based on E₂/P₄ (MENEGETTI et al., 2009), however, it presents greater variability compared to 17βE₂ at the moment of follicular emergence (MARTÍNEZ et al., 2005). Indeed, when the emergence of a new follicular wave is delayed, a smaller preovulatory follicle is expected (ABREU et al., 2014) and this undesirable dispersion can be explained by the longer half-life of EB compared to E₂ (MARTÍNEZ et al., 2005; BÓ et al., 2000).

Treatments with gonadotropins, such as equine chorionic gonadotropin (eCG), has been included in FTAI protocols with the aim of stimulating follicular development, ovulation, and conception rates (BARUSELLI, et al., 2012). Many

studies reported that eCG has similar activity to FSH and LH, suggesting its ability to bind to receptors on granulosa and theca cells, stimulating follicular growth (MURPHY and MARTINUK, 1991; SOUMANO and CHRISTOPHER, 1998; YAVAS and WALTON, 2000). In addition, it has been reported in cattle that human chorionic gonadotropin (hCG) binds to LH receptors with high affinity on granulosa and theca cells of ovarian follicles (IRLANDA and ROCHE, 1982; IRLANDA and ROCHE, 1983) and been used to induce ovulation in FTAI protocols (DE RENSIS et al., 2008; BUTTREY and BURNS, 2010; KESKIN et al. 2010) or to stimulate the formation of accessory CL after AI (FRICKE et al., 1993; STEVENSON et al., 2007; STEVENSON, et al., 2008; NASCIMENTO, et al., 2013). Thus, due to the LH activity and its long half-life in cattle, great is the interest to evaluate FTAI hormonal treatments with this hormone at the time of P4 device removal as an alternative to the eCG (PRATA, et al., 2018). However, the efficiency of its use based on pregnancy rates results in FTAI protocols has not yet been studied.

In this context, this study aimed to evaluate the reproductive performance of female Nelore cattle submitted to FTAI using hormonal protocols with different combination of estrogens (EB and $17\beta E_2$) and gonadotropins (eCG and hCG). The reproductive performance among the hormonal treatments will be evaluated based on pregnancy per AI (P/AI) and the diameter of the dominant follicle (DDF) at the time and after the gonadotropin treatment.

2.2. MATERIAL AND METHODS

2.2.1. Animals

205 Nelore heifers and 382, totaling 587 animals, suitable for breeding from a commercial herd, from the da Matta's Farm, in Santa Rita do Trivelato-MT, Brazil, were selected and studied in two reproductive seasons. All selected cows had been examined by rectal palpation and ultrasonography before the experiments and did not present any reproductive tract abnormalities. They were

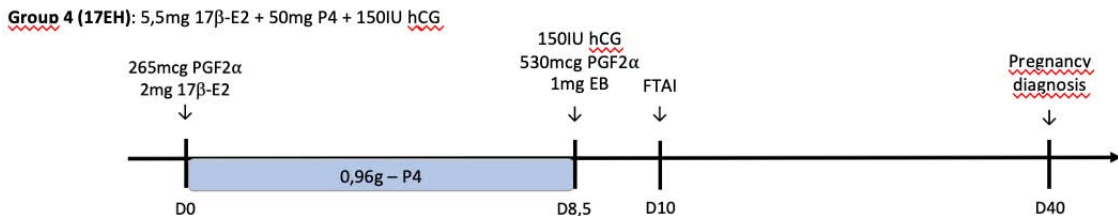
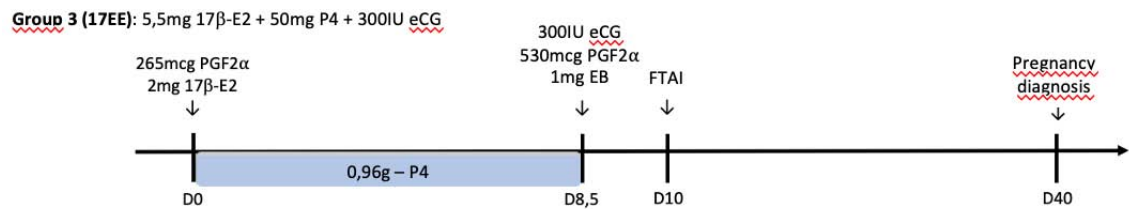
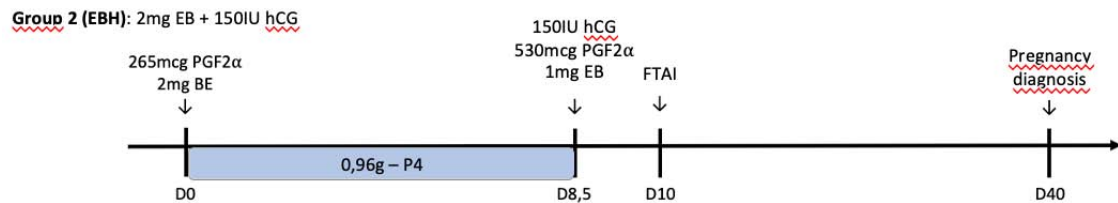
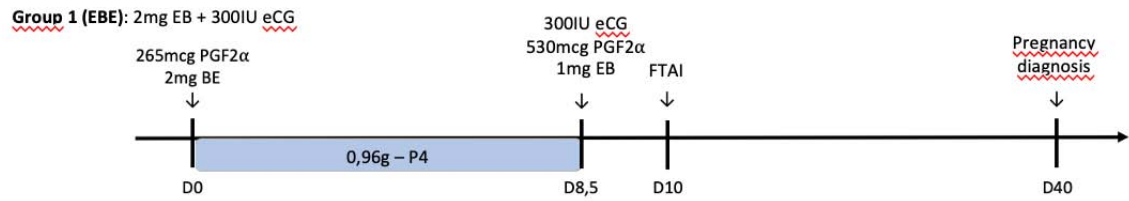
kept on *Brachiaria brizantha* pasture with ad libitum access to traced-mineral salt and water. All experimental procedures were performed in accordance with the rules established by the National Council for the Control of Animal Use and Experimentation (CONCEA) – Ministry of Science and Technology and were approved by the Ethics Committee for Animal Use and Experimentation (CEUA; protocol number: 2582131119) of the School of Animal Science and Food Engineering (FZEA) from the University of São Paulo (USP).

