



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



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

NATHÁLIA ALBANEZE ANACHE

Campo Grande – MS
2023

NATHÁLIA ALBANEZE ANACHE

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

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

NATHALIA ALBANEZE ANACHE

Orientador: Ériklis Nogueira

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

Campo Grande – MS
2023

Sumário

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

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Delineamento experimental.....	31
Figura 2. Taxa de ovulação e taxa de prenhez (%), com uso de diferentes doses de hCG no momento da IATF e diferentes ESCT.....	33
Figura 3. Diâmetro do corpo lúteo (cm ³) 7 dias após a inseminação e aplicação de diferentes doses de hCG no momento da IATF e em diferentes ESCT.....	33
Figura 4. Delineamento experimental.....	48
Figura 5. Taxa de prenhez (%) de acordo com o uso de diferentes indutores adicionais de ovulação no momento da IATF e diferentes ESCT.....	49
Figura 6. Distribuição dos animais por grupo experimental (%) de acordo com o uso de diferentes indutores adicionais de ovulação no momento da IATF e diferentes ESCT.....	50

LISTA DE TABELAS

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

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

1 RESUMO

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

7
8 Apesar dos evidentes avanços na produção de gado de corte, conferidos pelo
9 desenvolvimento comercial da IATF, há diversos fatores intrínsecos ou extrínsecos
10 ao animal que interferem nos resultados de prenhez, destacando-se aqueles
11 inerentes à fêmea, como o anestro pós-parto e a condição corporal durante a
12 estação de monta. Sabe-se que vacas que não apresentam cio durante o protocolo
13 tendem a ter menor taxa de ovulação e, conseqüentemente, menor probabilidade
14 de emprenhar. Assim, esse trabalho avaliou estratégias para melhora nas taxas de
15 prenhez de vacas de corte, submetidas a protocolos de IATF com avaliações
16 simples de cio (ESCT), dinâmica folicular e aplicação de dois diferentes indutores
17 adicionais de ovulação (GnRH e hCG). Primeiramente foram testadas diferentes
18 doses de hCG para verificar qual teria maior eficácia. Foram avaliadas 45 fêmeas
19 da raça Nelore, submetidas ao protocolo de IATF. Os animais que apresentaram
20 pouco ou nenhum cio (ESCT 2 e 1, respectivamente) foram divididos em três
21 grupos, no dia da inseminação: controle (n=11): 1 ml de, I.M., de solução fisiológica,
22 grupo 500 UI (n=12): aplicação de 500 UI, I.M. de hCG e grupo 1000 UI (n=12):
23 aplicação de 1000 UI, I.M. de hCG. As vacas que apresentaram ESCT 3 (n=10)
24 foram inseminadas no mesmo momento, sem aplicação de tratamento adicional.
25 Após 7 dias da IATF foi avaliada a atividade ovariana por ultrassonografia transretal
26 para avaliar o momento da ovulação (tempo médio e taxa de ovulação) e área de
27 CL (cm³). O diagnóstico de gestação foi em torno de 30 dias após a IATF. Não
28 houve diferença estatística entre os grupos, exceto para o tempo médio de
29 ovulação, menor no grupo ESCT 3. Posteriormente, foram avaliadas 2.315 fêmeas
30 zebuínas lactantes e da mesma forma, os animais ESCT 2 e 1 foram divididos em
31 três grupos, no dia da inseminação: controle (n=301): não receberam nenhum

32 tratamento, GnRH (n=265): aplicação de 0,1 mg, I.M. de análogo agonista de GnRH
33 (Gonadorelina) e hCG (n=267): aplicação de 1000 UI, I.M. de hCG. As vacas ESCT
34 3 (n= 1483) foram inseminadas no mesmo momento, sem aplicação de tratamento
35 adicional. Foi realizado diagnóstico de gestação em torno de 35 dias após a IATF.
36 Não houve diferença estatística ($P < 0,001$) entre os grupos GnRH (48,3%) e hCG
37 (53,05%), sendo ambos eficazes na indução da ovulação em animais ESCT 1 e 2,
38 aumentando as taxas de prenhez.

39

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

41 **ABSTRACT**

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

46

47 Despite the evident advances in the production of beef cattle, conferred by the
48 commercial development of the IATF, the expected average pregnancy rate is
49 estimated between 40 and 50%, and several factors may be related to these indices,
50 highlighting those inherent to the female, such as postpartum anestrus and body
51 condition. Brazilian producers generally inseminate all cows, regardless of whether
52 the cow expresses estrus, even with studies indicating that estrus expression near
53 FTAI is associated with greater fertility. Thus, this work evaluated strategies for
54 improving pregnancy rates of beef cows, submitted to FTAI protocols with simple
55 estrus evaluations (ESCT), follicular dynamics and application of two different
56 additional ovulation inducers (GnRH and hCG). First, different doses of hCG were
57 tested to see which would be more effective. Nellore females (n=45) were submitted
58 to the FTAI protocol. The animals that showed little or no heat (ESCT 2 and 1,
59 respectively) were divided into three groups on the day of insemination: control
60 (n=11): 1 ml of, I.M., regulatory solution, group 500 IU (n= 12): application of 500
61 IU, I.M. of hCG and 1000 IU group (n=12): application of 1000 IU, I.M. of hCG. Cows
62 that showed ESCT 3 (n=10) were inseminated at the same time, without the
63 application of additional treatment. After 07 days of FTAI, follicular dynamics was
64 evaluated by transrectal ultrasonography to assess the time of ovulation (mean time
65 and ovulation rate) and CL area (cm³). The pregnancy diagnosis was around 30
66 days after FTAI. There was no statistical difference between the groups, except for
67 the mean ovulation time, which was lower in the ESCT 3 group. After, 2.315 Nellore
68 females were evaluated and, in the same way, ESCT 2 and 1 animals were divided
69 into three groups, on the day of insemination: control (n=301): did not receive any
70 treatment, GnRH (n=265): application of 0.1 mg, I.M. of Gonadorelin and hCG
71 (n=267): application of 1000 IU, I.M. of hCG. ESCT 3 cows (n= 1483) were

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

79

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

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

1. INTRODUÇÃO GERAL

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

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

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

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

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

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

119 O GnRH, usado como indutor da ovulação, induz uma onda de LH
120 semelhante a pré-ovulatória em 2 horas e a ovulação entre 26 e 30 horas,
121 respectivamente, e sua utilização na IATF, em fêmeas com baixa ou sem expressão
122 de cio, melhora a sincronização da ovulação e taxas de prenhez (SÁ FILHO et al.,
123 2010; RODRIGUES et al., 2019).

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

129 Alguns trabalhos que testaram a utilização do hCG como indutor de ovulação
130 no início do protocolo de IATF, obtiveram efeitos semelhantes ao GnRH (BURNS
131 et al., 2008; BUTTREY et al., 2010; LIU et al., 2019), além de terem efeito no
132 aumento dos níveis de progesterona plasmática, redução das perdas embrionárias
133 iniciais e assim, melhora da fertilidade (DE RENSIS et al., 2008; WALLACE et al.,
134 2011).

135 Outro ponto chave para obter bons resultados na IATF e melhorar a taxa de
136 prenhez é a qualidade do sêmen que será utilizado no protocolo (NOGUEIRA et al.,
137 2011; NOGUEIRA et al., 2014), fato que acaba limitando alguns resultados pela
138 falta de preditores precisos de fertilidade em touros (BERRY et al., 2014). No Brasil,
139 atualmente a maioria das metodologias de avaliação de sêmen de touros, baseadas
140 em microscopia, classifica somente características exteriores nos
141 espermatozoides, que garantem o alcance de padrões mínimos de qualidade
142 reprodutiva (MANUAL CBRA, 2013).

143

144 **2. OBJETIVO GERAL**

145

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

148

149 **2.1. Objetivos específicos**

150

151 1. Avaliar a eficácia da utilização de diferentes concentrações de hCG no
152 momento da IATF em vacas que não expressaram cio.

153 2. Analisar a estratégia da utilização da avaliação de expressão de cio (ESCT),
154 com diferentes indutores de ovulação para aumento de prenhez de IATF;

155 3. Determinar a influência da aplicação de análogo de GnRH e hCG sobre a
156 taxa de prenhez em vacas zebuínas lactantes que não expressaram cio quando
157 submetidas a IATF.

158

159 **3. REVISÃO DE LITERATURA**

160

161 **3.1. Ciclo Estral**

162 O ciclo estral dos bovinos dura, em média, 21 dias e divide-se em uma fase
163 folicular (proestro e estro) e outra luteínica (metaestro e diestro), apresentando, em
164 média, duas a três ondas de crescimento folicular (GINTHER et al., 1989; KANITZ,
165 2003).

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

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

174 1992). Entretanto, somente um (ou dois) folículo dominante adquire capacidade
175 ovulatória, enquanto os outros (subordinados) entram em um processo de atresia
176 (SARTORI et al., 2001; KANITZ, 2003).

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

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

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

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

199

200 **3.2. Detecção do estro**

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

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

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

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

224

225 **3.3. Dinâmica folicular**

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

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

236 possui três ondas, é seguida por mais uma onda folicular aos 16 dias (LUCY et al.,
237 1992; CAMPBELL et al., 1995).

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

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

250 A duração do ciclo estral é de aproximadamente 20 dias em ciclos de 2
251 ondas e 23 dias em ciclos de 3 ondas (KASTELIC et al., 1990). O folículo ovulatório
252 tem origem na onda final e alguns estudos mostraram relação entre taxa de
253 concepção e o momento que o folículo ovulatório se origina, quando oriundo da
254 terceira onda teve uma taxa de concepção maior do que quando se originou da
255 segunda onda folicular do ciclo estral (TOWNSON et al., 2002). Todavia, outros
256 estudos mostraram que o padrão da onda folicular não teve relação com fertilidade
257 e taxa de prenhez tanto e bovinos de corte como de leite (COLAZO E MAPLETOFT,
258 2017).

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

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

268 Já dentre aqueles que conseguiram crescer, passam para o período de
269 dominância e começam a desenvolver receptores do hormônio LH (ADAMS et al.,
270 1993). O recrutamento folicular é inibido após a seleção de um folículo dominante
271 e só é retomado quando a dominância é encerrada, seja por conta da ovulação ou
272 por atresia (PERRY, 2017).

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

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

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

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

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

300

301 **3.4. Indutores de ovulação**

302

303 **3.4.1 Hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH)**

304

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

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

316

317 **3.4.2 Gonadotrofina coriônica humana (hCG)**

318

319 A gonadotrofina coriônica humana pertence à família dos hormônios
320 glicoproteicos, que também inclui o hormônio luteinizante (LH), o hormônio folículo-
321 estimulante (FSH) e o hormônio estimulante da tireoide (TSH) (STENMAN et al.,
322 2006). É muito utilizado devido a sua atividade semelhante ao LH, porém com ação
323 mais prolongada.

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

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

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

336 Além de induzir a maturação de folículos e a ovulação, quando administrada
337 durante o diestro, na presença de folículos pré-ovulatórios, a hCG pode induzir a
338 formação de corpos lúteos acessórios, prolongando o ciclo estral (DIAZ et al.,
339 1998).

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359 **4. Referências bibliográficas**

360

361 ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P. et al. Association between surges
362 of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers.
363 **Journal of Reproduction Fertility**. 94:177-188, 1992.

364 ALRICH, R.D. Endocrine and neural control of estrus in dairy cows. **Journal of**
365 **Dairy Science** 77, 2738–2744, 1994.

366 AOKI, M.; KIMURA, K.; SUZUKI, O. Predicting time of parturition from changing
367 vaginal temperature measured by data-logging apparatus in beef cows with twin
368 fetuses. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 86, n. 1-2, p. 1-12, 2005.

