

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**VANESSA BUSS**

**EFEITO DA DOSE E MOMENTO DE ADMINISTRAÇÃO DA eCG EM  
PROTOCOLOS DE IATF APLICADOS A VACAS DE CORTE EM ANESTRO  
PÓS-PARTO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Uruguaiana**  
**2020**

**VANESSA BUSS**

**EFEITO DA DOSE E MOMENTO DE ADMINISTRAÇÃO DA eCG EM  
PROTOCOLOS DE IATF APLICADOS A VACAS DE CORTE EM ANESTRO  
PÓS-PARTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto sensu em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Gallas Leivas

**Uruguaiiana  
2020**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do  
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

B981e Buss, Vanessa

EFEITO DA DOSE E MOMENTO DE ADMINISTRAÇÃO DA eCG EM  
PROTOCOLOS DE IATF APLICADOS A VACAS DE CORTE EM ANESTRO PÓS-  
PARTO / Vanessa Buss.

57 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Pampa,  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL, 2020.

"Orientação: Fabio Gallas Leivas".

1. Reprodução Animal. 2. Biotécnicas da Reprodução. I.  
Título.

**VANESSA BUSS**

**EFEITO DA DOSE E MOMENTO DE ADMINISTRAÇÃO DA eCG EM  
PROTOCOLOS DE IATF APLICADOS A VACAS DE CORTE EM ANESTRO  
PÓS-PARTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto sensu em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Reprodução e Produção Animal

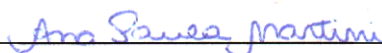
Dissertação defendida e aprovada em: 30 de novembro de 2020

Banca examinadora:



---

Prof. Dr. Fabio Gallas Leivas  
Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA- Orientador



---

Prof.ª Dr.ª Ana Paula Martini  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM



---

Prof. Dr. Paulo Bayard Dias Gonçalves  
Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA

Dedico este trabalho aos meus pais, ao meu irmão e ao meu companheiro de vida, por sempre apoiarem e incentivarem as minhas escolhas.

## AGRADECIMENTOS

Aqui deixo registrado o meu agradecimento a todos àqueles que de alguma forma fizeram parte da realização de mais esta etapa e contribuíram para a minha evolução ao longo do caminho.

Primeiramente, agradeço aos meus pais e irmão, Rejane Dimer, Vilson V. Buss e Vitor M. Buss pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e por estarem sempre ao meu lado, independente da distância e da situação. Juntamente com minha família, agradeço ao meu namorado e companheiro de vida Ney L. Ulrich Neto, por me incentivar a ser melhor todos os dias, por acreditar na minha capacidade, pelas oportunidades que me proporciona, pelo apoio e companheirismo e por estar comigo ao longo de todo o caminho.

Agradeço aos companheiros e amigos que estiveram presentes desde o início desta caminhada, Cecília, Pauline, Marco, Hirya, Janice, Jéssica, Júlia H. Prestes, Gabriel Maggi, Leonardo, pelo convívio diário, pela parceria, pelas risadas, pelos desentendimentos, pelo aprendizado e por tornarem tudo mais leve. Aos companheiros que chegaram depois, em uma época de menos contato, mas que mesmo assim estiveram presentes, Lessana, Felipe e Gisélida.

Em especial agradeço ao colega e amigo Lucas D. Dacampo pela parceria e aprendizado compartilhado. A professora, colega e amiga Janislene M. Trentin, por todo incentivo, pelos ensinamentos, pela parceria e companheirismo. E também, à “minha estagiária” Maria Eduarda Pizarro, pela amizade que construímos apesar de tudo, pelo auxílio no desenvolvimento de todo o experimento de mestrado e pelo aprendizado em transmitir conhecimento. Foram pessoas essenciais nesta caminhada!

Ao meu orientador Fabio G. Leivas, por ser um dos motivos da minha escolha pela reprodução animal, pelas oportunidades e ensinamentos de sempre. E também a professora Daniela S. Brum, pelas oportunidades e ensinamentos em horizontes além do campo.

Agradeço também aos professores Fernando Mesquita, Paulo Bayard e Francieli Cibir, pela oportunidade de participar do desenvolvimento de outros trabalhos e agregar ainda mais conhecimento a minha formação. Assim como aos demais professores da UNIPAMPA que participaram de alguma forma desta caminhada.

Agradeço ao professor Gilson A. Pessoa e a toda equipe do Embryolab - UFSM, pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho. E à todas as propriedades parceiras que abriram suas porteiras e possibilitaram a realização deste trabalho.

Agradeço a CAPES, pela bolsa de estudos que foi muito importante durante todo o período do mestrado. E também as empresas parceiras Ourofino e Zoetis, pelo financiamento parcial dos protocolos hormonais utilizados no desenvolvimento dos experimentos.

Agradeço de coração a todos que mencionei aqui e aos que talvez tenha esquecido. Espero de alguma forma ter contribuído um pouco no caminho de cada um, da mesma forma que todos foram fundamentais no meu.

Muito Obrigada!

## RESUMO

A gonadotrofina coriônica equina (eCG) é comumente utilizada nos protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) no momento da remoção do dispositivo de P4, com o intuito de estimular o crescimento final, maturação e ovulação do folículo dominante. Há relatos de que esta gonadotrofina permanece ativa na circulação por 5 a 7 dias após sua aplicação. Além disso, também se busca adequar a dose deste hormônio para as diferentes categorias animais e grupos genéticos. Este estudo objetivou avaliar os efeitos da antecipação, redução e fracionamento da dose de eCG em protocolos de IATF, sobre o crescimento folicular, taxas de cio e prenhez de vacas de corte em anestro pós-parto. Foram realizados 3 experimentos com vacas taurinas, multíparas, com cria ao pé e em média 60 dias de pós-parto, acíclicas submetidas à protocolos de sincronização da ovulação para IATF. Em todos os experimentos no D0 os animais receberam um dispositivo intravaginal de P4 e 2mg de BE. No experimento 1, 81 animais foram divididos em 4 grupos: G300D9 (n=20), G200D7 (n=21), G300D8 (n=20) e G200D6 (n=20). Nos grupos G300D9 e G200D7 o dispositivo de P4 permaneceu por 9 dias e administrou-se 25 mg de cloprostenol no D7. No D9 removeu-se o dispositivo de P4 e administrou-se 0,6mg de CE. O grupo G300D9 recebeu 300UI de eCG no D9 e o grupo G200D7, 200UI de eCG no D7. Nos grupos G300D8 e G200D6 o dispositivo de P4 permaneceu por 8 dias e administrou-se 25 mg de cloprostenol no D7. No D8 removeu-se o dispositivo de P4 e administrou-se 0,6mg de CE. O grupo G300D8 recebeu 300UI de eCG no D8 e o grupo G200D6, 200UI de eCG no D6. No experimento 2, 449 fêmeas receberam 12,5mg de dinoprost trometamina no D7 e 0,6mg de CE no D9 associado à remoção do dispositivo P4. As vacas cíclicas (n=326) e grupo G300D9 (n=130) receberam 300UI de eCG no D9. O grupo G200D7 (n=167) recebeu 200UI de eCG no D7. E o grupo G200+100 (n=152) recebeu 200UI de eCG no D7 mais 100UI no D9. No experimento 3, 618 animais receberam o mesmo protocolo de sincronização da ovulação utilizado no experimento 2. Também foram utilizados os mesmos grupos de tratamento (Cíclicas, n=152; G300D9, n=161; G200D7, n=154; G200+100, n=153) com a adição do grupo G300D7 que recebeu 300UI de eCG no D7. Em todos os experimentos, aplicou-se bastão de cera marcador na base da cauda no momento da remoção do dispositivo de P4 para avaliar a ocorrência do estro no momento da IATF que foi realizada 48h após a remoção do dispositivo de P4. Realizou-se a medição do diâmetro do FD por ultrassonografia transretal, no momento da remoção do dispositivo de P4 e da IATF nos experimentos 1, 2 e 3, e no experimento 3 esta avaliação também foi realizada no D7. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a



IATF. A análise estatística foi realizada usando os modelos GLM de STATISTICA 13.3 (TIBCO Software) para Windows ( $P < 0,05$ ). No experimento 1, os grupos G300D9 e G200D7 apresentaram maior diâmetro do FD que os grupos G300D8 e G200D6, tanto na retirada do dispositivo P4, quanto no momento da IATF (G300D9=10,38 e 14,53; G200D7=10,46 e 14,74; G300D8=9,87 e 13,16; G200D6=10,34 e 14,01 respectivamente;  $P < 0,05$ ). Além disso, apresentaram também maior taxa de crescimento folicular entre esses dois momentos (G300D9=1,49; G200D7=1,60; G300D8=1,28; G200D6=1,60 respectivamente;  $P < 0,05$ ). No experimento 2, o diâmetro do FD na retirada do dispositivo de P4, na IATF e a taxa de crescimento folicular não diferiram entre os grupos de tratamento ( $P > 0,05$ ). No experimento 3, a antecipação da aplicação da eCG proporcionou maior diâmetro do FD no momento da retirada do dispositivo de P4 e maior taxa de crescimento folicular entre os dias 7 e 9 (Cíclicas=10,0, 1,4; G300D9=9,8, 1,4; G200D7=10,1, 1,6; G200+100=10,3, 1,8; G300D7=10,4, 1,8;  $P=0,04$  e  $P=0,03$ , respectivamente). O diâmetro do FD no momento da IATF foi semelhante entre os tratamentos ( $P=0,14$ ). As taxas de demonstração de estro e prenhez foram superiores nas vacas cíclicas e o grupo de tratamento que recebeu a dose de eCG fracionada (G200+100) demonstrou resultado similar a estas, tanto no experimento 2 como no experimento 3 (Experimento 2 – Cíclicas=85,3% e 63,5%; G300D9=68,5% e 45,4%; G200D7=71,9% e 50,3%; G200+100=75,0% e 51,3%, respectivamente;  $P < 0,05$ . Experimento 3 - Cíclicas=82,2% e 61,1%; G300D9=67,7% e 38,5%; G300D7=72,0% e 41,3%; G200D7=64,3% e 35,7%; G200+100=68,0% e 42,5%, respectivamente;  $P < 0,05$ ). Em conclusão, a utilização da dose fracionada de eCG possibilitou taxa de prenhez similar a das vacas cíclicas, demonstrando potencial de induzir em vacas em anestro pós-parto, resultado similar ao de animais que já reestabeleceram o ambiente hormonal adequado naturalmente. A antecipação de 300UI ou 200UI de eCG proporcionou taxas de crescimento folicular, demonstração de estro e prenhez semelhantes ao tratamento convencional no momento da retirada do dispositivo de P4. Apesar de não incrementar os índices de prenhez como esperado, a antecipação de 200UI de eCG pode ser utilizada para reduzir o custo do programa reprodutivo, visto que a eCG é o hormônio de maior custo no protocolo de IATF.