2.2.2. Experimental design

Two different combination of estrogens ($17\beta\text{E}_2$ + 50mg P4, Betraproginn, Boehringer Ingelheim and Estadiol benzoate, Estrovulinn, Boehringer Ingelheim) and two gonadotropins (eCG, Novormon, Zoetis and hCG, Fertigon, Ceva) were combined and used in two experimental treatments (Figure 1). The treatments were divided into estrogens and gonadotropins, and combined into different groups, EBE (EB + eCG), EBH (EB + hCG), 17EE ($17\beta\text{E}_2$ + eCG) and 17EH ($17\beta\text{E}_2$ + hCG). The heifers and cows were distributed through a completely randomized design with a factorial arrangement of 2 x 2 treatments evenly distributed. The experiment started in the morning of day 0 (D0). The reproductive tract was evaluated by transrectal ultrasonography in B-mode for abnormalities and the selected females received one of the following treatments: 5,5mg of $17\beta\text{E}_2$ + 50mg of P4 IM (Betraproginn, Boehringer Ingelheim) or 2mg of EB IM (Estrovulinn, Boehringer Ingelheim). A distribution criterion, according to BSC and presence or absence of CL, was used to equilibrate the experimental number between the groups. At the same time, a P4 sustained releasing intravaginal device (Progestar, Boehringer Ingelheim) was inserted, and 265mcg of PGF2 α (Cioprostinn, Boehringer Ingelheim) IM was injected in all females. The device remained inserted for 9 days and removed on the afternoon (D8.5). On D8.5 the DDF was assessed by transrectal ultrasonography. Then, the females received 1 mg of EB IM (Estrovulinn, Boehringer Ingelheim), with one of the gonadotropins, 300IU of eCG IM (Novormon, Zoetis) or 150IU of hCG IM (Fertigon, Ceva). After 36 to 40 hours of the P4 device removal (D10), AI was performed with semen

from three fertile bulls and the DDF was again measured by ultrasonography. Pregnancy diagnosis was then performed 40 days after AI by ultrasonography (Figure 1).

Figure 1. Experimental design. On D0 (beginning of treatment), all animals were treated with 1mg of PGF2 α (Cioprostinn, Boehringer Ingelheim) was administered via IM and intravaginal device with 0.96g P4 (Progestar, Boehringer Ingelheim) was inserted and maintained until D8.. Additionally, the experimental groups were treated on D0 with estrogen and on D8.5 with gonadotropin as follow: Group 1 (EBE) 2 mg IM of EB (Estrovulinn, Boehringer Ingelheim) and 300 IU IM of eCG (Novormon, Zoetis). Group 2 (EBH) 2 mg IM of EB (Estrovulinn, Boehringer Ingelheim) and 150 IU IM of hCG (Fertigon, Ceva). Group 3 (17EE) 2 mg IM of 17 β E₂ (Betaproginn, Boehringer Ingelheim) and 300 IU IM of eCG (Novormon, Zoetis). Group 4 (17EH) 2 mg IM of 17 β E₂ (Betaproginn, Boehringer Ingelheim) and 150 IU IM of hCG (Fertigon, Ceva). Diameter of the largest follicle was measures by ultrasonography on D8.5 and D10. FTAI was performed on D10 e pregnancy diagnosis on D40 by ultrasonography.