369 BARUSELLI, P.; SALES, J.; SALA, R. et al. History, evolution and perspectives of
370 timed artificial insemination programs in Brazil. **Animal Reproduction**, v.9, p.139-
371 152, 2012.

372 BARUSELLI, P.S.; FERREIRA, R.M.; COLLI, M.H.A. et al. Timed artificial
373 insemination: current challenges and recent advances in reproductive efficiency in
374 beef and dairy herds in Brazil. **Animal Reproduction**. V.14, p.558–571, 2017.

375 BARUSELLI, P.S.; FERREIRA, R.M.; SÁ FILHO, M.F. et al. Review: Using artificial
376 insemination v. natural service in beef herds. **Animal**. V.12, p.45-52, 2018.

377 BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O. et al. The use of hormonal
378 treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical
379 climates. **Animal Reproduction Science**. V.82-83, p.479-486, 2004.

380 BERRY, D.P.; WALL, E.; PRYCE, J. E. Genetics and genomics of reproductive
381 performance in dairy and beef cattle. **Animal**. V.8, p.105-21, 2014.

382 BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTINEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular
383 development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, 78:307-326,
384 2003.

385 BÓ, G.A.; DE LA MATA, J.J.; BARUSELLI, P.S. et al. Alternative programs for
386 synchronizing and re-synchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology*, v.86,
387 p.388- 396, 2016.

388 BURFEIND, O; SUTHAR, V.S.; VOIGTSBERGER R. et al. Validity of prepartum
389 changes in vaginal and rectal temperature to predict calving in dairy cows. **Journal**
390 **of Dairy Science**. Champaign, v. 94, n. 10, p. 5053–5061, 2011.

391 BURNS, M.G.; BUTTREY, B.S.; DOBBINS, C.A. et al. Evaluation of human
392 chorionic gonadotropin as a replacement for gonadotropin-releasing hormone in
393 ovulation-synchronization protocols before fixed timed artificial insemination in beef
394 cattle. **Journal Animal Science**. V.86(10), p.2539-2548, 2008.

- 395 CAMPBELL, B.K.; SCARAMUZZI, R.J.; WEBB, R. Control of antral follicle
396 development and selection in sheep and cattle. **Journal Reproduction Fertility**.
397 49(suppl):335-350, 1995.
- 398 COLAGAR, A.H.; MARZONY, E.T.; CHAICHI, M.J. Os níveis de zinco no plasma
399 seminal estão associados à qualidade espermática em homens férteis e inférteis.
400 **Nutrition Research**. V.29, p.82-88, 2009.
- 401 COLAZO, M.G.; MAPLETOFT, R.J. Pregnancy per AI in Holstein heifers
402 inseminated with sex-selected or conventional semen after estrus detection or
403 timed-AI. **Canadian Veterinary Journal**. Apr;58(4):365-370, 2017.
- 404 COLAZO, M.G.; AMBROSE, D.J. Neither duration of progesterone inserts nor initial
405 GnRH treatment affected pregnancy per timed-insemination in dairy heifers
406 subjected to a Co-synch protocol. **Theriogenology**. V.76, p.578-588, 2011.
- 407 DE MEDEIROS, S.F.; NORMAN, R.J. Human choriogonadotropin protein core and
408 sugar branches heterogeneity: basic and clinical insights. **Human Reproduction**.
409 V.15, p.69e95, 2008.
- 410 DE RENSIS, F.; VALENTINI R.; GORRIERI, F. et al. Inducing ovulation with hCG
411 improves the fertility of dairy cows during the warm season. **Theriogenology**. V.69,
412 p.1077e82, 2008.
- 413 DIAZ, T.; SCHMITT, E.J.; DE LA SOTA, R.L. et al. Human chorionic gonadotropin
414 induced alterations in ovarian follicular dynamics during the estrous cycle of heifers.
415 **Journal Animal Science**. V.76, p.1929-36, 1998.
- 416 DISKIN, M.G.; MACKEY, D.R.; ROCHE, J.F. et al. Effects of nutrition and metabolic
417 status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Animal**
418 **Reproduction Science**. V.15, p.345-370, 2003.
- 419 ESTES, K.S.; PADMANABHAN, V.; CONVEY, E.M. Localization of gonadotropin
420 releasing hormone (GnRH) within the bovine hypothalamus. **Biology of**
421 **Reproduction**. V.17, p.706-11, 1977.
- 422 FARIN, C.E.; MOELLER, C.L.; MAYAN, H. et al. Effect of luteinizing hormone and
423 human chorionic gonadotropin on cell populations in the ovine corpus luteum.
424 **Biology of Reproduction**. V.38, p.413-21, 1988.
- 425 FIGUEIREDO R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L. et al. Ovarian follicular
426 dynamics in nelore breed (*Bos indicus*) cattle., **Theriogenology** 47:1489-1505,
427 1997.
- 428 FRICKE, P.; REYNOLDS, L.; REDMER, D. Effect of human chorionic gonadotropin
429 administered early in the estrous cycle on ovulation and subsequent luteal function
430 in cows. **Journal Animal Science**. V.71, p.1242e6, 1993.

- 431 GINTHER, O.J.; KASTELIC, J.P.; KNOFF, L. Composition and characteristics of
432 follicular waves during the bovine oestrous cycle. **Animal Reproduction Science**.
433 20:187-200, 1989.
- 434 GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M. et al. Selection of the dominant
435 follicle in cattle. **Biology of Reproduction**.55:1187-1194, 1996.
- 436 GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; DONADEU, F.X. et al. Mechanism of follicle deviation
437 in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**. V.78, p.239-257, 2003.
- 438 HAFEZ, E.S.E. Effects of stage of the estrus cycle on interval to estrus after
439 PGF2a in beef cattle. **Theriogenology**, v.18, n.2, P.191-200, 1982.
- 440 IRELAND, J.J.; ROCHE, J.F. Development of antral follicles in cattle after
441 prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular
442 fluid, and gonadotropin receptors. **Endocrinology**. V.111, p. 2077e2086, 1982.
- 443 KANITZ, W. Follicular dynamic and ovulation in cattle – a review. **Archives Animal**
444 **Breeding**. Dummerstorf, v. 46, n. 2, p. 187-198, 2003.
- 445 KASTELIC, J.P.; KNOFF, L.; GINTHER, O.J. Effect of day of prostaglandin
446 treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. **Animal**
447 **Reproduction Science**. 23:169-180, 1990.
- 448 KERNS, K; ZIGO, M; DROBNIS, E.Z. et al. Zinc ion flux during mammalian sperm
449 capacitation. **Nature communications**. V.9, p.2061, 2018.
- 450 KHANAL, A. R.; GILLESPIE, J.; MACDONALD, J. Adoption of technology,
451 management practices, and production systems in US milk production. **Journal of**
452 **Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 12, p. 6012–6022, 2010.
- 453 LIU, T.C.; HO, C.T.; LI, K.P. et al. Human chorionic gonadotropin (hCG)-induced
454 ovulation occurs later but with equal occurrence in lactating dairy cows: comparing
455 hCG and gonadotropin-releasing hormone protocols. **Journal of Reproduction**
456 **and Development**. V.65(6), p.507-514, 2019.
- 457 LUCY, M.C.; SAVIO, J.D.; BADINGA, L. et al. Factors that affect ovarian follicular
458 dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**. 70:3615-3626, 1992.
- 459 MACDONALD, J. M. et al. Profits, costs, and the changing structure of dairy farming.
460 **Economic research report**. United States. Dept. of Agriculture. Economic
461 Research Service. No. 47, 2007.
- 462 MACMILLAN, K.L.; THATCHER, W. Effects of an agonist of gonadotropin-releasing
463 hormone on ovarian follicles in cattle. **Biology of Reproduction**. V.45, p.883-9,
464 1991.

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

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

537 2001.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

565

566

567

568

570

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

573

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

575

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

578

579 *Nathalia Albaneze Anache^a; Eriklis Nogueira^b*

580

581 ^aUniversidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e
582 Zootecnia, Av. Senador Felinto Muller 2443, 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil. E-
583 mail: nathaliaanache@hotmail.com

584 ^bEmbrapa Gado de Corte, Av. Rádio Maia, 830, 79106-550, Campo Grande, MS, Brasil. E-
585 mail: ériklis.nogueira@embrapa.br

586

587

588 **Resumo:** Apesar dos evidentes avanços na produção de gado de corte, conferidos
589 pelo desenvolvimento comercial da IATF diversos fatores, extrínsecos ou
590 intrínsecos, podem estar relacionados a esses índices, destacando-se aqueles
591 inerentes à fêmea, como o anestro pós-parto e a condição corporal no início dos
592 protocolos. Sabe-se que vacas que não apresentam cio durante o protocolo tendem
593 a ter menor taxa de ovulação e, conseqüentemente, menor probabilidade de
594 emprenhar. Assim, esse trabalho avaliou estratégias para melhora nas taxas de
595 prenhez de vacas de corte, submetidas a protocolos de IATF, com o uso do indutor
596 de ovulação hCG, em fêmeas classificadas segundo o escore de remoção de tinta
597 na cauda, sendo aplicados naquelas com baixa expressão de cio (ESCT 1 e 2) no
598 momento da inseminação, testando diferentes doses e comparando seus efeitos,
599 com acompanhamento da atividade ovariana. Foram avaliadas 45 fêmeas da raça
600 Nelore, submetidas ao protocolo de IATF. Os animais que apresentaram pouco ou
601 nenhum cio (ESCT 2 e 1, respectivamente) foram divididos em três grupos, no dia
602 da inseminação: controle (n=11): receberam 1 ml de, I.M., de solução fisiológica,
603 grupo 500 UI (n=12): receberam aplicação de 500 UI, I.M. de hCG e grupo 1000 UI
604 (n=12): receberam a aplicação de 1000 UI, I.M. de hCG. As vacas que
605 apresentaram ESCT 3 (n=10) foram inseminadas no mesmo momento, sem
606 aplicação de tratamento adicional. Após 07 dias da IATF os animais tiveram seus
607 ovários examinados por ultrassonografia transretal para avaliar o momento da
608 ovulação (tempo médio e taxa de ovulação) e área de CL (cm³). Foi realizado
609 diagnóstico de gestação em torno de 30 dias após a IATF (com ultrassonografia
610 modo B). Avaliaram-se as taxas de prenhez e ovulação dos animais para comparar
611 os efeitos das doses do hCG, bem como a área do CL e só houve diferença
612 estatística em relação ao tempo médio de ovulação, sendo os grupos Controle, 500

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

615

616 Palavras chaves: Bastão marcador, estro, protocolo hormonal.

617

618

619 **1. Introdução**

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

627 As vacas *Bos Indicus* apresentam períodos mais longos de anestro pós-
628 parto, levando a baixa expressão e detecção de estro e, conseqüentemente, baixa
629 taxa de prenhez ao final da época de criação (Baruselli et al., 2004). Para minimizar
630 os efeitos negativos da condição anovular e garantir melhores taxas de concepção
631 durante a estação reprodutiva, protocolos de sincronização da ovulação para
632 inseminação artificial em tempo fixo (IATF) à base de estradiol (E2) e progesterona
633 (P4) têm sido cada vez mais utilizados (Meneghetti et al., 2009; Sa Filho et al.,
634 2013).

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

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

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

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

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

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

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

676 O objetivo deste estudo foi determinar a dose mais efetiva de hCG em vacas
677 com baixa ou nenhuma expressão de cio, no momento da IATF, em diferentes
678 ESCT, avaliando tempo médio de ovulação, taxa de ovulação, área média do corpo
679 lúteo (cm³) e taxa de prenhez.