**Palavras-chave:** *Bos taurus*. Gonadotrofina Coriônica Equina. Crescimento folicular. Taxa de prenhez

## ABSTRACT

Equine chorionic gonadotropin (eCG) is commonly used in fixed-time artificial insemination (FTAI) protocols at the P4 device removal, in order to stimulate the final growth, maturation and ovulation of the dominant follicle. There are reports that this gonadotropin remains active in the circulation for 5 to 7 days after its application. In addition, it is also sought to adapt the dose of this hormone to the different animal categories and genetic groups. This study aimed to evaluate the effects of anticipation, reduction and fractionation of the eCG dose in FTAI protocols, on follicular growth, estrus and pregnancy rates of beef cows in postpartum anestrus. Three experiments were carried out with suckled anestrus taurine cows, multiparous, with mean of 60 days postpartum. In all experiments at D0 the animals received an intravaginal device of P4 and 2mg of EB. In experiment 1, 81 animals were divided into 4 groups: G300D9 (n=20), G200D7 (n=21), G300D8 (n=20) and G200D6 (n=20). In groups G300D9 and G200D7 the P4 device remained for 9 days and 25 mg of cloprostenol was administered on D7. On D9, the P4 device was removed and 0.6 mg of EC was administered. The cows of the G300D9 group received 300UI of eCG on D9 and those in G200D7 group, received 200UI of eCG on D7. In groups G300D8 and G200D6 the P4 device remained for 8 days and 25 mg of cloprostenol was administered on D7. On D8, the P4 device was removed and 0.6 mg of EC was administered. The cows of the G300D8 group received 300UI of eCG on the D8 and those in the G200D6 group received 200UI of eCG on the D6. In experiment 2, 449 females received 12.5 mg of dinoprost tromethamine on D7 and 0.6 mg of EC on D9 associated with the removal of the P4 device. Cyclic cows (n=326) and those of the group G300D9 (n=130) received 300UI of eCG at D9. The animals of the G200D7 group (n=167) received 200UI of eCG at D7. And those of the G200+100 group (n=152) received 200UI of eCG in D7 plus 100UI in D9. In experiment 3, 618 animals received the same ovulation synchronization protocol used in experiment 2. The same treatment groups were also used (Cyclic, n=152; G300D9, n=161; G200D7, n=154; G200+100, n=153) with the addition of the G300D7 group in which the cows received 300UI of eCG in D7. In all experiments, cows had their tailheads marked with chalk at the time of removal of the P4 device to assess the occurrence of estrus at FTAI, which was performed 48 hours after the removal of the P4 device. The measurement of the diameter of the FD by transrectal ultrasound was performed at P4 device removal and at FTAI in experiments 1, 2 and 3, and in experiment 3 this assessment was also carried out on D7. The pregnancy diagnosis was made 30 days after FTAI. The statistical analysis was performed using the GLM models

of STATISTICA 13.3 (TIBCO Software) for Windows ( $P < 0.05$ ). In experiment 1, the groups G300D9 and G200D7 had a larger DF diameter than the groups G300D8 and G200D6, at P4 device removal and at FTAI (G300D9= 10.38 and 14.53; G200D7= 10.46 and 14.74; G300D8= 9.87 and 13.16; G200D6= 10.34 and 14.01 respectively;  $P < 0.05$ ). In addition, they also showed a higher follicular growth rate between these two moments (G300D9= 1.49; G200D7= 1.60; G300D8= 1.28; G200D6= 1.60 respectively;  $P < 0.05$ ). In experiment 2, the DF diameter at P4 device removal, at FTAI and the follicular growth rate did not differ between the treatment groups ( $P > 0.05$ ). In experiment 3, the anticipation of eCG application provided a larger DF diameter at P4 device removal and a higher follicular growth rate between days 7 and 9 (Cyclic= 10.0, 1.4; G300D9= 9.8, 1.4; G200D7= 10.1, 1.6; G200+100= 10.3, 1.8; G300D7= 10.4, 1.8;  $P=0.04$  and  $P=0.03$ , respectively). The DF diameter at FTAI was similar between treatment groups ( $P=0.14$ ). The estrus and pregnancy rates were higher in Cyclic cows and the treatment group that received the fractionated eCG dose (G200+100) demonstrated a result similar to these, both in experiment 2 and in experiment 3 (Experiment 2 - Cyclic = 85.3% and 63.5%; G300D9 = 68.5% and 45.4%; G200D7 = 71.9% and 50.3%; G200 + 100 = 75.0% and 51.3%, respectively;  $P < 0.05$ . Experiment 3 - Cyclic = 82.2% and 61.1%; G300D9 = 67.7% and 38.5%; G300D7 = 72.0% and 41.3%; G200D7 = 64.3 % and 35.7%; G200 + 100 = 68.0% and 42.5%, respectively;  $P < 0.05$ ). In conclusion, the use of the fractional dose of eCG enabled a pregnancy rate similar to that of cyclic cows, demonstrating the potential to induce cows in postpartum anestrus a result similar to that of animals that have already reestablished the adequate hormonal environment naturally. The anticipation of 300UI or 200UI of eCG provided rates of follicular growth, estrus and pregnancy rates similar to conventional treatment at the P4 device removal. Although not increasing pregnancy rates as expected, anticipating 200UI of eCG can be used to reduce the cost of the reproductive program, since eCG is the most costly hormone in the FTAI protocol.

**Keywords:** *Bos taurus*. Equine chorionic gonadotropin. Follicular growth. Pregnancy rate.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 1.</b> Experimental design 1.....                                                                                                                                                                                               | 30 |
| <b>Figure 2.</b> Experimental design 2.....                                                                                                                                                                                               | 31 |
| <b>Figure 3.</b> Experimental design 3.....                                                                                                                                                                                               | 33 |
| <b>Figure 4.</b> Experiment 2 - occurrence of estrus and pregnancy per artificial insemination (P/AI) in taurine suckled beef cows according to treatment with different doses and time of administration of eCG at the TAI protocol..... | 36 |
| <b>Figure 5.</b> Experiment 3 - occurrence of estrus and pregnancy per artificial insemination (P/AI) in taurine suckled beef cows according to treatment with different doses and time of administration of eCG at the TAI protocol..... | 38 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Table 1.</b> Descriptive analyses according to the different lots.....                                                                                                                                                                       | 28 |
| <b>Table 2.</b> Experiment 1 - reproductive response of suckled beef cows in postpartum anestrus after TAI, according to the P4 device permanence, time of application and eCG dose .....                                                       | 35 |
| <b>Table 3.</b> Experiment 3 - ovarian follicular growth of taurine suckled beef cows in postpartum anestrus in response to different moment of administration and dose of eCG, at the TAI protocol.....                                        | 37 |
| <b>Table 4.</b> Experiment 3 - pregnancy rates of taurine suckled beef cows in postpartum anestrus according to the BCS and presence or absence of a corpus luteum at the beginning of TAI protocol, and the estrus occurrence rate at TAI..... | 38 |

## SUMÁRIO

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO .....                                                                    | 13 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA .....                                                         | 15 |
| 2.1 Ciclo estral em bovinos.....                                                      | 15 |
| 2.2 Anestro pós-parto em vacas de corte .....                                         | 17 |
| 2.3 Programa de Inseminação Artificial em tempo Fixo .....                            | 19 |
| 2.4 A importância da eCG nos protocolos de Inseminação Artificial em Tempo Fixo ..... | 20 |
| 3 OBJETIVOS .....                                                                     | 23 |
| 3.1 Objetivo geral.....                                                               | 23 |
| 3.2 Objetivos específicos .....                                                       | 23 |
| 4 ARTIGO CIENTÍFICO .....                                                             | 24 |
| 5 CONCLUSÃO.....                                                                      | 48 |
| 6 PERSPECTIVAS.....                                                                   | 49 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                    | 50 |

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2020), em 2019 o rebanho bovino nacional foi estimado em aproximadamente 214,7 milhões de cabeças, caracterizando-se como o maior rebanho comercial do mundo. Deste total, foram abatidas 43,3 milhões de cabeças e produziu-se em torno de 10,5 milhões de toneladas equivalentes de carcaça (TEC), a segunda maior produção mundial. O Brasil também ocupa o 1º lugar no ranking mundial de exportação de carne bovina, com aproximadamente 2,5 milhões TEC exportadas em 2019 (ABIEC, 2020). Apesar do cenário positivo, quando se considera o rebanho expressivo e a vasta área disponível para criação (em torno de 160 milhões de hectares), se torna evidente que o Brasil possui um potencial de produção maior do que apresenta atualmente. Neste sentido, sabe-se que os índices de produção estão intimamente relacionados com a eficiência reprodutiva das fêmeas bovinas (BARUSELLI et al., 2018). E também, que um manejo reprodutivo eficiente é uma importante ferramenta para produzir maior quantidade de carne na mesma extensão de terra.