Source: Own authorship

2.2.3. Statistical analyses

P/AI, DDF on D8.5 and D10, and follicular growth rate from D8.5 to D10 were analyzed by a multivariate mixed model (proc Glimmix; SAS 9.4) as dependent variables. For P/AI, the nominal variables considered in the statistical

model were gonadotropins (eCG or hCG), estrogens (EB or $17\beta E_2$), its interaction (gonadotropins and estrogens), BSC (≤ 3 or > 3), category (heifer or cow), CL on D0 (presence or absence), ovulation on the day of AI (ovulated or non-ovulated), and DDF D10. Breeding season (2019-2020 or 2020-2021) and bull (1, 2 or 3) were considered as random variables. Data of DDF D10 (D10cat) were divided in two categories being follicular diameters equal or below 11.5 mm or higher than 11.5 mm. For DDF D8.5, the nominal variables considered in this statistical model were estrogens (EB or $17\beta E_2$), category (heifer or cow), CL on D0 (presence or absence), and BSC (≤ 3 or > 3). Breeding season (2019-2020 or 2020-2021) was considered as a random variable. For DDF D10 and follicular growth rate, the nominal variables considered in this statistical model were estrogens (EB or $17\beta E_2$), gonadotropins (eCG or hCG), its interaction (gonadotropins and estrogens), ovulation on the day of AI (ovulated or non-ovulated), BSC (≤ 3 or > 3), and category (heifer or cow). Breeding season (2019-2020 or 2020-2021) was considered as a random variable. For all the multivariate analysis, the nominal variables were excluded from the model when they were non-significant based on the Wald test. All continuous data are presented as mean \pm MSE. Significance level $P < 0.05$ was used for all tests.

2.3. RESULTS

The general P/AI during the two studied breeding seasons was 46.3% (272/587). The pregnancy rates by estrogens were 46.3% (131/283) for EB and 46.4% (141/304) for $17\beta E_2$, and by gonadotropins were 48.2% (144/299) for eCG and 44.4% (128/288) for hCG. The P/AI did not differ among the treatments ($P > 0.05$; Table 1). The P/AI were compared by the categories of the nominal variables, as previously described in statistical analyses. Differences of P/AI were only detected when animals were divided by BSC ($P = 0.0327$), category ($P = 0.0170$) and D10cat ($P = 0.0006$). P/AI did not differ ($P > 0.05$) by the nominal categories of breeding seasons, estrogens, gonadotropins, ovarian condition on D0, bull, and presence or absence of ovulation on the day of AI (Table 1).

The DDF on D8.5 were compared by the categories of the nominal variables breeding season, estrogens, category, ovarian condition on D0, and BSC. Differences of DDF on D8.5 were detected between animals of the nominal categories of estrogens ($P = 0.0387$), category ($P = 0.0001$), and CL on D0 ($P = 0.0010$). DDF on D8.5 did not differ ($P > 0.05$) between animals divided by breeding seasons and BSC nominal categories (Table 2).

The DDF on D10 and the growth rate of the dominant follicle from D8.5 to D10 were compared by animals in the nominal variables of breeding season, estrogens, gonadotropins, category, ovarian condition on D0, and BSC (Tables 3 and 4). Differences of DDF on D10 were detected between animals in the nominal variables of category ($P = 0.0327$) and CL on D0 ($P = 0.0011$). No differences were found for DDF on D10 ($P > 0.05$) between animals divided by breeding seasons, estrogens, gonadotropins, and BSC (Table 3). For the growth rate of the dominant follicle (DFGR) from D8.5 to D10, no differences ($P > 0.05$) were found for animals in all the nominal variables (Table 4).

Table 1. Mean \pm SEM of the pregnancy per artificial insemination on day 40 (day 0 = begin of treatment) by each nominal variable used in the experimental model.

Effect	Groups	N	P/AI	P-value
Estrogens	EB	283	0.46 ± 0.030	0.5429
	$17\beta E_2$	304	0.46 ± 0.029	
Gonadotropins	eCG	299	0.48 ± 0.029	0.4651
	hCG	288	0.44 ± 0.029	
E_2 *Gonadotropin	-	587	0.46 ± 0.029	0.3732
BSC	< 3	259	0.37 ± 0.030	0.0327
	> 3	328	0.54 ± 0.028	
Category	Heifer	205	0.58 ± 0.035	0.0170
	Cow	382	0.40 ± 0.025	
D10cat	< 11.5mm	181	0.37 ± 0.021	0.0006
	> 11.5mm	343	0.51 ± 0.020	

Significance level of $P \leq 0.05$.