680

681 **2. Materiais e métodos**

682 *Animais*

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

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

691

692 *Delineamento Experimental*

693 O protocolo utilizado foi: em dia aleatório do ciclo estral (D0) receberam
694 implante intravaginal de 1mg de P4 (DIB) e administração de 2 mg de BE
695 (Estrogin®, Biofarm, São Paulo, Brasil). No D8, o implante foi retirado e receberam
696 1 mg de cipionato de estradiol (ECP®, Zoetis, Brasil), 150µg de d-cloprostenol
697 (Prolise®, Arsa, Argentina) e 300 UI de eCG (Folligon® 5000UI, MSD, São Paulo,
698 Brasil).

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

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

705

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

708

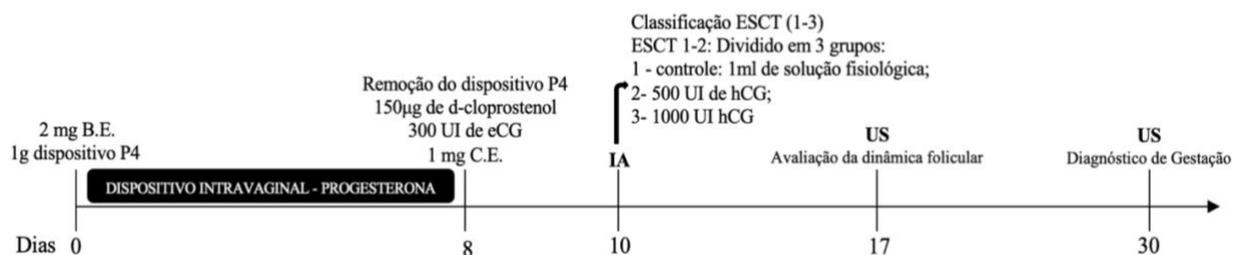
- 709 I. Controle: 11 vacas receberam a aplicação 1 ml de solução fisiológica,
710 servindo de grupo controle do experimento;
- 711 II. Tratamento 500 UI HCG (Chorulon®, MSD, Brasil): 12 vacas
712 receberam a aplicação de hCG (500 UI, I.M.);
- 713 III. 1000 UI de HCG (Chorulon®, MSD, Brasil): 12 vacas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

715

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

719 Após 7 dias da inseminação (D17), os animais tiveram seus ovários
720 examinados por ultrassonografia transretal para avaliar o momento da ovulação e
721 área de CL (cm³), usando um Mindray DP 20 Vet (Mindray Medical International
722 Limited, Shenzhen, China) com sonda linear transretal (5 a 9 MHz). Avaliação do
723 corpo lúteo no D17 também foi usado para calcular a taxa de ovulação, que foi
724 verificada pela detecção de um CL no mesmo ovário onde foi observado o folículo
725 pré-ovulatório e nenhum CL anterior no dia 10 do protocolo, de acordo com Pfeifer
726 et al. (2009 e 2015) e Dadarwal et al. (2013). O diagnóstico de gestação foi
727 realizado 30 dias após a IATF, por ultrassonografia transretal.

728



729

730 Figura 1. Delineamento experimental.

731

732 *Análise estatística*

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

739

740 **3. Resultados**

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

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

749 Em relação as taxas de prenhez, avaliadas 30 dias após a inseminação,
750 também não houve diferença estatística entre os grupos testados, controle e ESCT
751 3 (Figura 2). O Escore de condição corporal (ECC) dos animais teve efeito na taxa
752 de prenhez ($P > 0,01$), porém não teve efeito nos tratamentos.

753

754 Tabela 1. Tempo médio de ovulação, taxa de ovulação (%), diâmetro do CL (cm³)
755 e Taxa de prenhez (%), com uso de diferentes doses de hCG no momento da IATF
756 e diferentes ESCT.

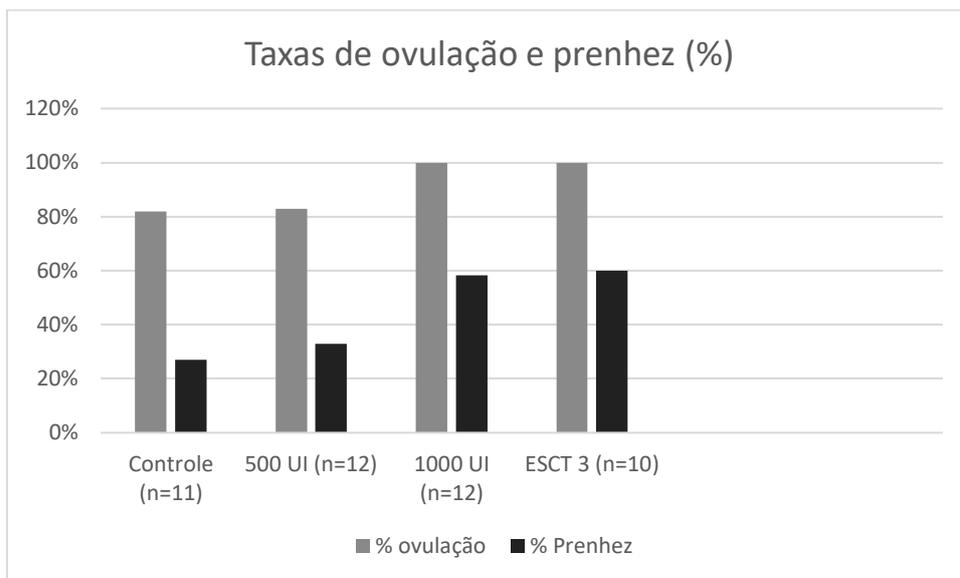
TRATAMENTO	ESCT 1 e 2			ESCT 3	P
	Controle (n=11)	500 UI (n=12)	1000UI (n=12)	<u>ESCT3</u> (n=10)	
Tempo médio de ovulação (h)	80:06 ^a	75:25 ^a	75:49 ^a	67:07 ^b	0.0028
Taxa de ovulação	82%	83%	100%	100%	0.9997

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

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

758

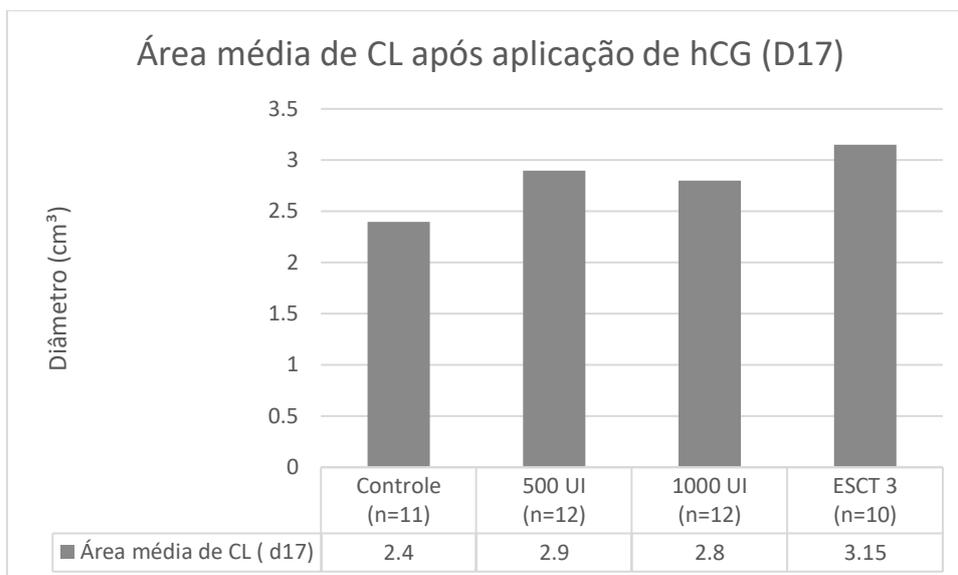
759



760

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

763



764

765 Figura 3. Diâmetro do corpo lúteo (cm³) 7 dias após a inseminação e aplicação de
766 diferentes doses de hCG no momento da IATF e diferentes ESCT.

767

768 4. Discussão

769 Este estudo testou qual a dose mais efetiva de hCG para aplicação no
770 momento da IATF em vacas zebuínas lactantes que expressaram baixa ou
771 nenhuma expressão de cio (ESCT 1-2), avaliando os seus efeitos na ovulação, área
772 média do corpo lúteo (cm³) e na taxa de prenhez. O hCG até então não havia sido
773 utilizado no momento da inseminação, apenas sido testado no início (D0) e meio
774 (D8) do protocolo ou após a inseminação ou transferência de embrião.

775 A gonadotrofina coriônica humana pertence a família dos hormônios
776 glicoproteicos, que também inclui o hormônio luteinizante (LH), o hormônio folículo-
777 estimulante (FSH) e o hormônio estimulante da tireoide (TSH) (Stenman et al.,
778 2006). É utilizada em animais domésticos devido seu efeito semelhante ao LH, se
779 ligando aos receptores de LH nas células da granulosa e da teca dos folículos
780 ovarianos com alta afinidade (Ireland & Roche, 1983).

781 Ele tem sido usado para induzir a ovulação em protocolos de IATF ou para
782 formar o CL acessório após inseminação (Fricke et al., 1993; Nascimento et al.,
783 2013). Além disso, tem efeito no aumento dos níveis de progesterona plasmático,
784 redução das perdas embrionárias iniciais e assim, melhora da fertilidade (De Rensis
785 et al., 2008; Wallace et al., 2011). Também age modificando a dinâmica das ondas

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

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

793 A taxa de prenhez, também não diferiu entre os grupos controle, 500 UI,
794 1000 UI e ESCT 3, apenas sendo numericamente maior nos animais que
795 responderam ao protocolo sugerindo que o ambiente hormonal que produz a falta
796 de expressão de estro também produz alterações uterinas ligadas à fertilidade
797 (Pereira et al., 2016; Richardson et al., 2016).

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

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

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

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

817 efeitos do GnRH e hCG ao final do protocolo, utilizou hCG nas concentrações de
818 1000 UI e 3000 UI, sendo esta última dosagem a que resultou em melhor dinâmica
819 folicular e melhores resultados (Garcia-Ispierto et al., 2019).

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

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

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

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

840 Neste estudo não identificamos diferenças na área de CL no grupo ESCT 3,
841 mas estudos mostram que o CL induzido por hCG se comporta de maneira diferente
842 do CL induzido espontaneamente quanto a sua regressão pela PGF₂, sendo
843 induzido a regredir antes do quinto dia de vida útil. Também, diferia em tamanho e
844 cor do CL formado espontaneamente e produzia menos progesterona quando
845 cultivado in vitro na presença de LH (Howard & Britt, 1990; Fricke et al., 1993).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

908 Os resultados vistos nesse experimento corroboram com Nogueira et al.
909 (2016) que testaram a eficácia do uso de indutores da ovulação no aumento nas
910 taxas de prenhez, utilizando para detecção dos animais em cio os bastões
911 marcadores, mostrando correlação com o diâmetro folicular no momento da IATF,
912 bem como com a taxa de prenhez.

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

916

917 **5. Referências Bibliográficas**

918 Anache, N.A., Silva, K.C., Rodrigues, W.B., Jara, J.P., Cardoso, C., Nogueira, E.,
919 2018. Estrus identification methods as an alternative to optimize IATF results.
920 *Animal Reproduction*, v. 15, n. 3, p. 380, Jul./Sept. 2018. Abstract A065. Edição
921 dos Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology
922 Society (SBTE); Florianópolis, SC, Brazil, August 16th to 18th.