A eficiência reprodutiva pode ser definida como a capacidade das fêmeas bovinas de produzir um terneiro por ano. Para isto, as mesmas devem se tornar gestantes com até 75 a 85 dias pós-parto, com o mínimo de coberturas e respeitando o período de involução uterina (CROWE et al., 2014). Um dos principais fatores que afetam a eficiência reprodutiva do rebanho é o anestro pós-parto prolongado, causado pela má condição nutricional das matrizes, pela lactação e presença do terneiro. Estas condições atuam via *feedback* negativo sobre o hipotálamo, reduzindo a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e consequentemente bloqueando a liberação do hormônio luteinizante (LH). A deficiência de LH impede o crescimento, maturação final e ovulação do folículo dominante (FD), retardando o restabelecimento da ciclicidade (GONÇALVES et al., 2004; YAVAS; WALTON, 2000). Desta forma, se faz necessário utilizar ferramentas que contribuam para acelerar o retorno da atividade ovariana no pós-parto.

Os protocolos de sincronização do estro e da ovulação para Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) são técnicas consagradas por excluir a necessidade de detecção de estro, possibilitando a inseminação de um grande número de fêmeas (incluindo as acíclicas), em um curto período de tempo. Atualmente, os protocolos hormonais mais utilizados para bovinos de corte na América do Sul são baseados em estradiol (E2) e progesterona (P4; BÓ; BARUSELLI, 2014).

Dentro dos protocolos hormonais a Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) é comumente utilizada no momento da retirada do dispositivo de P4 (BÓ; BARUSELLI, 2014). Este hormônio possui duas características importantes que são sua ação semelhante às gonadotrofinas hipofisárias (FSH e LH) e sua meia vida longa (há relatos da sua permanência na circulação por até 120 horas após a aplicação) (MENZER; SCHAMS, 1979; MURPHY; MARTINUK, 1991; SCHAMS et al., 1978; SIDDIQUI et al., 2002). Devido a estas características, o objetivo da utilização desta gonadotrofina nos protocolos de IATF é estimular o crescimento, maturação final e ovulação do FD, principalmente nas fêmeas em anestro e com baixa condição nutricional (PESSOA et al., 2016; PITALUGA et al., 2013; SÁ FILHO et al., 2010a, 2010b).

Tendo em vista sua importância no protocolo hormonal, a eCG ainda é alvo de diversos estudos que visam determinar a dose (NÚÑEZ-OLIVEIRA et al., 2014; PESSOA et al., 2016; PINTO et al., 2020) e momento de administração (ALVAREZ et al., 2018; ARAÚJO et al., 2019; ROMAN et al., 2016; TORTORELLA et al., 2013; VELASQUEZ et al., 2016) mais eficientes desta gonadotrofina. No início dos estudos para desenvolvimento dos protocolos de IATF a eCG já foi utilizada antes da remoção do dispositivo de P4 (BASTOS et al., 2004). E mais recentemente, estudos foram desenvolvidos neste sentido, com resultados variáveis para vacas de corte e leite em diferentes condições fisiológicas submetidas a diferentes protocolos hormonais (ARAÚJO et al., 2019; TORTORELLA et al., 2013).

Com base nas características de ação e meia-vida longa da eCG associado aos resultados já existentes, acredita-se que a antecipação da dose de eCG para antes da remoção da fonte exógena de P4 possa contribuir para um maior período de ação (de 48h para 96h) e consequentemente, potencialização de seus efeitos no protocolo de IATF. Por isto, o objetivo deste estudo foi determinar os efeitos da antecipação, redução e fracionamento da dose de eCG sobre o desenvolvimento folicular, taxas de cio e prenhez de vacas de corte taurinas em anestro pós-parto.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Ciclo estral em bovinos

O ciclo estral é caracterizado por um padrão cíclico de atividade ovariana envolvendo uma sequência de eventos endócrinos, morfológicos e comportamentais, que permitem o acasalamento e possível estabelecimento de uma gestação (FORDE et al., 2011; HAFEZ; HAFEZ, 2004). Nas fêmeas bovinas, tem duração média de 21 dias podendo variar de 18 a 24 dias. Neste período, os folículos ovarianos se desenvolvem em um padrão denominado ondas de crescimento folicular, podendo haver de 2 a 4 ondas por ciclo. Cada onda envolve a emergência, seleção e dominância, culminando em atresia ou ovulação dos folículos em crescimento (ADAMS; SINGH, 2014; AERTS; BOLS, 2010).

O ciclo pode ser dividido clinicamente em fase luteal e folicular. A fase luteal (14 a 18 dias) inicia-se após a ovulação e é caracterizada pela formação e atividade plena do corpo lúteo (CL) apresentando altas concentrações séricas de P4. A fase folicular (4 a 6 dias) compreende o período entre a lise do CL (luteólise) e uma nova ovulação. É caracterizada pelo desenvolvimento final do folículo dominante e altas concentrações de E2 (FORDE et al., 2011).

Os eventos que acontecem durante o ciclo estral (crescimento folicular, luteólise, ovulação e luteinização) são regulados principalmente por hormônios endócrinos do hipotálamo (GnRH), hipófise anterior (FSH e LH), ovários (P4, E2, inibina) e útero (prostaglandina F2 $\alpha$  - PGF) (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

A ovulação pode ser considerada como o dia zero (D0) do ciclo estral e marca o início da fase luteal. Após este evento, ocorre formação do CL que produz P4 e eleva as concentrações desse hormônio na circulação. Simultaneamente, um pico de FSH promove a emergência de um grupo de folículos (<5 mm de diâmetro), caracterizando uma nova onda de crescimento folicular (AMSTALDEN; WILLIAMS, 2014; MIHM; BLEACH, 2003). Por cerca de 2 a 3 dias após a emergência, este grupo de folículos cresce simultaneamente (BARUSELLI; GIMENES; SALES, 2007) até que, na grande maioria dos ciclos, um único folículo é selecionado para continuar seu desenvolvimento. O mecanismo de seleção e divergência do FD ainda não está completamente elucidado, mas tem sido relacionado com uma maior taxa de crescimento, maior produção de E2, maior expressão de receptores de LH deste em relação aos subordinados (AERTS; BOLS, 2010; FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004; GINTHER, 2016; SARTORI et

al., 2001). A divergência folicular ocorre em torno de 2,5 e 2,8 dias após a ovulação, quando o FD atinge aproximadamente 6 mm e 8,5 mm de diâmetro, para fêmeas *Bos indicus* (GIMENES et al., 2008; SARTORELLI et al., 2005) e *Bos taurus* (GINTHER et al., 1996) respectivamente.

A medida que o FD aumenta de tamanho, também aumenta a quantidade de receptores de LH nas células da teca e da granulosa e este passa a responder ao estímulo do LH para continuar seu desenvolvimento. Este aumento de tamanho também eleva as concentrações de E2 e inibina no fluido folicular. O E2 e a inibina atuam via *feedback* negativo sobre a hipófise anterior e suprimem a liberação de FSH, fazendo com que os folículos subordinados que são dependentes deste hormônio entrem em atresia (FORDE et al., 2011).

Os folículos que se desenvolvem na presença do CL e no ambiente de altas concentrações de P4 que este produz, não chegam a ovulação. A presença da P4 atua via *feedback* negativo sobre o hipotálamo, bloqueando a liberação de GnRH e consequentemente impedindo que o LH seja liberado na amplitude e frequência necessários para a ovulação (AMSTALDEN; WILLIAMS, 2014; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). Independentemente do número de ondas que se desenvolvem durante o ciclo, somente o FD da última onda chegará a ovulação.

A principal função do CL e da P4 durante o ciclo estral é estar presente em concentrações suficientes para manter a gestação. Se por volta dos 16 a 18 dias do ciclo estral o sinal para reconhecimento materno da gestação não for identificado (interferon-tau produzido e liberado pelo embrião), o útero libera PGF que provoca a lise do CL e consequentemente, a queda das concentrações de P4 para níveis basais (AMSTALDEN; WILLIAMS, 2014; FORDE et al., 2011).

A luteólise marca o início da fase folicular do ciclo estral. A partir deste evento, ocorre a queda das concentrações de P4 e o aumento das concentrações de E2, devido a intensa proliferação do FD presente no ovário. O pico de E2 induz a manifestação do comportamento estral, quando as fêmeas se tornam receptivas ao macho e aceitam a monta. Além disso, o E2 atua sobre o hipotálamo via *feedback* positivo e estimula a secreção de GnRH (FORDE et al., 2011). O GnRH por sua vez, atua sobre a hipófise anterior e promove a liberação de LH em amplitude e frequência suficientes (um pulso a cada 40-70 minutos por 2 a 3 dias) para a ovulação do folículo dominante (AMSTALDEN; WILLIAMS, 2014; FORDE et al., 2011; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008; HAFEZ; HAFEZ, 2004). A ovulação ocorre de 10 a 14 horas após a demonstração do estro e coincide com o início de um novo ciclo estral (FORDE et al., 2011).