Table 2. Mean \pm SEM of the diameter of the dominant follicle on day 8.5 (day 0 = begin of treatment) by each nominal variable used in the experimental model.

Effect	Groups	N	DDF D8.5	P-value
Estrogens	EB	283	11.00 \pm 0.013	0.0387
	17 β E ₂	304	11.29 \pm 0.011	
Category	Heifer	205	10.83 \pm 0.014	0.0001
	Cow	382	11.31 \pm 0.010	
CL on D0	Without CL	295	10.96 \pm 0.012	0.0010
	With CL	292	11.33 \pm 0.012	

Significance level if $P \leq 0.05$.

Table 3. Mean \pm SEM of the diameter of the dominant follicle on day 10 (day 0 = begin of treatment) by each nominal variable used in the experimental model.

Effect	Groups	N	DDF D10	P-value
Estrogens	EB	254	12.32 \pm 0.013	0.1112
	17 β E ₂	270	12.62 \pm 0.013	
Gonadotropins	eCG	273	12.45 \pm 0.013	0.9432
	hCG	251	12.49 \pm 0.013	
E ₂ *Gonadotropin	-	524	12.47 \pm 0.013	0.4195
Category	Heifer	184	12.09 \pm 0.016	0.0001
	Cow	340	12.68 \pm 0.011	
CL on D0	Without CL	264	12.27 \pm 0.013	0.0021
	With CL	260	12.68 \pm 0.013	

Significance level if $P \leq 0.05$.

Table 4. Mean \pm SEM of the dominant follicle growth rate (DFGR) from days 8.5 to 10 (day 0 = begin of treatment) by each nominal variable used in the experimental model.

Effect	Variable	N	DFGR	Pr > F
Estrogens	EB	254	1.49 \pm 0.010	0.7187
	17 β E ₂	270	1.48 \pm 0.010	
Gonadotropins	eCG	273	1.49 \pm 0.010	0.5972
	hCG	251	1.48 \pm 0.011	
E ₂ *Gonadotropin	-	524	0.44 \pm 0.010	0.9214

Significance level if $P \leq 0.05$.

2.4. DISCUSSION

Estradiol esters have been used in combination with P4 at the beginning of estrus synchronization protocols in cows. Its primary effect is to promote follicular atresia, contributing to the synchronous emergence of the follicular wave among animals. $17\beta\text{E}_2+\text{P}_4$ was tested as an alternative for this purpose.

The use of E_2 in synchronization protocols has already been previously reported in other studies (MARTÍNEZ et al., 2005; BO et al., 1994) through the combination of injectable E_2 and short-acting P4 (E_2+P_4) administered after insertion of the P4 intravaginal device. This combination is commercially used due to reaching the E_2 peak before the increase in circulating P4 resulting from the intravaginal device, which may lead to occasional unwanted ovulation at the beginning of the protocol, which does not occur with the use of EB due to its half-life. longer. However, the advantage of $17\beta\text{E}_2$ compared to EB is precisely its shorter half-life, which tends to result in less variation during the emergence of a new follicular wave (MARTÍNEZ et al., 2005; BO et al., 2000; BO et al., 1994), making this E_2+P_4 association a viable alternative for a more adequate synchronization. However, the comparison of efficiency in terms of synchronization, emergence time and pregnancy rates by FTAI has not yet been reported (ROCHA et al., 2022).

Furthermore, it is known that follicular diameter is directly related to ovulatory capacity, making treatment with gonadotropins in FTAI protocols a viable alternative to stimulate follicular development, and consequently the efficiency of ovulation and conception, optimizing results. The use of eCG and hCG for this proposal was also tested.

The overall P/AI in this study was 46.3% (272/587). Although this result seems to be low, it was like the averages obtained by Prata, et al., (2018) and Souza, et al., (2019) in commercial Nelore cattle herds in Brazil. The low reproductive efficiency in zebu herds in Brazil results from a combination of factors like low birth rates, increased age at the first calving, and long service periods. These factors are also closely linked low body score condition and prolonged postpartum anestrus (BERETA, et al., 1998; OLIVEIRA, et al., 2011).

This study was developed in a regular farm condition and, despite the pastures being nutritionally deficient during the dry period due to climatic conditions in both reproductive seasons, resulting in a low ECC, the pregnancy rate obtained was like the rates obtained by Prata, et al., (2018) and Souza, et al., (2019).