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

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

930 Bertan, C.M., Cesar, M.C., Pugine, S. M. P., Binelli, M., Visintin, J. A., Assumpção,
931 M.E.O.D., 2006. Induction of ovulation in cows with affinity chromatography-purified
932 Human Chorionic Gonadotropin (hCG). *Brazilian Journal of Veterinary Research
933 and Animal Science*, 43(3), 379-386. [https://doi.org/10.11606/issn.1678-
934 4456.bjvras.2006.26486](https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26486).

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

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

- 943 Buttrey, B.S., Burns, M.G., Stevenson, J.S., 2010. Ovulation and pregnancy
944 outcomes in response to human chorionic gonadotropin before resynchronized
945 ovulation in dairy cattle. *Theriogenology*. v.73, p.449-59.
946 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.09.027>.
- 947 Colazo, M.G., Ambrose, D.J., 2011. Neither duration of progesterone inserts nor
948 initial GnRH treatment affected pregnancy per timed-insemination in dairy heifers
949 subjected to a Co-synch protocol. *Theriogenology*. v.76, p.578-588.
950 <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0025>.
- 951 Cooper, D.A., Carver, D.A., Villeneuve, P., Silvia, W.J., Inskeep, E.K., 1991. Effects
952 of progestagen treatment on concentrations of prosta glandins and oxytocin in
953 plasma from the posterior vena cava of post-partum beef cows. *Journal*
954 *Reproduction Fertility*. 91:411–21. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0910411>.
- 955 De Medeiros, S.F., Norman, R.J., 2008. Human choriogonadotropin protein core
956 and sugar branches heterogeneity: basic and clinical insights. *Human*
957 *Reproduction*. v.15, p.69-95. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn036>.
- 958 De Rensis, F., Valentini, R., Gorrieri, F., Bottarelli, E., Lopez-Gatius, F., 2008.
959 Inducing ovulation with hCG improves the fertility of dairy cows during the warm
960 season. *Theriogenology*, v.69, p.1077-82.
- 961 De Rensis, F., López-Gatius, I., García-Ispuerto, M., 2010. Techakumpu, Clinical
962 use of human chorionic gonadotropin in dairy cows: An update, *Theriogenology*,
963 Volume 73, Issue 8. Pages 1001-1008.
964 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.027>.
- 965 De Rensis, F., Lopez-Gatius, F., Garcia-Ispuerto, I., Morini, G., Scaramuzzi, R.J.,
966 2017. Causes of declining fertility in dairy cows during the warm season.
967 *Theriogenology*. 91:145-53. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.12.024>.
- 968 Diaz, T., Schmitt, E.J., De La Sota, R.L., Thatcher M.J., Thatcher, W., 1998. Human
969 chorionic gonadotropin induced alterations in ovarian follicular dynamics during the
970 estrous cycle of heifers. *Journal Animal Science*, v.76, p.1929-36.
971 <https://doi.org/10.2527/1998.7671929x>.
- 972 Fricke, P., Reynolds, L., Redmer, D., 1993. Effect of human chorionic gonadotropin
973 administered early in the estrous cycle on ovulation and subsequent luteal function
974 in cows. *Journal Animal Science*. v.71, p.1242-6.
975 <https://doi.org/10.2527/1993.7151242x>.
- 976 Garcia-Ispuerto, I., De Rensis, F., Casas, X., Caballero, F., Serrano-Pérez, B.,
977 López-Gatius, F., 2019. Inducing ovulation with hCG in a five-day progesterone-
978 based fixed-time AI protocol improves the fertility of anestrous dairy cows under
979 heat stress conditions. *Theriogenology*. 124:65-68.
980 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.10.015>.

- 981 Hanlon, D.W., Jarrat, G.M., Davidson, P.J., Millar, A.J., Douglas, V.L., 2005. The
982 effect of hCG administration five days after insemination on the first service
983 conception rate of anestrous dairy cows. *Theriogenology*. 63:1938–45.
984 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.002>.
- 985 Howard, H.J., Britt, J.H., 1990. Prostaglandin F₂ causes regression of an hCG-
986 induced corpus luteum before day 5 of its life-span in cattle. *Journal Reproduction*
987 *Fertility*. 90:245–53. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0900245>.
- 988 Ireland, J.J., Roche, J.F., 1983. Growth and differentiation of large antral follicles
989 after spontaneous luteolysis in heifers: changes in concentration of hormones in
990 follicular fluid and specific binding of gonadotropins to follicles. *Journal Animal*
991 *Science*. v.57, p.157-167. <https://doi.org/10.2527/jas1983.571157x>.
- 992 Jameson, L.J., Hollenberg, A.N., 1993. Regulation of chorionic gonadotropin gene
993 expression. *Endocrine reviews*, 14(2), 203–221. [https://doi.org/10.1210/edrv-14-2-](https://doi.org/10.1210/edrv-14-2-203)
994 203.
- 995 Jónsson, R., Blanke, M., Poulsen, N.K., Caponetti, F., Hojsgaard, S., 2011. Estrus
996 detection in dairy cows from activity and lying data using on-line individual models.
997 *Computers and electronics in agriculture*. v.76, p.6-15.
998 <https://doi.org/10.1016/j.compag.2010.12.014>.
- 999 Liu, T.C., Ho, C.T., Li, K.P., Chang, C.C., Chan, J.P., 2019. Human chorionic
1000 gonadotropin (hCG)-induced ovulation occurs later but with equal occurrence in
1001 lactating dairy cows: comparing hCG and gonadotropin-releasing hormone
1002 protocols. *Journal of Reproduction and Development*. v.65(6), p.507-514.
1003 <https://doi.org/10.1262/jrd.2019-037>.
- 1004 Machado, R., Bergamaschi, M.A.C.M., Barbosa, R.T., De Oliveira, C.A., Binelli, M.,
1005 2008. Ovarian function in Nelore (*Bos Taurus indicus*) cows after post-ovulation
1006 hormonal treatment. *Theriogenology*. 69:798–804.
1007 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.10.025>.
- 1008 Maubrigades, L.R., Almeida, A.M., Lazzari, J., Ferreira, R., Gasperin, B.G.,
1009 Mondadori, R.G., 2022. Efeitos da gonadotrofina coriônica humana sobre a função
1010 do corpo lúteo bovino. *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e*
1011 *Extensão*, v. 2, n. 14.
1012 <https://periodicos.unipampa.edu.br/index.php/SIEPE/article/view/113306>.
- 1013 Meneghetti, M., Sa Filho, O.G., Peres, R.F.G., Lamb, G.C., Vasconcelos, J.L.M.,
1014 2009. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos*
1015 *indicus* cows I: basis for development of protocols. *Theriogenology*. 72:179-89.
1016 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.02.010>.
- 1017 Nascimento, A.B., Bender, R.W., Souza, A.H., Ayres, H., Araujo, R.R., Guenther,
1018 J.N., Sartori, R., Wiltbank, M.C., 2013. Effect of treatment with human chorionic
1019 gonadotropin on day 5 after timed artificial insemination on fertility of lactating dairy

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

- 1059 plus heat II: Gonadorelin injection in cows with low estrus expression scores
1060 increased pregnancy in progesterone/estradiol-based protocol. *Animal*. v.13(10),
1061 p.2313-2318. <https://doi.org/10.1017/S1751731119000454>.
- 1062 Roelofs, J.B., Graat, E.A., Mullaart, E., Soede, N.M., Voskamp-Harkema, W., Kemp,
1063 B., 2006. Effects of insemination-ovulation interval on fertilization rates and embryo
1064 characteristics in dairy cattle. *Theriogenology*. v.66(9), p.2173-2181.
1065 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.07.005>.
- 1066 Sá Filho, M.F., Ayres, H., Ferreira, R.M., Marques, M. O., Reis, E.L., Silva, R.C.,
1067 Rodrigues, C.A., Madureira, E.H., Bó, G.A., Baruselli, P.S., 2010. Equine chorionic
1068 gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a
1069 norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos*
1070 *indicus*) cows. *Theriogenology*. v.73, p.651-658.
1071 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.004>
- 1072 Santos, J.E.P., Thatcher, W.W., Pool, L., Overton, M.W., 2001. Efeito da
1073 gonadotrofina coriônica humana na função lútea e no desempenho reprodutivo de
1074 vacas leiteiras Holandesas em lactação de alta produção, *Journal of Animal*
1075 *Science*, Volume 79, Edição 11. Páginas 2881– 2894.
- 1076 Satake, N., Edwards, S.A.A., Tutt, D., McGowan, M.R., Boe-Hansen, G.B., 2017.
1077 Investigation of in vitro measurable sperm attributes and their influence on
1078 electroejaculated bull semen with a fixed-time artificial insemination protocol in
1079 Australian *Bos indicus* cattle. *Reproduction in Domestic Animals*. v.53, p.414-422.
1080 <https://doi.org/10.1111/rda.13121>.
- 1081 Silva, K.S., Borges, J.C., Abreu, U.G.P., Batista, D.S.N., Anache, N.A., Bezerra,
1082 A.O., Jara, J.P., Nogueira, E., 2016. Escore de cio avaliado com bastões
1083 marcadores influencia as taxas de gestação de vacas nelore submetidas a
1084 protocolos de inseminação artificial em tempo fixo. *Animal Reproduction*, v.13(3),
1085 p.451.
- 1086 Stenman, U.H., Tiitinen, A., Alfthan, H., Valmu, L., 2006. The classification,
1087 functions and clinical use of different isoforms of HCG. *Human Reproduction*
1088 *Update*. 12:769–84. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml029>.
- 1089 Stevenson, J.S., Tiffany, S.M., Inskeep, E.K., 2008. Maintenance of pregnancy in
1090 dairy cattle after treatment with human chorionic gonadotropin or gonadotropin-
1091 releasing hormone. *Journal of Dairy Science*. 91:3092–101.
1092 <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1027>.
- 1093 Stevenson, J.S., Portaluppi, M.A., Tenhouse, D.E., Lloyd, A., Eborn, D.R., Kacuba,
1094 S., De Jarnette, J.M., 2007. Interventions After Artificial Insemination: Conception
1095 Rates, Pregnancy Survival, and Ovarian Responses to Gonadotropin-Releasing
1096 Hormone, Human Chorionic Gonadotropin, and Progesterone. *Journal of Dairy*
1097 *Science*, 90(1), 331–340. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)72634-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72634-6).