O FD adquire capacidade ovulatória ao atingir aproximadamente 8 e 10 mm de diâmetro em fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus*, respectivamente (GIMENES et al., 2008; SARTORI et al., 2001). Porém, a ovulação ocorre quando este folículo atinge 10-12 mm e 14-20 mm de diâmetro para estes mesmos grupos genéticos (BÓ; BARUSELLI; MARTINEZ, 2003).

O maior diâmetro folicular no momento da ovulação está relacionado à maiores concentrações séricas de E2 no período pré-ovulatório (PERRY et al., 2005; 2014; VASCONCELOS et al., 2001). Isto parece ter influência positiva sobre as taxas de demonstração de estro (SÁ FILHO et al., 2010a), preparação do ambiente uterino (PERRY; PERRY, 2008) e transporte dos gametas neste ambiente (HAWK, 1983), proporcionando maiores taxas de concepção (PERRY et al., 2005; 2014; SÁ FILHO et al., 2010a). A ovulação de folículos maiores também possibilita a formação de um CL de maior volume, que está relacionado a maiores concentrações de P4 após a ovulação (MUSSARD et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2001) e maior probabilidade de sobrevivência embrionária/fetal (COOKE et al., 2019; PERRY et al., 2005).

## 2.2 Anestro pós-parto em vacas de corte

A eficiência reprodutiva é caracterizada pela produção de um terneiro/vaca/ano. Considerando que a gestação das fêmeas bovinas dura em média de 280 a 290 dias (*Bos taurus* e *Bos indicus*, respectivamente) e o período de involução uterina se prolonga até, aproximadamente 45 dias pós-parto (HAFEZ; HAFEZ, 2004), restam em torno de 30 a 40 dias para que uma nova gestação se estabeleça. Em rebanhos de corte, um dos principais fatores que afetam a eficiência reprodutiva é o anestro pós-parto prolongado (BARUSELLI et al., 2004; GONÇALVES et al., 2004).

Na fêmea bovina, o anestro pós-parto pode ser definido como o período entre a parição e o reestabelecimento da atividade ovariana cíclica normal. A duração desta condição é dependente de diversos fatores ambientais, genéticos, fisiológicos e metabólicos (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Nas vacas de corte, o estado nutricional, a lactação e a presença do terneiro são considerados as principais causas de prolongamento do anestro no período pós-parto.

Durante a gestação, os pulsos de FSH e a emergência de ondas de crescimento folicular se mantém, até em torno de 21 dias pré-parto (ADAMS; SINGH, 2014). A partir daí os altos níveis de P4 e E2 provenientes do ovário e da placenta provocam um intenso *feedback* negativo

sobre o hipotálamo e a hipófise anterior, suprimindo a produção e secreção de GnRH, FSH e LH e cessando a atividade ovariana (AMSTALDEN; WILLIAMS, 2014; YAVAS; WLATON, 2000). Após o parto, a pulsatilidade de FSH se reestabelece rapidamente e em torno de 10 dias as ondas de crescimento folicular recomeçam (GONÇALVES et al., 2004; WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002). Porém, a ovulação do folículo dominante depende do reestabelecimento do estoque de LH na hipófise anterior, que se esgota durante a gestação. A frequência e amplitude de liberação deste hormônio aumentam gradualmente, atingindo as concentrações necessárias para a ovulação em torno de 25 a 30 dias pós-parto (YAVAS; WLATON, 2000). Desta forma, pode-se dizer que em condições fisiológicas normais, a atividade ovariana das fêmeas bovinas pode ser retomada por volta dos 30 dias pós-parto. No entanto, conforme exposto acima, alguns fatores podem prolongar este período.

Em condições de restrição nutricional, como no período pós-parto inicial ou em sistemas de criação extensivos com pastagens de baixa qualidade, as vacas passam por um período de balanço energético negativo. Este é caracterizado pela redução de glicose disponível e consequentemente, mobilização das reservas corporais para manutenção das funções corporais básicas. O metabolismo basal, atividade, crescimento e reservas básicas de energia são priorizadas frente às funções reprodutivas e a ciclicidade é comprometida (MEIKLE et al., 2018; YAVAS; WLATON, 2000). Vários estudos destacam a importância da condição nutricional das fêmeas no pré e pós-parto. Animais com maior escore de condição corporal (ECC) apresentam menor intervalo entre o parto e a primeira ovulação (D'OCCHIO; BARUSELLI; CAMPANILE, 2019; EMERICK et al., 2009; MEIKLE et al., 2018). O comprometimento da condição nutricional está associado a uma redução da liberação de GnRH pelo hipotálamo e consequentemente, diminuição na frequência de pulsos de LH (BARUSELLI; GIMENES; SALES, 2007; WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002; YAVAS; WLATON, 2000).

Outros fatores que impactam o retorno da atividade ovariana no pós-parto são a lactação e a presença do terneiro. A partir do momento em que os estoques de LH são reestabelecidos na hipófise anterior, estes fatores também parecem afetar a duração do anestro pós-parto através da redução da liberação de GnRH e secreção de LH (BARUSELLI; GIMENES; SALES, 2007). Não somente a amamentação propriamente dita, mas também os estímulos visuais e olfatórios da presença da cria demonstram ter efeito sobre a liberação de LH pela hipófise anterior (EMERICK et al., 2009).

Os impactos sobre a secreção de LH causados pelas diferentes condições citadas, resultam em falha no crescimento final e maturação do folículo dominante, ocasionando a não

ovulação ou ovulação de folículos pequenos e imaturos que iniciam novos ciclos de curta duração (YAVAS; WLATON, 2000). Desta forma estes eventos impactam a duração do anestro pós-parto e consequentemente, a eficiência reprodutiva do rebanho.

### 2.3 Programas de Inseminação Artificial em tempo Fixo

O anestro pós-parto prolongado é considerado um dos principais fatores que impacta negativamente o desempenho reprodutivo das fêmeas bovinas. Uma alternativa para contornar esta condição é a utilização de protocolos hormonais que sincronizam a ovulação para IATF. Existem dois tipos de tratamentos hormonais para este fim, àqueles baseados em GnRH que são mais utilizados na América do Norte, Europa e Nova Zelândia ou as associações de P4 e E2 que são mais utilizadas na América do Sul, para vacas de corte (BARUSELLI et al., 2004; BÓ et al., 2016).

Os programas hormonais que associam P4 e E2 em geral, consistem na inserção de um dispositivo intravaginal de liberação lenta de P4 (DIP) e administração de 2mg de benzoato de estradiol (BE) no D0 (para induzir atresia e sincronizar o crescimento de uma nova onda de crescimento folicular). Uma dose de um análogo de PGF (cloprostenol ou dinoprost trometamina) no momento da retirada do DIP (para promover a luteólise), associada a aplicação de um indutor da ovulação neste mesmo momento ou algumas horas após, dependendo do princípio (cipionato de estradiol - CE; BE ou GnRH) (BÓ et al., 2016).

Estes protocolos vêm sendo estudados e desenvolvidos há mais de 40 anos (LAMB et al., 2009), para serem adaptados às diferentes condições fisiológicas dos grupos genéticos (*Bos indicus* e *Bos taurus*) e das categorias animais que compõem um rebanho. Por isso, existem pequenas variações no tempo de permanência do DIP, momento de administração do análogo de PGF, princípio ativo, dose e momento de administração do indutor de ovulação.

O tempo de permanência do DIP pode variar de 5 a 9 dias. Durante este período, o dispositivo mantém as concentrações de P4 em níveis subluteais, estimulando o aumento de pulsos de LH e o crescimento do folículo dominante, mesmo em vacas em anestro (DAY, 2004). Uma série de estudos já realizados demonstraram não haver influência significativa do tempo de permanência do DIP sobre o desempenho reprodutivo de novilhas e vacas de corte lactantes, apesar de o tratamento por 9 dias apresentar maiores taxas de demonstração de estro em alguns casos (SANTOS M. H. et al., 2018; PRATA et al., 2020; SANTOS R. et al., 2018).

A administração dos análogos de PGF pode ser feita 48h antes ou no momento da retirada do DIP, ou ainda dividida em meia dose no momento de inserção e a outra meia dose no momento da retirada do DIP. Os benefícios da antecipação da luteólise parecem ser mais evidentes para as fêmeas que se encontram cíclicas no início do protocolo de IATF, pois ocorre a redução dos níveis de P4 endógena (CAVALIERI; GAINA; HEPWORTH, 2018). Carvalho et al. (2008) demonstraram que novilhas *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus* e *Bos taurus* cíclicas, apresentaram maior diâmetro do folículo dominante e maiores taxas de ovulação quando receberam uma dose de dinoprost trometamina na inserção e na remoção do DIP, ao invés de somente na remoção. Núñez-Oliveira, Cuadro e Menchaca, (2019) obtiveram resultados semelhantes em novilhas *Bos taurus*. Peres et al. (2009) também demonstraram que novilhas pós-púberes e vacas não lactantes que receberam PGF 48h antes da remoção do DIP, apresentaram maior folículo dominante no momento da IATF, maiores taxas de ovulação, concepção e prenhez.