Despite the high levels of synchronization of estrus and ovulation achieved with the various existing commercial hormonal treatments, these results are not always translated into pregnancy (PORTO FILHO, et al., 2004). Treatment with eCG at the time of intravaginal P4 implant removal improved preovulatory follicle growth, increased the percentage of cows ovulating at the end of FTAI protocol, and increased P/AI, especially in cows or heifers with low BSC or in non-cycling cows (PESSOA, et al., 2010; SÁ FILHO, et al., 2010; SÁ FILHO, et al., 2010; SALES, et al., 2011). The benefits of eCG on reproductive function are attributed to the long half-life of eCG and the dual FSH and LH-like activity of the molecule (MURPHY and MARTINUK, 1991). Recent studies of Catussi, et al., (2018) demonstrated that eCG at a dosage of 300UI, as it is already commercially used in protocols of FTAI of bovine females, causes an increase in follicular growth, DF diameter and ovulation rates, estrus, and conception.

The hCG, on the other hand, still presents controversial results in relation to its application in FTAI protocols. However, a reproductive management program to synchronize ovulation using hCG can ovulate a smaller follicle, potentially resulting in inadequate P4 concentrations after AI (NASCIMENTO et al., 2013). Nonetheless, a study showed the effect of hCG in reproductive protocols as a luteotropic agent (RAJAMAHENDRAN and SIANANGAMA, 1992). Based on that, treatment with hCG seven days after AI could be used to produce accessory CLs, an increase the concentration of P4 in blood plasma and, therefore, reducing the incidence of early embryonic mortality in cattle, which confirm the effectiveness of using hCG as a management tool for luteotropic purposes and improving pregnancy rates (RAJAMAHENDRAN and SIANANGAMA, 1992).

Prata, et al., (2018) reported that treatment with different doses of hCG on D8 of the FTAI protocol does not produce similar effects to eCG treatment in terms of final follicular growth support and resulting in a larger ovulatory follicle.

In addition, premature ovulation occurred when used in higher doses than 200UI were used. Souza et al., (2019) revealed that the use of hCG at doses lower than 150UI do not altered ovulation time and produced a similar effect of eCG in relation to follicular growth rates and CL development after removal of the intravaginal device slow P4 release, demonstrating that both treatments promote good fertility rates, compared to cows that did not receive any kind of gonadotropic stimulation.

The EB (VYNCKIER, et al., (1990) and $17\beta E_2$ (BÓ, et al., 1994; BÓ, et al., 1995) are estrogens with short half-life, therefore, they allow a rapid increase in plasma estradiol levels and induce the emergence of the follicular growth wave in a synchronized way, unlike the other E_2 esters. Based on this, the EB and the $17\beta E_2$ were used in this project. In addition, premature ovulation rates occurred in a similar way in animals treated with both gonadotropins, with no statistical relevance that linked them to hCG metabolism.

Studies by Gimenes, et al., (2008), Lamb, et al., (2001), Vasconcellos, et al., (2001) demonstrate that the size of the ovulatory follicle can affect the FTAI pregnancy rate and is directly related to factors such as the serum concentration of E_2 , manifestation of estrus, ovulation rate and, consequently, the success in conception (PERRY et al., 2007). Also, a study by Sá Filho et al., (2010) reported the increase in the diameter of the pre-ovulatory follicle during FTAI with the administration of gonadotropins, such as eCG, thus promoting better ovulation rates and increasing in plasma concentrations of P4 during the subsequent luteal phase. This factor acts positively on early embryonic development and on maternal recognition of pregnancy (PERRY et al., 2007; BELTMAN et al., 2009). This study did not compare FTAI protocols with or without gonadotropins, but results obtained for DDF on D8.5, DDF on D10, and follicular growth rate among the experimental treatments demonstrated no differences between protocols using EB or $17\beta E_2$ and eCG or hCG.

Regarding to pregnancy rates, when animals were split by the categories of the variables that could influence it, such as: breeding season, estrogens, gonadotropins, CL on D0, BSC, category, bull, and presence of ovulation at the time of AI, influence of category, BSC and D10cat was found in the results of

pregnancy. Effect of estrogens, category, and CL on D0 was found for DDF on D8.5, category and CL on D0 for DDF on D10 and none influence in the results of pregnancy was found in dominant follicle growth rate from D8.5 to D10. Oliveira, et al., (2018) reported that females that have CL at the beginning of the breeding season have higher pregnancy rates compared to acyclic females.

Effect of the estrogen treatment was found on dominant follicle diameter on D8.5. The same effect was not detected on D10. Perry et al. (2007) reported that success in establishing pregnancy in beef cows submitted to FTAI does not only depend on the diameter of the ovulatory follicle but is also conditioned by the physiological maturity of the ovulated oocyte.