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

1103

1104

1105

1106

1107

1108

1109

1110

1111

1112

1113

1114

1115

1116

1117

1118

1119

1120

1121

1122

1123 **CAPÍTULO 3: USO DE DIFERENTES INDUTORES DE OVULAÇÃO COM**
1124 **AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CIO (ESCT) EM PROTOCOLOS DE**
1125 **IATF.**

1126

1127 Artigo formatado nas normas do periódico: *Animal Reproduction Science*

1128

1129 **Efeito do uso de hCG e GnRH nas taxas de prenhez em protocolos de**
1130 **IATF com avaliação de expressão de cio (ESCT).**

1131

1132 *Nathalia Albaneze Anache^a; Eriklis Nogueira^b*

1133

1134 ^aUniversidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e
1135 Zootecnia, Av. Senador Felinto Muller 2443, 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil. E-
1136 mail: nathaliaanache@hotmail.com

1137 ^bEmbrapa Gado de Corte, Av. Rádio Maia, 830, 79106-550, Campo Grande, MS, Brasil. E-
1138 mail: ériklis.nogueira@embrapa.br

1139

1140

1141 **Resumo:** Apesar dos evidentes avanços na produção de gado de corte, conferidos
1142 pelo desenvolvimento comercial da IATF, a taxa de prenhez média esperada é
1143 estimada em cerca de 50%, e diversos fatores podem estar relacionados a esses
1144 índices, destacando-se aqueles inerentes à fêmea, como o anestro pós-parto e a
1145 condição corporal no início dos protocolos. Sabe-se que vacas que não apresentam
1146 cio durante o protocolo tendem a ter menor taxa de ovulação e, conseqüentemente,
1147 menor probabilidade de emprenhar. Assim, esse trabalho avaliou estratégias para
1148 melhora nas taxas de prenhez de vacas de corte, submetidas a protocolos de IATF
1149 com avaliações simples de cio (ESCT) e aplicação de dois diferentes indutores
1150 adicionais de ovulação (GnRH e hCG). Foram avaliadas 2.315 fêmeas da raça
1151 Nelore, submetidas ao protocolo de IATF. Os animais que apresentaram pouco ou
1152 nenhum cio (ESCT 2 e 1, respectivamente) foram divididos em três grupos, no dia
1153 da inseminação: controle (n=301): não receberam nenhum tratamento, tratamento
1154 GnRH (n=265): receberam aplicação de 0,1 mg, I.M. de Gonadorelina e tratamento
1155 hCG (n=267): receberam a aplicação de 1000 UI, I.M. de hCG. As vacas que
1156 apresentaram ESCT 3 (n= 1483) foram inseminadas no mesmo momento, sem
1157 aplicação de tratamento adicional. Foi realizado diagnóstico de gestação em torno
1158 de 30 dias após a IATF (com ultrassonografia modo B). Avaliaram-se as taxas de
1159 prenhez dos animais para comparar os efeitos dos indutores da ovulação e não
1160 houve diferença estatística (P<0,001) entre os grupos GnRH (48,3%) e hCG
1161 (53,05%), sendo ambos eficazes na indução da ovulação em animais que deram
1162 pouco ou nenhum cio (ESCT 1 e 2), aumentando as taxas de prenhez quando
1163 comparado ao grupo controle.

1164 Palavras chaves: Bastão marcador, dinâmica folicular, indutor de ovulação.

1165

1166 **1. Introdução**

1167 A incorporação de programas reprodutivos ajuda a otimizar os resultados e
1168 rentabilidade dos rebanhos, assim, a Inseminação artificial (IA), bem como a
1169 inseminação artificial em tempo fixo (IATF), permitem maior ganho genético e
1170 econômico (Baruselli et al., 2018). Em protocolos de IATF, como regra, todas as
1171 vacas aptas são inseminadas, independentemente se o animal expressou o estro,
1172 embora estudos mostrem que a expressão do estro próximo a IATF está associada
1173 a maior fertilidade (Pancarci et al., 2002; Souza et al., 2007).

1174 Vacas que não apresentam cio durante o protocolo tendem a ter menor taxa
1175 de ovulação e, conseqüentemente, menor probabilidade de engravidar (Silva et al.,
1176 2016). Ademais, estudos indicam uma diminuição na perda de gestação em vacas
1177 quem exibem estro durante protocolos de IATF, sugerindo que o ambiente
1178 hormonal que produz a falta de expressão de estro também produz alterações
1179 uterinas que diminuem a probabilidade de manutenção da gestação no período
1180 crítico entre o primeiro e segundo mês (Pereira et al., 2016; Richardson et al., 2016).

1181 Uma das grandes vantagens em se verificar a expressão de cio está em
1182 poder identificar o melhor momento para a IA, em relação à ovulação, uma vez que
1183 a vida útil do oócito bovino é curta e esse intervalo é crucial para melhorar a
1184 fertilidade do rebanho. Conforme Roelofs et al. (2006), o intervalo de tempo no qual
1185 as vacas foram inseminadas está diretamente ligado as taxas de fertilização e
1186 qualidade embrionária. Assim, a falha na identificação do cio, ou ausência do
1187 mesmo, resulta em grandes perdas econômicas para o sistema de produção,
1188 reduzindo a taxa de serviço e rendimento do rebanho (Rao et al., 2013).

1189 Diante disso, novas tecnologias estão sendo desenvolvidas e
1190 implementadas em programas de IATF para melhorar o controle do estro e maior
1191 sucesso no número e qualidade de gestação (Jónsson et al. 2011; Richardson et
1192 al., 2016; Nogueira et al., 2019). Entre elas, o uso de indutores da ovulação em
1193 fêmeas zebuínas lactantes classificadas segundo o escore de remoção de tinta na
1194 cauda, sendo aplicados naquelas com baixa expressão de cio (ESCT 1 e 2) no
1195 momento da inseminação (Nogueira et al., 2016).

1196 O análogo de GnRH, usado como indutor da ovulação, induz uma onda de
1197 LH semelhante a pré-ovulatória em 2 horas e a ovulação entre 26 e 30 horas,
1198 respectivamente, e sua utilização na IATF, em fêmeas com baixa ou sem expressão
1199 de cio, melhora a sincronização da ovulação e taxas de prenhez (Sá Filho et al.,
1200 2010; Rodrigues et al., 2019).

1201 A gonadotrofina coriônica humana (hCG) é produzida pelo trofoblasto
1202 humano e excretado em grandes quantidades na urina de mulheres grávidas (De
1203 Medeiros & Norman, 2008). Nas vacas, o hCG se liga aos receptores de LH nas
1204 células da granulosa e da teca dos folículos ovarianos com alta afinidade (Ireland
1205 & Roche, 1983) e tem sido usado para induzir a ovulação em protocolos de IATF
1206 ou para formar o CL acessório após inseminação (FRICKE et al., 1993; Nascimento
1207 et al., 2013).

1208 Alguns trabalhos que testaram a utilização do hCG como indutor de ovulação
1209 em protocolos de IATF obtiveram efeitos semelhantes ao GnRH (Burns, et al., 2008;
1210 Liu et al., 2019), além terem efeito no aumento dos níveis de progesterona
1211 plasmático, redução das perdas embrionárias iniciais e assim, melhora da
1212 fertilidade (De Rensis et al., 2008; Wallace et al., 2011).

1213 Estudos também relataram recentemente que as taxas de prenhez poderiam
1214 ser aumentadas se fosse diminuído o período de crescimento do folículo dominante
1215 ovulatório e prolongado a duração do proestro (Pontes et al., 2008, Colazo &
1216 Ambrose, 2011, Bó et al., 2016). Esse novo protocolo, promove modificações
1217 durante o proestro e define um perfil endócrino pré-ovulatório, que está
1218 positivamente associado com CL mais competente e uma melhora do ambiente
1219 uterino (De La Mata et al., 2018).

1220 O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos indutores da ovulação
1221 GnRH e hCG, utilizados no momento da inseminação, em protocolos de IATF,
1222 comparando-os em relação as taxas de prenhez obtidas em fêmeas com avaliação
1223 de cio ESCT 1 e 2.

1224

1225 **2. Material e métodos**

1226 *Animais*

1227 Foram utilizadas 2.316 vacas lactantes da raça Nelore, na região de Planalto
1228 do estado de Mato Grosso do Sul (ECC (1-5)), durante as estações de monta de
1229 2019 e 2020. As fêmeas destinadas a protocolos reprodutivos foram submetidas a
1230 exame ginecológico completo, considerando: escore de condição corporal (ECC),
1231 categoria animal, histórico reprodutivo e sanitário. Também foi realizado exame
1232 ultrassonográfico para avaliar a condição ovariana e uterina.

1233

1234 *Delineamento experimental*

1235 Todos os animais foram submetidos a protocolo de IATF e classificados
1236 segundo o escore de remoção de tinta da cauda (ESCT), em que: ESCT 1 - sem
1237 remoção de tinta = sem expressão de cio; ESCT2 - pouca remoção de tinta = baixa
1238 expressão de cio; ESCT3 - muita ou remoção total de tinta = alta expressão de cio.
1239 Os animais classificados como ESCT 1 e ESCT 2 no momento da IATF foram
1240 aleatoriamente distribuídos em três tratamentos:

1241

1242 I. Controle: 301 vacas não receberam nenhum tratamento, servindo de
1243 grupo controle do experimento.

1244 II. Tratamento GnRH: 265 vacas receberam a aplicação de GnRH (0,1
1245 mg Gonadorelina, I.M.), no momento da inseminação (IATF).

1246 III. Tratamento hCG: 267 vacas receberam a aplicação de hCG (1000 UI,
1247 I.M.) no momento da inseminação (IATF).

1248

1249 Adicionalmente, as vacas que apresentaram ESCT 3 (n= 1483) foram
1250 inseminadas no mesmo momento, sem aplicação de tratamento adicional.

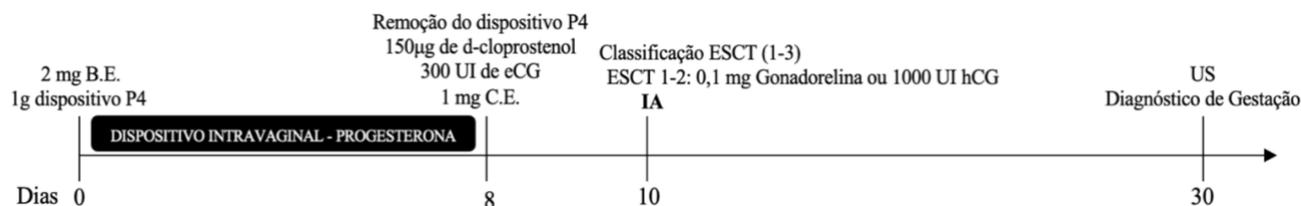
1251 O experimento foi realizado em fazendas diferentes, mas o protocolo de IATF
1252 utilizado em todas foi de três manejos, sendo no primeiro dia de tratamento (D0)
1253 realizada a colocação de implante intravaginal de progesterona e aplicação de
1254 benzoato de estradiol (BE – 2mg, I.M.). No dia 8 (D8) foi retirado o dispositivo e
1255 aplicado os hormônios prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}, 500µg, I.M.), cipionato de
1256 estradiol (ECP – 1mg, I.M.) e 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (ECG, I.M.).

1257 Também foi feito a marcação dos animais na região sacro-caudal, com bastão
1258 marcador, para classificação do cio.

1259 No dia 10 (D10) foi feita a classificação da expressão do cio através de
1260 escores de remoção da tinta na cauda (ESCT), realizado os três tratamentos
1261 mencionados e feita a inseminação artificial (IA), após 48 horas da retirada do
1262 dispositivo (D10). O sêmen utilizado para inseminação foi devidamente testado e
1263 possuíam os padrões de qualidade necessários.

1264 O diagnóstico de gestação foi realizado, em todas as propriedades, em torno
1265 de 35 dias após a IATF (com ultrassonografia modo B), para avaliação da taxa de
1266 prenhez.

1267



1268

1269 Figura 4. Delineamento experimental.

1270

1271 *Análise estatística*

1272 Todas as análises foram feitas utilizando o SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC,
1273 USA; versão 9.4. A taxa de prenhez no dia 30, foram avaliadas utilizando o
1274 procedimento GLIMMIX do SAS. O modelo estatístico utilizou como efeito fixo o
1275 tratamento e como efeito aleatório o animal (tratamento x lote) e lote. O ECC inicial,
1276 touro e inseminador, foram incluídos como covariáveis, porém foram removidos do
1277 modelo quando o P foi ≤ 0.10 para cada covariável específica. A significância foi
1278 definida quando $P \leq 0.05$, e tendência quando $P > 0.05$ e ≤ 0.10 .