Com relação ao indutor de ovulação, Sá Filho et al. (2011) obtiveram resultados semelhantes de prenhez quando utilizaram 1mg de BE 24h após a remoção da P4, 0,5mg de CE no momento da retirada da P4 ou 100µg de gonadorelina (análogo de GnRH) no momento da IATF, concluindo que os três princípios podem ser utilizados para este fim em protocolos de IATF.

Além dos tratamentos citados acima, um fator essencial que contribui para diminuir o intervalo parto-concepção e aumentar as taxas de prenhez, principalmente de vacas em anestro, é a utilização da Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG). Atualmente, este hormônio é utilizado no momento da retirada do DIP, com o intuito de promover crescimento e maturação final do folículo dominante. Por ser o foco deste trabalho, os mecanismos de ação, funções e benefícios desta gonadotrofina serão explorados no tópico a seguir.

## **2.4 A importância da eCG nos protocolos de Inseminação Artificial em Tempo Fixo**

A eCG é uma glicoproteína produzida pelos cálices endometriais das fêmeas equinas, entre 40 e 130 dias de gestação. Nesta espécie, causa a ovulação ou luteinização de folículos formando corpos lúteos acessórios, que elevam as concentrações de P4 contribuindo para a manutenção da gestação. Quando aplicada em outras espécies, atua com função de LH e FSH

estimulando crescimento e maturação folicular, para posterior ovulação (MURPHY; MARTINUK, 1991; MURPHY, 2012).

Esta molécula é composta por duas subunidades,  $\alpha$  - com 96 aminoácidos e  $\beta$  - com 149 aminoácidos e grande quantidade de carboidratos (destacando-se o ácido siálico). Estas características conferem a eCG um alto peso molecular e uma meia-vida longa (MURPHY; MARTINUK, 1991; MURPHY, 2012). Estudos relatam que a meia-vida da eCG em bovinos é de aproximadamente 48 horas. No entanto, há relatos da sua permanência na circulação por até 120 horas após a aplicação (MENZER; SCHAMS et al., 1978; SCHAMS, 1979; SIDDIQUI et al., 2002).

Em protocolos de IATF aplicados à bovinos a eCG é atualmente utilizada no momento da retirada do dispositivo de P4. Como benefícios de sua utilização, estudos desenvolvidos demonstraram o aumento na taxa de crescimento folicular, maior diâmetro folicular no momento da IATF, aumento nas taxas de demonstração de cio e prenhez (SÁ FILHO et al., 2010b; SALES et al., 2016; SILVA FILHO et al., 2013; PESSOA et al., 2016). E estes efeitos são observados principalmente em fêmeas lactantes, em anestro pós-parto, e com baixo ECC (BARUSELLI et al., 2004; BARUSELLI et al., 2008).

Outros estudos mostraram que a aplicação de eCG em programas hormonais também tem efeitos significativos sobre o CL formado após a ovulação. Pitaluga et al. (2013) e Alvarez et al. (2018) demonstraram que vacas lactantes apresentaram CL com maior área e vascularização quando tratadas com eCG. Sá Filho et al. (2010c) obtiveram resultados semelhantes em novilhas que apresentaram ainda, maiores concentrações circulantes de P4. Estes fatores parecem estar relacionados a alterações morfológicas como, maior proliferação das células luteais grandes e pequenas e angiogenese (MOURA et al., 2015; RIGOGGIO et al., 2013; SOUZA et al., 2016). Além disto, a ação estimulatória da eCG também foi associada a alterações na densidade vascular do endométrio e miométrio, que contribuem para melhores índices reprodutivos (MONA E PINTO et al., 2014).

Com relação a dose utilizada no momento da remoção do dispositivo de P4, inicialmente utilizava-se 400UI de eCG (BARUSELLI et al., 2008; NÚÑEZ-OLIVEIRA et al., 2014). Porém, estudos recentes mostram que esta dose pode ser reduzida para 200UI em novilhas (PERES et al., 2009) e vacas *Bos indicus* (DOROTEU et al., 2015), para 200UI em novilhas *Bos Taurus* (PINTO et al., 2020), e 300UI em vacas *Bos taurus* (PESSOA et al. 2016) sem qualquer prejuízo no desempenho reprodutivo. A importância do ajuste da dose de eCG utilizada está relacionada ao custo elevado desta gonadotrofina, sendo que a dose de 300UI representa entre 40 e 50% do valor total do protocolo hormonal utilizado para IATF.

Em estudos iniciais realizados para desenvolvimento dos protocolos de IATF, a eCG já foi utilizada antes da remoção da fonte exógena de P4 (BASTOS et al., 2004). Posteriormente, visando explorar sua característica de meia-vida longa, alguns estudos recentes vêm sendo desenvolvidos para determinar os efeitos da antecipação deste hormônio. Tortorella et al. (2013) avaliaram o efeito de 400UI de eCG administrada 48h (D6) antes da remoção do dispositivo de P4 em vacas taurinas em anestro pós-parto. A antecipação da eCG resultou em maior diâmetro folicular no momento da aplicação do indutor de ovulação (GnRH) no D9, maior volume do CL e concentrações séricas de P4 nos dias 10 e 15 após a IATF. Ainda, apesar das taxas de prenhez terem sido baixas em geral (eCG no D6=27,3% e eCG no D8=16%;  $P<0,05$ ), o grupo em que a eCG foi antecipada apresentou maiores resultados. Por outro lado, Araújo et al. (2019) obtiveram resultados semelhantes de crescimento e diâmetro folicular, área do corpo lúteo e taxa de prenhez para vacas leiteiras que receberam a administração de eCG no momento da retirada do dispositivo de P4, 24h ou 48h antes.

Diante do exposto, a importância da utilização da eCG em programas de IATF é incontestável, principalmente quando aplicada em animais com a liberação de gonadotrofinas comprometida por qualquer fator citado anteriormente nesta revisão. O histórico de utilização da eCG, sua importância, suas características e os resultados já existentes, levam a crer que mais estudos devem ser desenvolvidos em busca de avaliar alternativas para o momento de administração deste hormônio e adaptações da dose, para que o mesmo possa desenvolver sua função plena em diferentes categorias, condições fisiológicas e grupos genéticos com o melhor custo-benefício.



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito da antecipação, redução e fracionamento da dose de eCG utilizada em protocolos de sincronização da ovulação para IATF aplicados a vacas de corte *Bos taurus*, em anestro pós-parto.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Avaliar o efeito da antecipação (300UI, 48h antes da remoção do dispositivo de P4), redução (200UI, 48h antes da remoção do dispositivo de P4) e fracionamento (200UI, 48h antes da remoção do dispositivo de P4 + 100UI no momento da remoção do dispositivo de P4) da dose de eCG normalmente aplicada no momento da retirada do dispositivo de P4 do protocolo de sincronização da ovulação para IATF, sobre:

- O crescimento do folículo dominante do momento da administração da eCG até a IATF;
- A taxa de demonstração de estro no momento da IATF;
- A taxa de prenhez 30 dias após a IATF.

#### 4 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. As seções *Materiais e Métodos*, *Resultados*, *Discussão e Referências Bibliográficas* encontram-se no próprio manuscrito, que está apresentado da mesma forma que será submetido ao periódico ***Theriogenology***.

**Effect of dose and time of equine chorionic gonadotropin application in fixed-time artificial insemination protocols on ovarian follicular growth and pregnancy rates of suckled beef cows in postpartum anestrus**

**Abstract**

This study aimed to evaluate the effects of anticipation, reduction and fractionation of the eCG dose in FTAI protocols, on follicular growth, estrus and pregnancy rates of suckled beef cows in postpartum anestrus. Three experiments were carried out with *Bos taurus* suckled beef cows, multiparous, on average 60 days postpartum, acyclic. In experiment 1, all animals (n=81) received an intravaginal P4 device and 2mg of BE, at D0. In groups in which the P4 device remained for 8 days, 25 mg of cloprostenol was administered on D6. On D8, the P4 device was removed and 0.6 mg of EC was administered. The G200D6 group (n=20) received 200UI of eCG in D6 and the G300D8 group (n=20) 300UI of eCG in D8. In groups that the P4 device remained for 9 days, 25 mg of cloprostenol was administered on D7. On D9, the P4 device was removed and 0.6 mg of EC was administered. The G200D7 group (n=21) received 200UI of eCG on D7 and the G300D9 group (n=20) received 300UI of eCG on D9. In experiment 2, 449 animals received a P4 device and 2mg of BE in D0, 12.5mg of dinoprost tromethamine in D7 and 0.6mg of EC in D9 associated with the removal of the P4 device. The G300D9 group (n=130) received 300UI of eCG at D9. The G200D7 group (n=167) received 200UI of eCG at D7. And the G200+100 group (n=152) received 200UI of eCG in D7 plus 100UI in D9. In experiment 3, 618 animals were distributed among the same treatment groups (G300D9, n=161; G200D7, n=154; G200+100, n=153) used in experiment 2 with addition of the G300D7 group that received 300UI of eCG in D7. In all experiments, cows had their tail heads marked with chalk at the P4 device removal to assess the estrus occurrence. The FTAI was performed 48h after the P4 device removal. Measurement of DF diameter by ultrasonography was performed at the time of P4 device removal and at FTAI in experiments 1 and 2. And in experiment 3, also in D7. The pregnancy diagnosis was performed 30 days after FTAI. Also, in experiments 2 and 3 the cyclic cows were included as a control group. The statistical analysis was performed using the GLM models of STATISTICA 13.3 (TIBCO Software) for Windows ( $P<0.05$ ). Was observed an effect of P4 device permanence on ovarian follicular growth ( $P<0.05$ ). The anticipation of eCG provided a greater follicular diameter at the P4 device removal ( $P=0.04$ ), and similar at FTAI ( $P=0.14$ ). The estrus and pregnancy rates were higher in cyclic cows and fractionation of the eCG dose (G200+100 group) showed results similar to these (Experiment

2:  $P < 0.05$ ; Experiment 3:  $P = 0.006$  and  $P = 0.01$ , respectively). In conclusion, the anticipation of eCG in the FTAI protocol provided follicular growth, estrus and pregnancy results similar to the conventional treatment, at the P4 device removal. However, fractionation of the eCG dose was able to induced pregnancy rates similar to those of cyclic cows. In addition, the anticipation of 200UI of eCG can be considered as an alternative to be used.