Therefore, the hormonal protocols tested in this study using different combinations of estrogens and gonadotropins resulted in similar reproductive efficiency when used for estrus synchronization and ovulation induction in Nelore bovine females submitted to FTAI.

REFERENCES

- ABREU, F.M.; CRUPPE, L.H.; MAQUIVAR, M.; UTT, M.D.; MADSEN, C.A.; VASCONCELOS, J.L.M. et al. Effect of follicle age on conception rate in beef heifers¹. **J Anim Sci.** v.92, p.1022-1028, 2014.
- BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA, E.H.; MARQUES, M.O. Programas de inseminación artificial a tiempo fijo en Bos indicus. **Taurus.** v.12, n.3, p.15-25, 2001.
- BARUSELLI, P.S.; SALES, J.N.S.; SALA, R.V.; VIEIRA, L.M.; SÁ FILHO, M.F. History, evolution, and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Animal Reproduction.** v.9, p.139-152, 2012.
- BARUSELLI, P.S.; FERREIRA, R.M.; SÁ FILHO, M.F.; BÓ, G.A. Review: Using artificial insemination v. natural service in beef herds. **Animal,** v.12, p.45-52, 2018.
- BELTMAN, M.E.; LONERGAN, P.; DISKIN, M.G.; ROCHE, J.F.; CROWE, M.A. Effect of progesterone supplementation in the first week post conception on embryo survival in beef heifers. **Theriogenology.** v.71, n.7, p.1173-1179, 2009.
- BERETA, V.; LOBATO, J.F.P. Sistema “um ano” de produção de carne: avaliação de estratégias alternativas de alimentação hiberna de novilhas de reposição. **Revista Brasileira de Zootecnia.** v.27, n.1, p.157-163, 1998.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; TRIBULO, H.E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R.J. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology.** v.41, p.1555–1569, 1994.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; CACCIA, M.; MARTÍNEZ, M.F.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Anim. Reprod. Sci.** v.39, p.193–204, 1995b.
- BO, G.A.; BERGFELT, D.R.; BROGLIATTI, G.M.; PIERSON, R.A.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J. Local versus systemic effects of exogenous estradiol-

17b on ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen implants. **Anim Reprod Sci.** v.59, p.141-157, 2000.

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRÍBULO, R.; TRÍBULO, H.; MAPLETOFT, R.J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology.** v.57, p.53-72, 2002.

BURKE, C.R.; DAY, M.L.; BUNT, C.R.; MACMILLAN, K.L. 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, p.145-151, 2000.

BUTTREY, B.S.; BURNS, M.G.; STEVENSON, J.S. Ovulation and pregnancy outcomes in response to human chorionic gonadotropin before resynchronized ovulation and pregnancy in dairy cattle. **Theriogenology.** v.73, p.449-59, 2010.

CASTRO, F.C.; FERNANDES, H.; LEAL, C.L.V. Sistemas de manejo para maximização da eficiência reprodutiva em bovinos de corte nos trópicos. **Veterinária e Zootecnia.** v.25, n.1, p.041-061, 2018.

CATUSSI, B.L.C.; FERREIRA, R.M.; GONÇALVES, R.L.; LOLLATO, J.P.M.; PAVOSKI, C.; LOUREIRO, A.T.; MINGOTI, R.D.; BARUSELLI, P.S. **Treatment with eCG improves follicular growth, estrus expression, ovulation rate and pregnancy per AI in Nelore primiparous cows subjected to TAI.** 'Anais da XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões', 15. (Florianópolis), 2018.

DE RENSIS, F.; VALENTINI, R.; GORRIERI, F.; BOTTARELLI, E.; LOPEZ-GATIUS, F. Inducing ovulation with hCG improves the fertility of dairy cows during the warm season. **Theriogenology.** v.69, p.1077-1082, 2008.

FRICKE, P.M.; REYNOLDS, L.P.; REDMER, D.A. Effect of human chorionic gonadotropin administered early in the estrous cycle on ovulation and subsequent luteal function in cows. **Journal of Animal Science.** v.71, n.5, p.1242-1246, 1993.

GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; CARVALHO, N.A.; TORRES-JUNIOR, J.R.; SOUZA, A.H.; MADUREIRA, E.H. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**. v.69, n.7, p.852-858, 2008.

IRLANDA, J.J.; ROCHE, J.F. Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotropin receptors. **Endocrinology**. v.111, n.6, p.2077-2086, 1982.

IRLANDA, J.J.; ROCHE, J.F. Growth and differentiation of large antral follicles after spontaneous luteolysis in heifers: changes in concentration of hormones in follicular fluid and specific binding of gonadotropins to follicles. **Journal of Animal Science**. v.57, p.157-167, 1983.