1279

1280 **3. Resultados**

1281 Foram avaliadas as taxas de prenhez dos animais para comparar os efeitos
1282 dos indutores da ovulação, conforme mostrado na Tabela 1, não houve diferença
1283 estatística entre os grupos GnRH (48,3%) e hCG (52,05%) ($P=0,590$), ambos se
1284 mostraram eficazes na indução da ovulação em animais que deram pouco ou

1285 nenhum cio (ESCT 1 e 2), aumentando as taxas de prenhez quando comparado ao
1286 grupo controle, que não recebeu nenhum tratamento.

1287 O grupo hCG, porém, foi igual estatisticamente ao grupo ESCT 3 (55,83%,
1288 $P=0,160$), ou seja, aos animais que apresentaram cio em resposta ao protocolo da
1289 IATF (Figura 5). O Escore de condição corporal (ECC) dos animais teve efeito na
1290 taxa de prenhez ($P>0,01$), porém não teve efeito nos tratamentos.

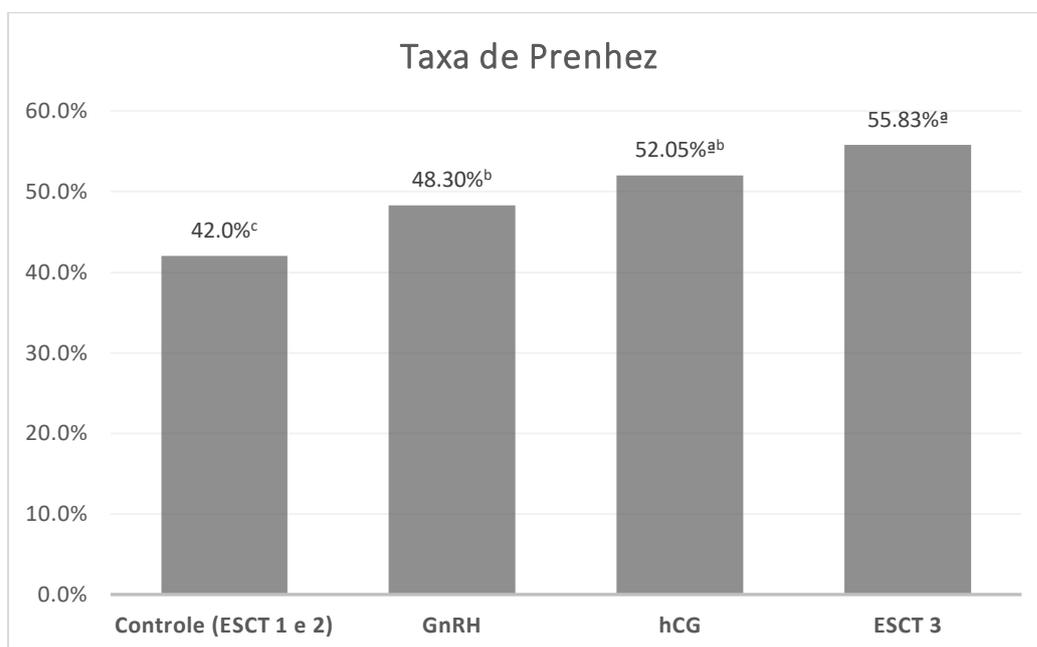
1291

1292 Tabela 2. Taxa de prenhez (%) de acordo com o uso de diferentes indutores
1293 adicionais de ovulação no momento da IATF e diferentes ESCT.

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

1294 *Valor significativo com $P\leq 0,05$.

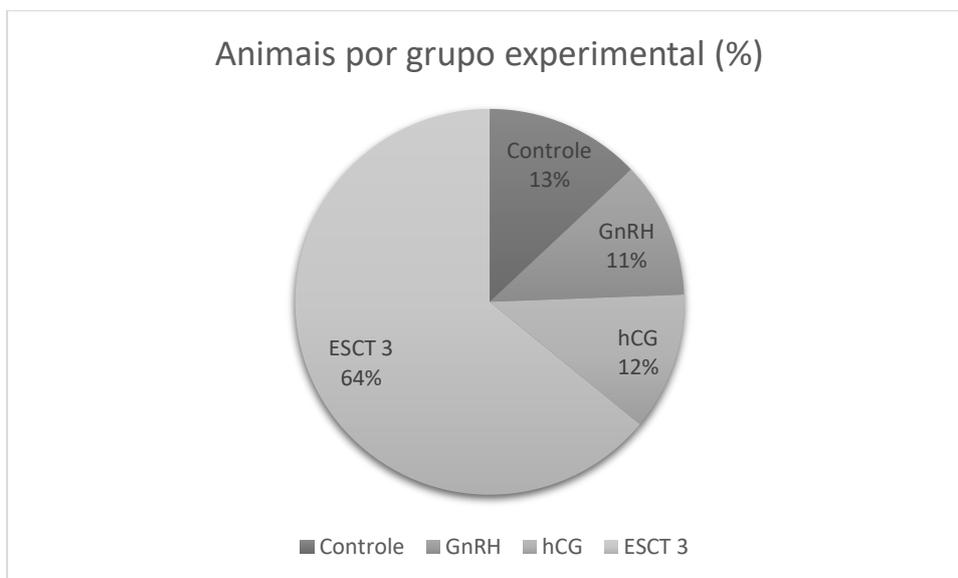
1295



1296

1297 Figura 5. Taxa de prenhez (%), de acordo com uso de diferentes indutores
1298 adicionais de ovulação no momento da IATF e diferentes ESCT ($P\leq 0,05$).

1299



1300

1301 Figura 6. Distribuição animais por grupo experimental (%), de acordo com uso de
 1302 diferentes indutores adicionais de ovulação no momento da IATF e diferentes
 1303 ESCT.

1304

1305

4. Discussão

1306

1307

1308

1309

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

1310

1311

1312

1313

1314

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

1315

1316

1317

1318

1319

1320

1321

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

1322 Os resultados observados nesse experimento corroboram com (Nogueira et
1323 al., 2016) que testaram a eficácia do uso de indutores da ovulação no aumento nas
1324 taxas de prenhez, utilizando para detecção dos animais em cio os bastões
1325 marcadores, mostrando correlação com o diâmetro folicular no momento da IATF,
1326 bem como com a taxa de prenhez. Uma das grandes vantagens em se verificar a
1327 expressão de cio está em poder identificar os animais que responderam ao
1328 protocolo hormonal e aumentar as chances de sucesso da inseminação (Silva et
1329 al., 2016).

1330 Conforme Roelofs et al. (2006), o intervalo de tempo no qual as vacas foram
1331 inseminadas está diretamente ligado as taxas de fertilização e qualidade
1332 embrionária. Assim, a falha na identificação do cio, ou ausência do mesmo, resulta
1333 em grandes perdas econômicas para o sistema de produção, reduzindo a taxa de
1334 serviço e rendimento do rebanho (Rao et al., 2013). Esses dados reforçam o que
1335 relatamos nos animais do grupo controle ESCT 1 e 2, que não apresentaram cio e
1336 tiveram menor taxa de prenhez.

1337 O GnRH é liberado de forma pulsátil pelo hipotálamo, cujo alvo são sítios
1338 específicos localizados na hipófise anterior, ocasionando a liberação do LH (Estes
1339 et al., 1977). Assim, sua ação é causar ovulação ou luteinização do folículo
1340 dominante presente no momento da aplicação. A sua atuação diretamente na
1341 hipófise resulta em ovulações em intervalos menores em relação aos ésteres de
1342 estradiol (Macmillan & Thaxter, 1991).

1343 Nesse experimento, a utilização de GnRH como indutor da ovulação
1344 aumentou a taxa de prenhez em animais que não haviam apresentado cio durante
1345 o protocolo quando comparado ao grupo controle que não recebeu nenhum
1346 tratamento. Resultados similares foram encontrados por Sá Filho et al. (2010) e
1347 Rodrigues et al. (2019), em que o GnRH induziu uma onda de LH semelhante a
1348 pré-ovulatória em 2 horas e a ovulação entre 26 e 30 horas, respectivamente, e sua
1349 utilização na IATF, em fêmeas com baixa ou sem expressão de cio, resultou em
1350 melhora na sincronização da ovulação e taxas de prenhez.

1351 A gonadotrofina coriônica humana (hCG) tem sido muito utilizada devido a
1352 sua atividade semelhante ao LH, porém com ação mais prolongada. Nas vacas, o

1353 hCG tem efeito luteotrófico devido a ligação aos receptores de LH das células
1354 lúteas, o qual persiste por até 30 h após o tratamento (Ireland & Roche, 1983; De
1355 Rensis et al., 2008). Sua aplicação aumenta a capacidade esteroidogênica do CL
1356 primário, devido à diferenciação das células da teca e granulosa em células lúteas
1357 grandes e pequenas e à transformação de células lúteas pequenas em células
1358 grandes (Farin et al., 1988).

1359 A utilização do hCG nesse experimento mostrou eficácia quando comparado
1360 ao grupo controle. Igualmente, pesquisas que testaram a utilização do hCG como
1361 indutor de ovulação em protocolos de IATF obtiveram efeitos semelhantes ao
1362 GnRH (Burns, et al., 2008; Liu et al., 2019), além de terem efeito no aumento dos
1363 níveis de progesterona plasmática, redução das perdas embrionárias iniciais e
1364 assim, melhora da fertilidade (De rensis et al., 2008; Wallace et al., 2011).

1365 O resultado do hCG foi igual ao dos animais que apresentaram cio durante
1366 o protocolo (ESCT 3), podendo sugerir um melhor desempenho quando comparado
1367 ao GnRH. Geary et al. (2001) e Stevenson et al. (2006) também relataram maior
1368 eficácia do hCG na estimulação da ovulação em gado leiteiro e em vacas de corte
1369 cíclicas, respectivamente.

1370 Buttrey et al. (2010) também descreveram maior incidência de ovulação após
1371 hCG, o que possivelmente pode ser uma função da maior meia-vida de hCG em
1372 comparação com a liberação de LH induzida por GnRH em resposta aos quatro
1373 locais de glicosilação do hCG (Jameson & Hollenberg, 1993), por exemplo, o hCG
1374 ligado ao receptor de LH nas células lúteas foi internalizado 50 vezes mais
1375 lentamente que o LH (Niswender et al., 1995). Essas características permitem que
1376 o hCG induza a ovulação de forma mais potente.

1377 Foi descoberto que o CL induzido por hCG se comporta de maneira diferente
1378 do CL induzido espontaneamente quanto a sua regressão pela PGF₂, sendo
1379 induzido a regredir antes do quinto dia de vida útil. Também, observou-se que
1380 diferia em tamanho e cor do CL formado espontaneamente e produzia menos
1381 progesterona quando cultivado in vitro na presença de LH (Howard & Britt, 1990;
1382 Fricke et al., 1993).

1383 Ainda, Buttrey (2010) e colaboradores identificaram que os CL auxiliares
1384 induzidos em vacas tratadas com GnRH ou hCG variaram de 35,7% a 85,7%
1385 (média = 61%) em um grupo, mas apenas 27,5% a 62,5% (média = 33%) em outro
1386 grupo. Esses animais tiveram aumento nas concentrações séricas de
1387 progesterona, como visto em outros estudos (Santos et al., 2001; Stevenson et al.,
1388 2007), porém, a perda de gestação foi maior em vacas tratadas com hCG, mesmo
1389 ele gerando maior formação de CL auxiliares do que o GnRH.