**Keywords:** *Bos Taurus*; eCG; Bovine; Estrus occurrence; Pregnancy rate; FTAI.

## 1. Introduction

Postpartum anestrus is one of the main condition that negatively affects the reproductive performance of beef cattle herds [1]. Increasing the interval between parturition and conception is mainly related to poor nutritional conditions, lactation and the calf presence. These factors impact the release of GnRH and consequently reduce the frequency of LH pulses. Cows under these physiological conditions show impaired ovarian follicular development, without ovulation or with ovulation of small follicles [2–4].

The ovulation synchronization protocols for fixed-time artificial insemination (FTAI) have been widely used to eliminate the need for estrus detection and to allow artificial insemination (AI) of a larger number of animals at the same moment. The protocols that associate progesterone (P4) and estradiol (E2) treatments are most used in South America, for beef cows [1,5]. In these P4 plus E2 based protocols, the use of equine chorionic gonadotrophin (eCG) plays an important role, especially for cows that start a breeding season in anestrus and with poor nutritional condition [1,6].

The eCG is a glycoprotein molecule produced by the cells of the endometrial cups of pregnant mares, between 40 and 130 days of gestation. In this species, it induces the formation of accessory luteal bodies, which increase P4 concentrations, contributing to the maintenance of pregnancy. When applied to other species such as cattle, it has activity of both the follicle stimulating hormone (FSH) and the luteinizing hormone (LH) [7,8]. In addition, this hormone also has a long half-life of approximately 48 hours or more in cattle, with reports of its permanence in the circulation until around 120 hours after application [7,9,10].

In the FTAI protocols for beef cattle, eCG is currently used at the P4 device removal in order to stimulate maturation, final follicular growth, and ovulation and to increase estrus occurrence and pregnancy rates [6]. Due to its importance in the hormonal protocol, many

studies are developed in order to establish the most efficient dose and time of administration of the eCG for different animal categories. The most used dose initially was 400IU [1,6,11] but it has already been demonstrated that the dose of 200IU for *Bos indicus* heifers and cows [12,13] and for *Bos taurus* heifers [14] can be used with similar results. In the same way, the dose of 300 IU was used for *Bos taurus* cows [15]. Also, due to its characteristic of long half-life, some studies have also been developed anticipating the eCG dose to before the P4 device removal with varied results [16,17].

Based on the important eCG characteristics and the results of studies already carried out that demonstrate that adjustments in dosage and time of administration are important, our hypothesis is that the anticipation of the eCG dose to before the P4 device removal will allow its benefits to be enhanced and also to reduce the dose to 200IU. The present study aims to evaluate the effects 1) of the anticipation of eCG (300IU) administration for 48 hours before removal of the P4 device; 2) reduction of the anticipated dose (300IU to 200IU); 3) or fractionation of the eCG dose (200IU plus 100IU), on follicular development and reproductive performance of purebred and crossbred taurine suckled beef cows in postpartum anestrus.

## 2. Material and methods

### *Herd and animal management*

Three experiments were carried out on five commercial farms, located in two distinct regions (Southwest and Centerwest) of Rio Grande do Sul, Brazil. Experiments 1 and 2 were developed during the 2018/2019 breeding season and experiment 3 during the 2019/2020 breeding season. A total of 1148 purebred and crossbred taurine suckled beef cows (Angus, Brangus, Braford and Hereford), multiparous, in postpartum anestrus were used. The cows were maintained in a native pasture, with free access to water and mineralized salt. All animal handling procedures in this trial followed general guidelines for animal welfare. Information of breed, category and body condition score (BCS) at the beginning of the FTAI protocol for each lot, in the different properties are shown in Table 1. All experimental procedures and protocols described in this manuscript were approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the Universidade Federal de Santa Maria (protocol number 9446240419).

**Table 1.** Descriptive analyses according to the different lots.

| Region of state     | Lots     | Nº of cows | BCS Mean (1 – 5) | With CL % (n) <sup>a</sup> | Without CL % (n) <sup>b</sup> | Estrus % (n) <sup>c</sup> | P/AI % (n) <sup>d</sup> |
|---------------------|----------|------------|------------------|----------------------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| <i>Experiment 1</i> |          |            |                  |                            |                               |                           |                         |
| Southwest           | A        | 81         | 2.41             | 0 (0)                      | 100 (81)                      | 69.1 (56)                 | 49.4 (40)               |
| <b>Overall</b>      | <b>1</b> | <b>81</b>  | <b>2.41</b>      | <b>0 (0)</b>               | <b>100 (81)</b>               | <b>69.1 (56)</b>          | <b>49.4 (40)</b>        |
| <i>Experiment 2</i> |          |            |                  |                            |                               |                           |                         |
| Southwest           | B        | 74         | 2.85             | 36.5 (27)                  | 63.5 (47)                     | 82.4 (61)                 | 62.2 (46)               |
|                     | C        | 255        | 2.72             | 40.8 (104)                 | 59.2 (151)                    | 67.8 (173)                | 47.8 (122)              |
|                     | D        | 248        | 2.81             | 31.5 (78)                  | 68.5(170)                     | 82.3 (204)                | 60.5 (150)              |
|                     | E        | 198        | 3.11             | 59.1 (117)                 | 40.9 (81)                     | 82.3 (163)                | 55.5 (110)              |
| <b>Overall</b>      | <b>4</b> | <b>775</b> | <b>2.62</b>      | <b>42.1 (326)</b>          | <b>57.9 (449)</b>             | <b>77.5 (601)</b>         | <b>55.2 (428)</b>       |
| <i>Experiment 3</i> |          |            |                  |                            |                               |                           |                         |
| Southwest           | F        | 137        | 2.55             | 17.5 (24)                  | 82.5 (113)                    | 77.4 (106)                | 54.7 (75)               |
|                     | G        | 195        | 2.57             | 12.3 (24)                  | 87.7 (171)                    | 57.9 (113)                | 45.1 (88)               |
|                     | H        | 242        | 2.71             | 40.1 (97)                  | 59.9 (145)                    | 75.2 (182)                | 54.1 (131)              |
| Center-west         | I        | 118        | 2.43             | 3.4 (3)                    | 96.6 (114)                    | 92.4 (109)                | 27.1 (32)               |
|                     | J        | 78         | 2.48             | 3.8 (3)                    | 96.2 (75)                     | 44.9 (35)                 | 14.1 (11)               |
| <b>Overall</b>      | <b>5</b> | <b>770</b> | <b>2.58</b>      | <b>19.7 (152)</b>          | <b>80.3 (618)</b>             | <b>70.8 (545)</b>         | <b>56.2 (433)</b>       |

Abbreviations: BCS, body condition score;

<sup>a</sup>Animals that started the fixed-time artificial insemination (FTAI) protocol with a corpus luteum (cycling);

<sup>b</sup>Animals that started the FTAI protocol without a corpus luteum (anestrous);

<sup>c</sup>Occurrence of estrus between progesterone device removal and FTAI;

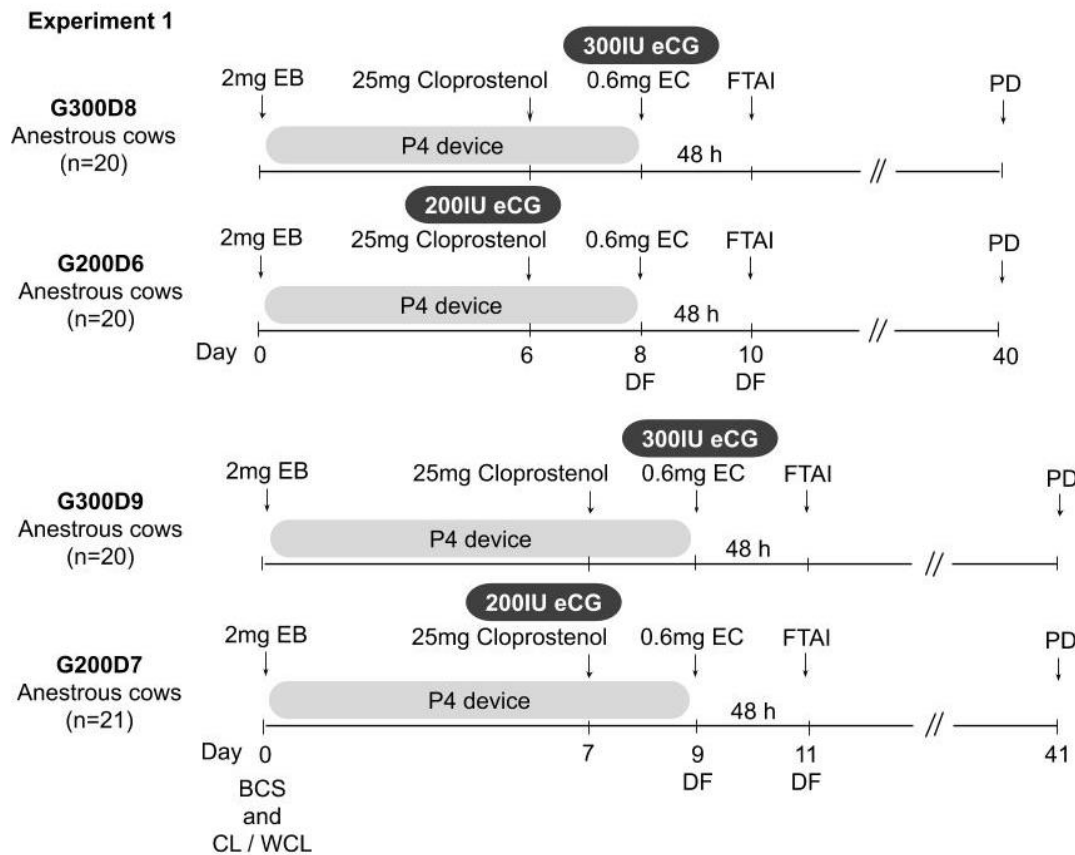
<sup>d</sup>Pregnancy per AI (P/AI) 30 days after FTAI.