KESKIN, A.; YILMAZBAS-MECITOGLU, G.; GUMEN, A.; KARAKAYA, E.; DARICI, R.; OKUT, H. Effect of hCG vs. GnRH at the beginning of the Ovsynch on first ovulation and conception rates in cyclic lactating dairy cows. **Theriogenology** v.74, n.4, p.602-607, 2010.

LAMB, G.C.; STEVENSON, J.S.; KESLER, D.J.; GARVERICK, H.A.; BROWN, D.R.; SALFEN, B.E. Inclusion of an intra- vaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F2 alpha for ovulation control in postpartum suckled beef cows. **Journal of Animal Science**. v.79, n.9, p.2253-2259, 2001.

LAMB, G.C.; MERCADANTE, V.R.G. Synchronization and artificial insemination strategies in beef cattle. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**. v.32, p.335-334, 2016.

LARSON, L.L.; BALL, P.J.H. Regulation of estrus cycle in dairy cattle: a review. **Theriogenology**. v.38, p.255-267, 1992.

LIMA, F.S.; VRIES, A.D.E.; RISCO, C.A.; SANTOS, J.E.P.; THATCHER, W.W. Economic comparison of natural service and timed artificial insemination breeding programs in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. v.93, p.4404-4413, 2010.

LIMA ACN, PEREIRA ETN, ALMEIDA IC, XAVIER ED, OLIVEIRA DCF, ALMEIDA AC. Reproductive disorders and reconception of beef cows subjected

to timed artificial insemination Veterinary Medicine, **Ciência Animal Brasileira**. v.23, 2022.

MACMILLAN KL, COLSON DD, EAGLES VM. Modifications to improve whole herd synchrony programs in seasonal dairy herds. 'Proceedings of the Australian Association of Cattle Veterinarians'. (Hobart), p.121–129, 1999.

MALAFAIA, G.C.; AZEVEDO, D.B.; PEREIRA, M.A.A Sustentabilidade na Cadeia Produtiva da Pecuária de Corte Brasileira. 'In: Gestão Estratégica da Sustentabilidade'. 63–81. (EMBRAPA), 2019.

MARTÍNEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; BO, G.A.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R.J. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. **Anim Reprod Sci**. v.86, p.37-52, 2005.

MENEGHETTI, M.; FILHO, O.G.S.; PERES, R.F.; LAMB, G.C.; VASCONCELOS, J.L. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: basis for development of protocols. **Theriogenology**; v.72, p.179-189, 2009.

MURPHY DB, MARTINUK SD. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrine Reviews**. v.12, n.1, p.27-44, 1991.

NASCIMENTO, A.B.; BENDER, R.W.; SOUZA, A.H.; AYRES, H.; ARAUJO, R.R.; GUENTHER, J.N.; SARTORI, R.; WILTBANK, M.C. Effect of treatment with human chorionic gonadotropin on day 5 after timed artificial insemination on fertility of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.96, p.2873-2882, 2013

OLIVEIRA, V.S.A.; BONATO, G. L.; SANTOS, R. M. Eficiência reprodutiva de vacas primíparas da raça Nelore. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.2, p.963, 2011.

OLIVEIRA, R.B.; SILVA JUNIOR, B.A.; CAVALCANTI, T.H.C. Indução de novilhas para protocolo de inseminação artificial em tempo fixo: Revisão. **Pub Vet**. v.12, n.11, p.1-8, 2018.

PERRY, G.A.; SMITH, M.F.; ROBERTS, A.J.; MACNEIL, M.D.; GEARY, T.W. Relationship between size of ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. **Journal of Animal Science**. v.85, n.3, p.684-689, 2007.

PESSOA, G.A.; MARTINI, A.P.; CARLOTO, G.W.; RODRIGUES, M.C.C.; CLARO JÚNIOR, I.; BARUSELLI, P.S. Different doses of equine chorionic gonadotropin on ovarian follicular growth and pregnancy rate of suckled *Bos taurus* beef cows subjected to timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v.73, p.651-658, 2010.

PORTO FILHO, R.M. **Sincronização da ovulação para a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) durante a estação reprodutiva desfavorável em fêmeas bubalinas**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2004.

PRATA, A.B.; DRUM, J.N.; MELO, L.F.; ARAUJO, E.R.; SARTORI, R. Effect of different chorionic gonadotropins on final growth of the dominant follicle in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**. v.111, n.15, p.52-55, 2018

RAJAMAHENDRAN, R.; SIANANGAMA, P.C. Effect of human chorionic gonadotrophin (hCG) on dominant follicles in cows: accessory corpus luteum formation, progesterone production and pregnancy rate. **J Reprod Fertil**, v.95, p.577–584, 1992.