1390 Uma explicação para não terem reduzido efetivamente a perda de gestação
1391 pode ser o tempo em que o tratamento foi realizado, onde os animais foram tratados
1392 tardiamente, após a IA, entre os dias 30 e 71 de gestação. Mesmo tendo aumento
1393 nas concentrações de progesterona com a formação de novas estruturas lúteas, a
1394 formação do CL acessório possivelmente ocorreu muito tarde, entre os dias 23 a
1395 35, após o estro ou IA (Buttrey et al., 2010). Assim, a aplicação precoce se mostraria
1396 mais efetiva.

1397 Santos et al., 2001 testaram a aplicação de hCG cinco dias após a IA, e seus
1398 resultados quanto ao aumento da taxa de prenhez nos animais tratados corroboram
1399 com os resultados encontrados nesse experimento, inclusive melhorando a taxa de
1400 prenhez em vacas que perderam condição corporal entre a IA e 28 dias após.
1401 Entretanto, mesmo verificando a formação de CL acessório, aumento da
1402 concentração de progesterona e melhora na concepção, as perdas gestacionais
1403 foram semelhantes entre os grupos de tratamento.

1404 O aumento das concentrações séricas de progesterona no tratamento com
1405 hCG ocorre por pelo menos duas maneiras: primeiro pela formação do CL
1406 acessório, segundo pelo aumento no número de células lúteas secretoras de
1407 progesterona no CL existente aumentando sua área de superfície e volume, sendo
1408 que ambas as maneiras também podem ocorrer ao mesmo tempo (Santos et al.,
1409 2001; Stevenson et al., 2007).

1410 Keskin et al. (2010) obtiveram resultados diferentes comparando o uso dos
1411 dois indutores com protocolo Ovsynch em vacas em lactação e não houve aumento
1412 nas taxas de ovulação e concepção quando utilizou-se hCG, não sendo ele um bom
1413 substituto para o GnRH. Esse resultado corrobora com o encontrado por Geary et

1414 al. (2001) e Burns et al. (2008), que encontraram resultados superiores com o uso
1415 do GnRH.

1416 Ainda comparando os indutores em outro tipo de protocolo, em vacas de
1417 corte, a substituição do GnRH por hCG também não foi eficaz, sendo as taxas de
1418 prenhez maiores com o uso de GnRH no início e no final ou apenas no final do
1419 protocolo (Schmitz et al., 2017).

1420 Apesar de ter se mostrado eficaz neste estudo, o uso do hCG deve ser
1421 avaliado em relação ao valor do protocolo, sendo o custo da dose (considerando
1422 1000 UI por animal) cerca de cinco vezes maior quando comparado ao GnRH.
1423 Deve-se levar em conta que, além da eficácia em promover a ovulação, a ação
1424 luteinizante do hCG permite prolongar a vida útil do CL e aumentar as
1425 concentrações plasmáticas de progesterona (Bertan et al., 2006; Nascimento et al.,
1426 2013).

1427 Além disso, conforme Diaz et al. (1998), quando administrado durante o
1428 diestro, na presença de folículos pré-ovulatórios, o hCG pode induzir a formação
1429 de corpos lúteos acessórios, prolongando o ciclo estral e auxiliando na manutenção
1430 inicial da gestação, visto que maior produção de progesterona após a ovulação está
1431 relacionada com uma maior taxa de desenvolvimento embrionário e
1432 reconhecimento materno da gestação (Maubrigades et al., 2022).

1433 Essa redução de perda embrionária deve ser levada em consideração no
1434 momento de avaliar o custo-benefício, uma vez que não são todos os animais que
1435 recebem o tratamento, apenas aqueles que não expressaram cio no protocolo de
1436 IATF. Esses animais correspondem, normalmente, a uma parcela pequena dentro
1437 do total do lote e podem ser identificados de forma prática e eficiente com a
1438 utilização do bastão marcador na região sacro-caudal (Anache et al., 2018;
1439 Nogueira et al., 2019).

1440 Em protocolos de IATF em vacas os principais fármacos usados como
1441 indutores de ovulação são os análogos (gonadorelina) ou superanálogos
1442 (buserelina, lecirelina, fertirelina) do GnRH, ésteres de estradiol, como o benzoato
1443 (BE) e o cipionato de estradiol (CE), o hCG e o hormônio luteinizante (LH).

1444 Recentemente, foi relatado efeito positivo da PGF na ovulação em bovinos (Castro
1445 et al., 2018).

1446 Os ésteres de estradiol são amplamente usados para o controle do ciclo
1447 estral e, quando usados na ausência de progesterona, estimulam a liberação de
1448 GnRH e LH pelo hipotálamo e hipófise, respectivamente, induzindo a ovulação do
1449 folículo dominante (Moenter et al., 1990).

1450 A ovulação é mais tardia nesses protocolos quando comparado com
1451 protocolo que utilizam GnRH (Willians & Stancel, 1996). Dessa forma, não seriam
1452 bons indutores para serem empregados no dia da inseminação (D10) como uma
1453 forma de aumentar as chances de prenhez dos animais que não obtiveram boa
1454 resposta a sincronização (ESCT 1 e 2), já que o tempo de ação não seria ideal.

1455 Outro ponto importante em relação ao uso de ésteres de estradiol como
1456 indutores de ovulação é que, apesar de sua eficiência e da excelente relação custo-
1457 benefício, alguns países proibiram sua utilização devido à preocupação com
1458 possíveis efeitos residuais nos alimentos de origem animal e prejuízos a saúde
1459 humana (Lane et al., 2008).

1460 Os tratamentos com hCG e GnRH possuem efeitos semelhantes no ovário
1461 (Fricke et al., 1993), na indução a ovulação e na formação de corpos lúteos
1462 acessórios, elevando consideravelmente as concentrações plasmáticas de
1463 progesterona alcançadas sete dias após o tratamento (Hanlon et al., 2005).

1464 Enquanto o hCG tem seu efeito mais prolongado, a administração de GnRH
1465 aumenta as concentrações de LH no soro por aproximadamente 5h (Kinser et al.,
1466 1983). Ademais, o CL formado após a ovulação induzida por GnRH pode não ser
1467 totalmente funcional (Santos et al., 2001).

1468 Diante disso, estudos mostraram que o tratamento com hCG geralmente
1469 eleva as concentrações de progesterona mais do que o tratamento com GnRH
1470 (Stevenson et al., 2007; Stevenson et al., 2008). Também mostraram que vacas
1471 com menores concentrações de progesterona durante o diestro subsequente à IA,
1472 tiveram menores taxas de concepção (Mann et al., 1999).

1473 A fertilidade após ambos os tratamentos está diretamente relacionada à fase
1474 do ciclo estral em que a administração foi realizada, à ciclicidade do animal e o

1475 período do ano. Observou-se em alguns estudos mais vacas em anestro
1476 retornarem ao estro após GnRH em comparação com hCG mas em outros estudos
1477 isso não foi relatado (Burns et al., 2008).

1478 O tratamento com hCG também foi relacionado a um aumento da taxa de
1479 prenhez em vacas multíparas por Garcia-Ispuerto et al. (2019), mostrando efeito
1480 positivo do hCG sobre a fertilidade de vacas multíparas em anestro,
1481 independentemente de estresse térmico e estação do ano. De Rensis et al. (2008),
1482 também observou um melhor efeito na fertilidade do hCG em comparação com o
1483 GnRH em relação ao período do ano, sendo melhor durante o período quente do
1484 ano, mas não no frio.

1485 A última observação sugere que o hCG é capaz, até certo ponto, de
1486 neutralizar o efeito negativo sobre a fertilidade do estresse térmico durante a
1487 estação quente, o que para regiões de temperaturas mais extremas pode
1488 representar um ganho significativo em resultado de prenhez.

1489 A administração de GnRH requer a presença de LH, no nível hipofisário, para
1490 ter eficácia e o efeito endógeno do LH no CL dura menos tempo do que o hCG
1491 (Garcia-Ispuerto et al., 2019) Assim, o uso de hCG em vez de GnRH pode ser
1492 indicado para vacas com problemas de fertilidade, como por exemplo, vacas
1493 leiteiras de alta produção ou vacas com perda expressiva de escore de condição
1494 corporal, que podem apresentar deficiência no estoque de LH e assim, baixo efeito
1495 no tratamento com GnRH.

1496 Butler (2003) relatou que o balanço energético negativo está relacionado
1497 com a diminuição da frequência dos pulsos de LH e com os baixos níveis de glicose,
1498 insulina e IGF-I no sangue, os quais restringem a produção de estrogênio pelos
1499 folículos dominantes, favorecendo a diminuição da qualidade dos ovócitos e a
1500 competência para o desenvolvimento embrionário, além de baixas concentrações
1501 séricas de progesterona.

1502 Em conclusão, os indutores da ovulação GnRH e hCG se mostraram
1503 eficientes para aumentar taxa de prenhez em fêmeas que não apresentaram cio no
1504 protocolo de IATF, mostrando-se alternativas promissoras para o incremento nos
1505 resultados da estação de monta.

1506 **5. Referências bibliográfica**

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

- 1544 De La Mata, J.J., Núñez-olivera, F., Cuadro, F., Bosolasco, D., de Brun, V., Meikle,
1545 A., Bó, G. A., Menchaca, A., 2018. Impact of extending the proestrus length in an
1546 oestradiol and progesterone-based oestrus synchronization program on follicular
1547 and luteal development, uterine gene expression, and protein localization, and
1548 pregnancy rates in beef heifers. *Reproduction, fertility and development*. v. 30(11),
1549 p.1541-1552. <https://doi.org/10.1071/RD17473>.
- 1550 De Medeiros, S.F., Norman, R.J., 2008. Human choriogonadotropin protein core
1551 and sugar branches heterogeneity: basic and clinical insights. *Human*
1552 *Reproduction*. v.15, p.69-95. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn036>.
- 1553 De Rensis, F., Valentini, R., Gorrieri, F., Bottarelli, E., Lopez-Gatius, F., 2008.
1554 Inducing ovulation with hCG improves the fertility of dairy cows during the warm
1555 season. *Theriogenology*, v.69, p.1077-82.
- 1556 Diaz, T., Schmitt, E.J., De La Sota, R.L., Thatcher M.J., Thatcher, W., 1998. Human
1557 chorionic gonadotropin induced alterations in ovarian follicular dynamics during the
1558 estrous cycle of heifers. *Journal Animal Science*, v.76, p.1929-36.
1559 <https://doi.org/10.2527/1998.7671929x>.
- 1560 Estes, K.S., Padmanabhan, V., Convey, E.M., 1977. Localization of gonadotropin
1561 releasing hormone (GnRH) within the bovine hypothalamus. *Biology of*
1562 *Reproduction*, v.17, p.706-11.
- 1563 Farin, C.E., Moeller, C.L., Mayan, H., Gamboni, F., Sawyer, H.R., Niswender, G.D.,
1564 1988. Effect of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin on cell
1565 populations in the ovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*, v.38, p.413-21.
1566 <https://doi.org/10.1095/biolreprod38.2.413>.
- 1567 Fricke, P., Reynolds, L., Redmer, D., 1993. Effect of human chorionic gonadotropin
1568 administered early in the estrous cycle on ovulation and subsequent luteal function
1569 in cows. *Journal Animal Science*. v.71, p.1242-6.
1570 <https://doi.org/10.2527/1993.7151242x>.
- 1571 Garcia-Ispuerto, I., De Rensis, F., Casas, X., Caballero, F., Serrano-Pérez, B.,
1572 López-Gatius, F., 2019. Inducing ovulation with hCG in a five-day progesterone-
1573 based fixed-time AI protocol improves the fertility of anestrous dairy cows under
1574 heat stress conditions. *Theriogenology*. 124:65-68.
1575 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.10.015>.
- 1576 Geary, T.W., Salverson, R.R., Whittier, J.C., 2001. Sincronização da ovulação
1577 usando GnRH ou hCG com o protocolo CO-Synch em vacas de corte
1578 amamentadas, *Journal of Animal Science*, Volume 79, Edição 10, Páginas 2536–
1579 2541
- 1580 Hanlon, D.W., Jarrat, G.M., Davidson, P.J., Millar, A.J., Douglas, V.L., 2005. The
1581 effect of hCG administration five days after insemination on the first service