### *Reproductive management and experimental design*

#### *Experiment 1*

Experiment 1 aimed to evaluate the anticipation and reduction of the eCG dose in FTAI protocols with 8 or 9 days of exposure to P4 device. The animals were distributed among 4 treatment groups, being considered as control groups those that received 300IU of eCG at P4 device removal (D8 or D9). The treatment groups received 200IU of eCG 48h before the P4 device removal (D6 or D7). A total of 81 suckled beef cows, multiparous, with mean of BCS  $2.41 \pm 0.18$  on a scale from 1 to 5 (where 1=emaciated and 5=obese), with an average of 60 days postpartum, acyclic were used. The animals were randomly assigned by BCS and postpartum days among four treatment groups according to the time of permanence of progesterone (P4) device (8 or 9 days), moment of administration (48h before or at the P4 device removal) and dose of eCG (200UI or 300UI). In the groups in which the intravaginal progesterone device (Sincrogest® 1g; Ourofino) remained for 8 days, this was inserted on day 0 (D0) associated

with an intramuscular application (IM) of 2mg of estradiol benzoate (EB; Syncrodiol®; Ourofino) in all animals. Those in the G300D8 group (n = 20) received 25 mg of cloprostenol IM (Sincrocio®; Ourofino) on day 6 (D6). On day 8 (D8), P4 device was removed and 0.6 mg of estradiol cypionate IM (EC; SincroCP®; Ourofino) and 300UI of eCG IM (SincroeCG®; Ourofino) were administered. For the G200D6 group (n = 20), 25 mg of cloprostenol IM (Sincrocio®; Ourofino) and 200UI of eCG IM (SincroeCG®; Ourofino) were administered in D6. On D8, the P4 device was removed and 0.6mg of EC IM (SincroCP®; Ourofino) was applied. In the groups in which the P4 device (Sincrogest®; Ourofino) remained for 9 days, it was inserted in all females in the D0 associated with 2mg of EB IM (Syncrodiol®; Ourofino). The G300D9 group (n = 20) received 25 mg of IM cloprostenol (Sincrocio®; Ourofino) on day 7 (D7). On day 9 (D9), the P4 device was removed and 0.6mg of EC IM (SincroCP®; Ourofino) and 300UI of eCG IM (SincroeCG®; Ourofino) was administered. In the G200D7 group (n = 21) cows received on the D7, 25 mg of cloprostenol IM (Sincrocio®; Ourofino) and 200UI of eCG IM (SincroeCG®; Ourofino). The P4 device was removed at D9 associated with the application of 0.6mg of EC IM (SincroCP®; Ourofino). At the time of P4 device removal, all females had the tail head marked with chalk to detect estrus. The FTAI was performed 48 hours after the DIP removal in all groups (Figure 1). All animals were submitted to transvaginal ultrasound examination at the time of P4 device removal and at the FTAI to measure the diameter of the dominant follicle (DF).



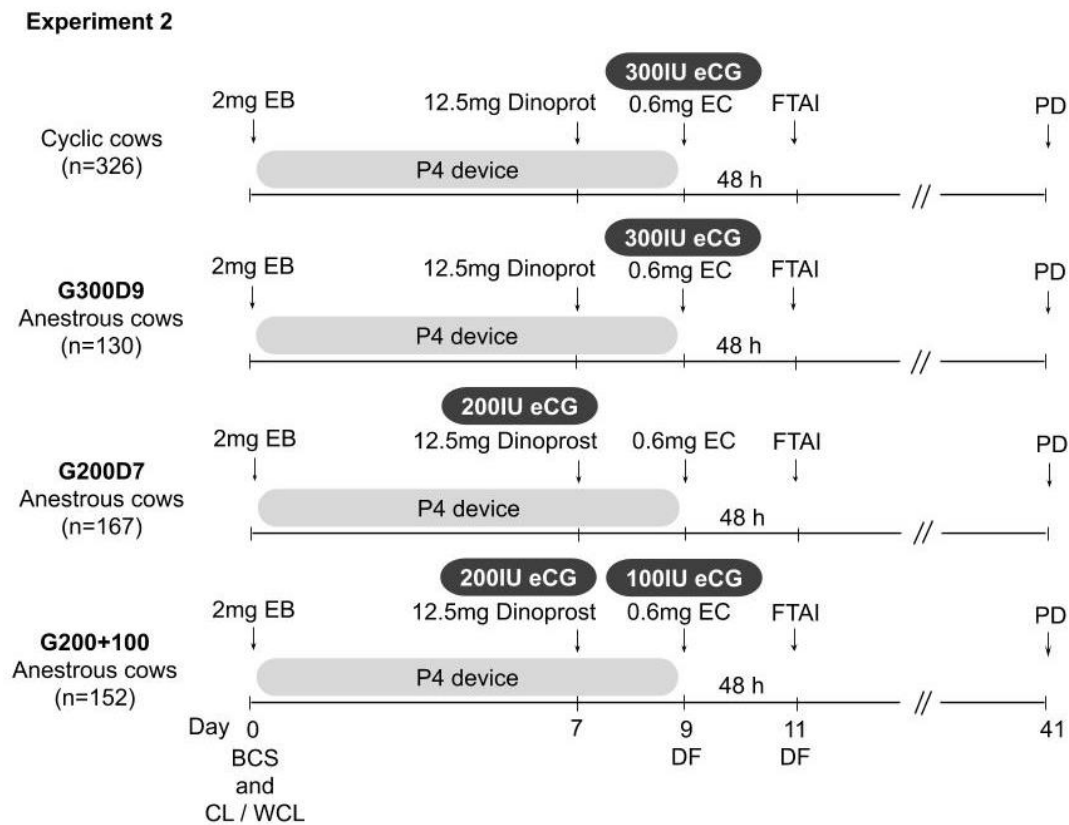
**Figure 1.** Experimental design 1. EB= estradiol benzoate; EC= estradiol cypionate; Cloprostenol= prostaglandin analog; eCG= equine chorionic gonadotropin; FTAI= fixed-time artificial insemination performed 48 hours after the progesterone (P4) device removal; BCS= body condition score; CL/WCL= ultrasound examination to identify the cows with a corpus luteum (CL)/ cows without a CL at the beginning of FTAI protocol; PD= ultrasound examinations for pregnancy diagnosis; DF= measurement of the dominant follicle diameter through ultrasound evaluation.

### Experiment 2

In experiment 2, only the protocol with 9 days of P4 device permanence was used. The animals were distributed into three groups and the group that received 300IU of eCG on day 9 was considered as a control group. The two treatment groups consisted of anticipating 200IU of eCG to day 7 (48 h before the P4 device removal/96h before FTAI) or fractioning the dose of eCG between day 7 (200IU; 48 h before the P4 device removal/96h before FTAI) and day 9 (100IU; at P4 device removal). A total of 449 suckled beef cows, multiparous, with BCS  $2.79 \pm 0.22$  on a scale from 1 to 5 (where 1=emaciated and 5=obese), with 60 days postpartum, acyclic, were randomly assigned between three treatment groups. And the cycling cows (n=326) at the beginning of the FTAI protocol were included in this experiment as a control group. All animals received the same ovulation synchronization protocol which consisted of inserting a P4 device (DIB® 0,5g; Zoetis) plus 2mg of EB IM (Gonadiol®; Zoetis) on D0,