ROCHA, C.C.; MARTINS, T.; MELLO, B.P.; MELLO, G.D.; MOTTA, I.G.; LEMES, K.M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E.H.; PUGLIESI, G. Comparing the effect of estradiol benzoate and 17 β -estradiol plus progesterone on follicular turnover and development, and pregnancy outcomes in a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**. v.192, p.73-80, 2022.

SÁ FILHO, M.F.; AYRES, H.; FERREIRA, R.M.; MARQUES, M.O.; REIS, E.L. SILVA, R.C. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. **Theriogenology**. v.73, p.651-658, 2010.

SÁ FILHO, M.F.; TORRES-JUNIOR, J.R.; PENTEADO, L.; GIMENES, L.U.; FERREIRA, R.M.; AYRES, H. Equine chorionic gonadotropin improves the

efficacy of a progestin-based-fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (Bos indicus) heifers. **Anim Reprod Sci**, v.119, p.182-187, 2010.

SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A.; GIROTTO, R.W.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. **Anim Reprod Sci**. v.124, p.12-18, 2011.

SOUMANO, K.L.; CHRISTOPHER, J.P. Levels of messenger RNA encoding ovarian receptors for FSH and LH in cattle during superovulation with equine chorionic gonadotrophin versus FSH. **The Journal of endocrinology**. v.156, p.373-378, 1998.

SOUZA, A.; VALENZA, A.; CARNEIRO, T.; ZANATTA, G.; MINGOTI, T.; SILVA, L.; BATISTA, E.; BARUSELLI, P. **A low dose of hCG (150IU) associated to inducing ovulation with estradiol benzoate can successfully replace eCG in time AI protocols in Nelore cows**. 'Anais da XXXIII Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões' (Ilha de Comandatuba), 560, 2019.

STEVENSON, J.S.; PORTALUPPI, M.A.; TENHOUSE, D.E.; LLOYD, A.; EBORN, D.R.; KACUBA, S.; DEJARNETTE, J.M. Interventions After Artificial Insemination: Conception Rates, Pregnancy Survival, and Ovarian Responses to Gonadotropin-Releasing Hormone, Human Chorionic Gonadotropin, and Progesterone. **Journal of Dairy Science**. v.90, p.331-340, 2007.

STEVENSON, J.; TIFFANY, S.; INSKEEP, E. Maintenance of Pregnancy in Dairy Cattle After Treatment with Human Chorionic Gonadotropin or Gonadotropin-Releasing Hormone. **Journal of Dairy Science**. v.91, n.8, p.3092-3101, 2008.

VASCONCELLOS, J.L.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H.N.; GUENTHER, J.G.; WILTBANK, M.C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**. v.56, n.2, p.307-331, 2001.

VYNCKIER, L.; DEBACKERE, M.; KRUIF, A.; CORYN, M. Plasma estradiol-17 β concentrations in the cow during induced estrus and after injection of estradiol-

17 β benzoate and estradiol-17 β cypionate-a preliminary study. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**. v.13, n.1, p.36-42, 1990.

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

CAPÍTULO 3

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O presente estudo não demonstrou a presença de diferença estatística em relação às taxas de prenhez obtidas entre os diferentes estrogênios testados, demonstrando que tanto o BE quanto o $17\beta E_2$ podem atuar de maneira eficiente na sincronização da emergência de uma nova onda folicular em fêmeas bovinas da raça Nelore submetidas à IATF.
- O presente estudo não demonstrou a presença de diferença estatística em relação às taxas de prenhez obtidas entre as diferentes gonadotrofinas testadas, demonstrando que tanto a eCG quanto a hCG podem atuar de maneira eficiente na indução da ovulação em fêmeas bovinas da raça Nelore submetidas à IATF.
- O presente estudo não demonstrou interação entre a associação dos diferentes estrogênios e gonadotrofinas em relação às taxas de prenhez obtidas, demonstrando que os estrogênios e gonadotrofinas testados neste experimento podem atuar de maneira eficiente na sincronização do estro e indução da ovulação de fêmeas bovinas da raça Nelore submetidas à IATF, independente da associação de escolha.
- Pode-se concluir, portanto, que os protocolos hormonais testados neste estudo utilizando diferentes combinações de estrógenos e gonadotrofinas resultam em uma boa eficiência reprodutiva, além de atuarem de forma semelhante quando utilizados para sincronização do estro e indução da ovulação em fêmeas bovinas da raça Nelore submetidas à IATF. Entretanto, mais estudos são necessários para que haja uma melhor compreensão da ação biológica destas associações, a fim de comprovar a sua eficácia de forma segura, para esta finalidade.