- 1582 conception rate of anestrous dairy cows. *Theriogenology*. 63:1938–45.
1583 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.002>.
- 1584 Howard, H.J., Britt, J.H., 1990. Prostaglandin F₂ causes regression of an hCG-
1585 induced corpus luteum before day 5 of its life-span in cattle. *Journal Reproduction*
1586 *Fertility*. 90:245–53. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0900245>.
- 1587 Ireland, J.J., Roche, J.F., 1983. Growth and differentiation of large antral follicles
1588 after spontaneous luteolysis in heifers: changes in concentration of hormones in
1589 follicular fluid and specific binding of gonadotropins to follicles. *Journal Animal*
1590 *Science*. v.57, p.157-167. <https://doi.org/10.2527/jas1983.571157x>.
- 1591 Jameson, L.J., Hollenberg, A.N., 1993. Regulation of chorionic gonadotropin gene
1592 expression. *Endocrine reviews*, 14(2), 203–221. [https://doi.org/10.1210/edrv-14-2-](https://doi.org/10.1210/edrv-14-2-203)
1593 [203](https://doi.org/10.1210/edrv-14-2-203).
- 1594 Jónsson, R., Blanke, M., Poulsen, N.K., Caponetti, F., Hojsgaard, S., 2011. Estrus
1595 detection in dairy cows from activity and lying data using on-line individual models.
1596 *Computers and electronics in agriculture*. v.76, p.6-15.
1597 <https://doi.org/10.1016/j.compag.2010.12.014>.
- 1598 Keskin, G., Yilmazbas-Mecitoglu, Gumen, A., Karakaya, E., Darici, R., Okut, H.,
1599 2010. Effect of hCG vs. GnRH at the beginning of the Ovsynch on first ovulation and
1600 conception rates in cyclic lactating dairy cows. *Theriogenology*. Volume 74, Issue 4,
1601 Pages 602-607. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.03.009>.
- 1602 Kinser, A.R., Gibson, M.F., Vincent, D.L., Scheffrahn, N.S., Kesler, D.J., 1983.
1603 Ovarian responses of seasonally anestrous ewes administered progesterone,
1604 PMSG, hCG and (or) GnRH. *Theriogenology*. 19:449–60.
- 1605 Lane, E.A., Austin, E.J., Crowe, M.A., 2008. Oestrous synchronization in cattle--
1606 current options following the EU regulations restricting use of oestrogenic
1607 compounds in food-producing animals: a review. *Animal Reproduction Science*,
1608 v.109, p.1-16. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.08.009>.
- 1609 Liu, T.C., Ho, C.T., Li, K.P., Chang, C.C., Chan, J.P., 2019. Human chorionic
1610 gonadotropin (hCG)-induced ovulation occurs later but with equal occurrence in
1611 lactating dairy cows: comparing hCG and gonadotropin-releasing hormone
1612 protocols. *Journal of Reproduction and Development*. v.65(6), p.507-514.
1613 <https://doi.org/10.1262/jrd.2019-037>.
- 1614 Macmillan, K.L., Thatcher, W., 1991. Effects of an agonist of gonadotropin-releasing
1615 hormone on ovarian follicles in cattle. *Biology of reproduction*. v.45, p.883-9.
1616 <https://doi.org/10.1095/biolreprod45.6.883>.
- 1617 Mann, G.E., Lamming, G.E., 1999. The influence of progesterone during early
1618 pregnancy in cattle. *Reproduction of Domestic Animal*. 34:269–74.

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

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

- 1696 Souza, A.H., Gümen A., Silva, E.P. et al., 2007. Supplementation with estradiol-
1697 17beta before the last gonadotropin-releasing hormone injection of the Ovsynch
1698 protocol in lactating dairy cows. *Journal Dairy Science*. v.90(10), p.4623-4634.
- 1699 Stevenson, J.S., Portaluppi, M.A., Tenhouse, D.E., Lloyd, A., Eborn, D.R., Kacuba,
1700 S., De Jarnette, J.M., 2007. Interventions After Artificial Insemination: Conception
1701 Rates, Pregnancy Survival, and Ovarian Responses to Gonadotropin-Releasing
1702 Hormone, Human Chorionic Gonadotropin, and Progesterone. *Journal of Dairy
1703 Science*, 90(1), 331–340. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)72634-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72634-6).
- 1704 Stevenson, J.S., Tiffany, S.M., Inskip, E.K., 2008. Maintenance of pregnancy in
1705 dairy cattle after treatment with human chorionic gonadotropin or gonadotropin-
1706 releasing hormone. *Journal of Dairy Science*. 91:3092–101.
1707 <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1027>.
- 1708 Wallace, L.D., Breiner, C.A., Breiner, R.A., Spell, A.R., Carter, J.A., Lamb, G.C.,
1709 Stevenson, J.S., 2011. Administration of human chorionic gonadotropin at embryo
1710 transfer induced ovulation of a first wave dominant follicle, and increased
1711 progesterone and transfer pregnancy rates. *Theriogenology*. v.75(8), p.1506-1515.
1712 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.012>.
- 1713 Willians, C., Stancel, G., 1996. Estrogênios e progestogênios. In: Goodman H,
1714 Gilman TL. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 8a ed., São Paulo: Manole,
1715 p.1045-1067.
- 1716
- 1717
- 1718
- 1719
- 1720
- 1721
- 1722
- 1723
- 1724
- 1725
- 1726
- 1727

1728 **CAPÍTULO 4**

1729

1730 **1. CRONOGRAMA**

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

1731

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

1732

1733

1734

1735

1736

1737 **2. JUSTIFICATIVAS**

1738

1739 1. A execução deste projeto permitirá que novas alternativas hormonais para
1740 inseminar vacas em tempo fixo estejam disponíveis para os profissionais que atuam
1741 no mercado e para difusão tecnológica, via órgãos de fomento. Além disso, os
1742 resultados oriundos dessa proposta científica permitirão que o sistema de produção
1743 de gado de corte e leite esteja mais conectado com as exigências mercadológicas
1744 e com uma produção mais sustentável e menos onerosa.

1745 2. Inovação dos protocolos de IATF utilizados no Brasil, pois poderá ser
1746 recomendada utilização de novos protocolos e hormônios para melhora de índices
1747 de prenhez em vacas com utilização de sêmen convencional ou sexado.

1748

1749

1750

1751

1752

1753

1754

1755

1756

1757

1758

1759

1760

1761

1762

1763

1764

1765

1766

1767

1768

ANEXOS

1769

1770

1. CÓPIA DO PROJETO APROVADO

1771



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



TÍTULO:

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

RESUMO

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

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



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

1772

1773

1774

1775

1776

1777



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

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

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

O sêmen utilizado é outro fator determinante para a melhora nas taxas de prenhez nas técnicas de Inseminação Artificial (IA) e Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) (NOGUEIRA et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2014), fato que acaba limitando alguns resultados pela falta de preditores precisos de fertilidade em touros (BERRY et al., 2014). No Brasil, atualmente a maioria das metodologias de avaliação de sêmen de touros, baseadas em microscopia, classifica somente características exteriores nos espermatozoides, que garantem o alcance de padrões mínimos de qualidade reprodutiva (Manual CBRA, 1996).

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



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

Tais descobertas representam uma mudança fundamental na compreensão da fertilização de mamíferos, abrindo caminho para uma análise de sêmen mais precisa para melhorar a metodologia de fertilização *in vitro* (FIV) e Inseminação artificial (IA). Esses achados são consistentes com outros estudos que relatam homens férteis com níveis aumentados de Zn no plasma seminal em comparação com homens inférteis (COLAGAR et al., 2009; ZHAO et al., 2016). Otimização do sêmen Zn²⁺ e / ou níveis de proteína (s) contendo zinco poderiam, assim, melhorar os resultados da IA no gado.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

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

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

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

3. METODOLOGIA

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

Trat PGF no início: 300 vacas serão submetidas ao mesmo protocolo base do Exp 2, com aplicação de dose de PGF2α no D0 do protocolo.

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

Ultrassonografia

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

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

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

Coleta de Sangue e dosagem de progesterona (P4)

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



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

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

Avaliação do sêmen - Citometria de fluxo, CASA.

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

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

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

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

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

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

1803
1804
1805
1806
1807
1808
1809
1810
1811
1812
1813



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

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

4. REFERÊNCIAS

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

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

BRIDGES G.A.; HESLER L.A.; GRUM D.E.; MUSSARD M.L.; GASSER C.L.; AND DAY M.L. Decreasing the interval between GnRH and PGF2 α from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology* 69: 843- 51, 2008.

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



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

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

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

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

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

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

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

1814
1815
1816
1817
1818
1819
1820
1821



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

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

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

5. EQUIPE:

1. Ériklis Nogueira

Pesquisador A da EMBRAPA Pantanal – Corumbá, MS.
CPF: 686.743.791-68
Email: eriklis.nogueira@embrapa.br

2. Karine Casanova Silva

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - FAMEZ
CPF: 037.863.651-05
Email: karine_casanova@hotmail.com

3. Nathália Albaneze Anache

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – FAMEZ
CPF: 727.942.161-04
Email: nathaliaanache@hotmail.com

4. Juliana Correa Borges Silva

Pesquisadora EMBRAPA Pantanal – Corumbá, MS.
CPF: 269.659.598-43
Email: juliana.correab@embrapa.br

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



5. Fabiana Andrade Melo Sterza

Docente na Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul – UEMS, Aquidauana.
CPF: 023.919.279-67
Email: fabiana.sterza@uems.br

6. Eliane Viana Costa e Silva

Docente na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFMS – FAMEZ, Campo Grande, MS.
CPF: 500.697.216-53
Email: eliane.silva@ufms.br

6. CRONOGRAMA

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

7. ORÇAMENTO

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

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

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

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

1834 **2. NORMAS DA REVISTA**

1835

1836 **Revista: Animal Reproduction Science.**

1837

PREPARATION

Editorial Structure and Preliminary Assessment

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

Queries

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

Peer review

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

Appeals

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

Article structure

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

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

Abstract

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

Introduction (labelled with the number 1)

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

1838

1839

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

Materials and Methods (labelled with the number 2)

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

Description of analytical methods

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

Gene names

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

Quantitative PCR

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

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

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

Semen analysis

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

Flow cytometry

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

Use of antibodies

1840

1841

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

Statistical analyses

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

Results (labelled with the number 3)

Results should be clear and concise.

Discussion (labelled with the number 4)

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

Conclusions (labelled with the number 5)

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

Essential Title Page Information

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

Highlights

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

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

Abstract

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

Graphical abstract

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

Keywords

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

Please note:

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

Acknowledgements

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

Formatting of funding sources

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

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

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

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

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

Nomenclature

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

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

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

Nomenclature and units

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

Math formulae

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

1844

1845

Footnotes

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

Artwork

Electronic artwork

General points

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

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

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

Formats

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

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

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

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

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

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

Please do not:

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

Color artwork

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

Tables

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

Web references

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

Data references

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

Preprint references

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

Reference management software

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

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

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

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

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

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

Examples:

Reference to a journal publication:

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

Reference to a journal publication with an article number:

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

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

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

Reference to a website:

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

Reference to a dataset:

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

Video

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

1848