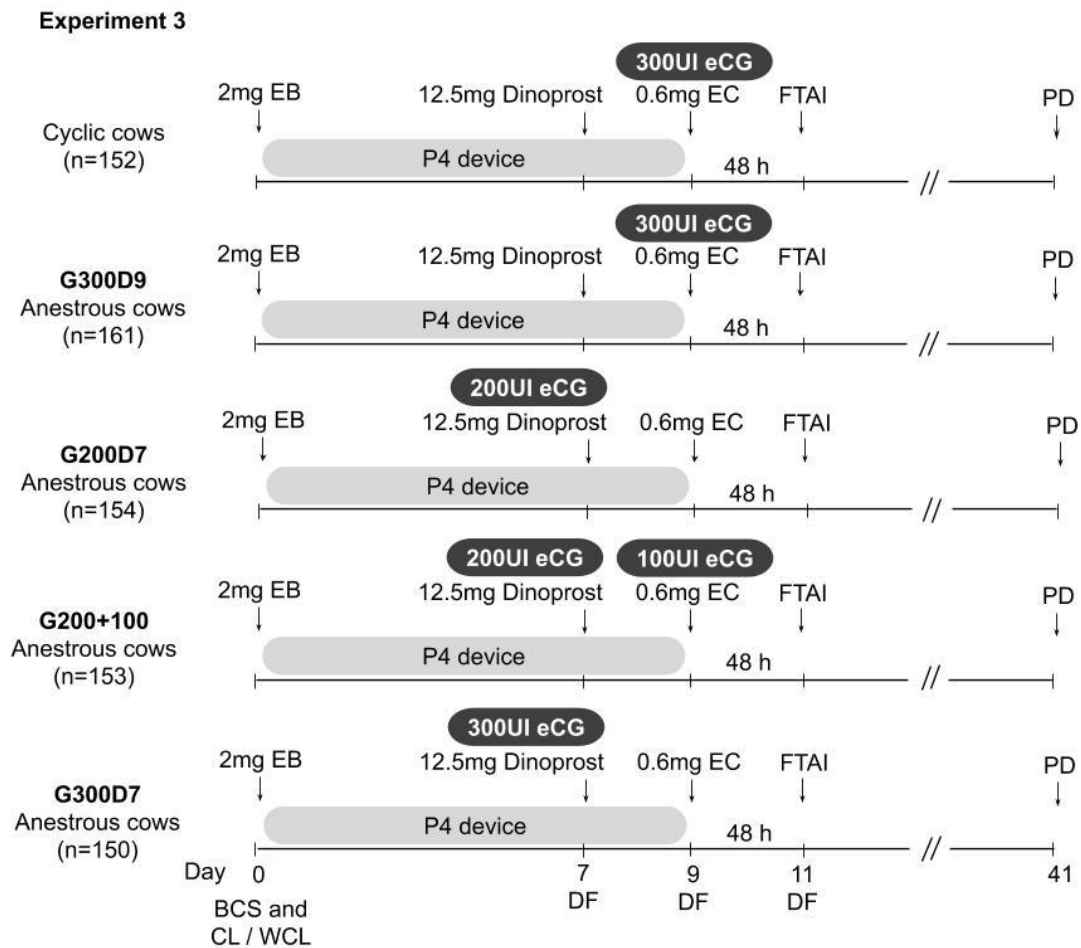
12.5mg of Dinoprost Tromethamine IM (Lutalyse®; Zoetis) on D7 and 0.6mg of EC IM (ECP®; Zoetis) on D9 associated with the P4 device removal. The difference among the treatment groups consisted on the dose and time of eCG administration. The cyclic cows (n=326) received 300UI of eCG IM (Novormon®; Zoetis) at the time of P4 device removal (D9). The G300D9 group (n=130 anestrus cows) also received 300UI of eCG IM (Novormon®; Zoetis) at the D9. The G200D7 group (n=167 anestrus cows) had the eCG dose (Novormon®; Zoetis) reduced to 200UI and anticipated to 48 hours before the P4 device removal (D7). And the G200+100 group (n=152 anestrus cows) had the dose of eCG (Novormon®; Zoetis) fractionated between D7 and D9, with 200UI IM applied on D7 plus 100UI IM on D9. Still on D9, all animals had the tail heads marked with chalk to detect estrus. The FTAI was performed 48 hours after P4 device removal (D11). A sample of animals from each group (G300D9, n=7; G200D7, n=14; G200+100, n=12) was submitted to transvaginal ultrasound examination on D9 and D11 to measure the diameter of the DF (Figure 2).



**Figure 2.** Experimental design 2. EB= estradiol benzoate; EC= estradiol cypionate; Cloprostenol= prostaglandin analog; eCG= equine chorionic gonadotropin; FTAI= fixed-time artificial insemination performed 48 hours after the progesterone (P4) device removal; BCS= body condition score; CL/WCL= ultrasound examination to identify the cows with a corpus luteum (CL)/ cows without a CL at the beginning of FTAI protocol; PD= ultrasound examinations for pregnancy diagnosis; DF= measurement of the dominant follicle (FD) diameter through ultrasound evaluation.

### *Experiment 3*

Experiment 3 had the same groups as experiment 2, but an alternative treatment group was added, which received the conventional dose of eCG (300IU) on day 7 (48 h before the P4 device removal and 96h before FTAI). A total of 618 suckled beef cows, multiparous, with BCS  $2.62 \pm 0.30$  on a scale from 1 to 5 (1=emaciated and 5=obese), ranging from 45 days postpartum, acyclic were used. And cycling cows (n=152) at the beginning of FTAI protocol were also included as a control group. Cows were randomly distributed among five treatment groups. As in experiment 2, all animals received the same ovulation synchronization protocol that consisted of inserting a P4 device (DIB®; Zoetis) plus 2mg of EB IM (Gonadiol®; Zoetis) on D0, 12.5mg of Dinoprost Tromethamine IM (Lutalyse®; Zoetis) on D7 and 0.6mg of EC IM (ECP®; Zoetis) on D9 associated with the P4 device removal. The same treatment groups from experiment 2 (Cyclic cows, n=152; G300D9, n=161; G200D7, n=154; G200+100, n=153) were used and the G300D7 group (n=150) was added, which received 300UI of eCG IM (Novormon®; Zoetis) on D7, 48 hours before the P4 device removal. On D9 all animals had the tail heads marked with chalk to detect estrus. The FTAI was performed 48 hours after the P4 device removal (D11), with semen from 12 different bulls. A sample of animals from each group (Cyclic, n=37; G300D9, n=34; G300D7, n=32; G200D7, n=42; G200+100, n=39) was submitted to transvaginal ultrasound examination on D7, D9 and D11 to measure the diameter of the DF (Figure 3).



**Figure 3.** Experimental design 2. EB= estradiol benzoate; EC= estradiol cypionate; Cloprostenol= prostaglandin analog; eCG= equine chorionic gonadotropin; FTAI= fixed-time artificial insemination performed 48 hours after the progesterone (P4) device removal; BCS= body condition score; CL/WCL= ultrasound examination to identify the cows with a corpus luteum (CL)/ cows without a CL at the beginning of FTAI protocol; PD= ultrasound examinations for pregnancy diagnosis; DF= measurement of the dominant follicle (FD) diameter through ultrasound evaluation.

### *Semen*

The bulls used in these experiments were chosen at the discretion of the properties on which the management was carried out. All batches used were previously evaluated. Only samples with sperm quality characteristics that met the minimum requirements of the Brazilian College of Animal Reproduction [18] were used, which consist of 35% of progressive sperm motility and maximum of 30% in total, of abnormal sperm after thawing.

### *Estrus detection*

The cows had their tailheads marked with chalk (Raidl-Maxi; RAIDEX GmbH, Dettingen/Erms, Germany) at the P4 device removal. The occurrence of estrus was evaluated at FTAI and was determined on the basis of the removal of the tailhead mark. Estrus was deemed to have occurred in cattle without a tailhead.

#### *Ultrasound examination*

For all experiments, all animals were evaluated immediately before the beginning of the TAI protocol (D0) to access the ovarian activity. Transvaginal ultrasound examination of the ovaries was carried out to verify the presence or absence of the corpus luteum (CL). Cows that did not presented a CL at this time were considered acyclic and those that presented a CL were considered cyclic cows. Regarding the follicular dynamics evaluations, in experiments 1 and 2, measurements of the DF were performed at the time of P4 device removal and at the FTAI moment. In experiment 3, these measurements were made at the time of administration of the prostaglandin analogue (D7), P4 device removal (D9) and at the FTAI moment (D11). The growth of the DF (mm/day) was determined by the difference in diameter between the days on which it was measured (D10-D8 or D11-D9 in experiment 1; D11-D9 in experiment 2; D9-D7, D11-D9 and D11-D7 in experiment 3), divided by the total number of days between the first and the last measurement (2 days for experiments 1 and 2; 2 or 4 days for experiment 3). The pregnancy diagnosis was performed by ultrasound 30 days after FTAI. The rate of P/AI was defined as the number of pregnant cows, divided by the total number of cows submitted to FTAI for each treatment group.

#### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed using the GLM models of STATISTICA 13.3 (TIBCO Software) for Windows. Continuous variables were analyzed by ANOVA procedure fitted to normal distribution. Categorical data were analyzed by logistic regression with models fitted to binary distribution. The occurrence of estrus and P/AI were analyzed using the GLM procedures. The variables that were initially included in the models were the treatments, farm, cow breed (purebred or crossbred *Bos taurus*) and BCS at the first day of the synchronization protocol (categorized as  $<2.75$  or  $>2.75$ ), and their interactions. For the analysis of P/AI, the bull sire within each breeding group in each farm location was included as a random effect. In the subset of cows subjected to ovarian response evaluation by ultrasound, continuous variables

(i.e., diameter of the LF at D6 or D7, P4 insert removal (D8 or D9), diameter of the LF at FTAI, and LF daily growth rate) were analyzed by GLM procedure. The cows within each breeding group were considered as a random effect. Response variables were tested according to their homogeneity and normality of variances using and transformed if necessary to reach the normality. An additional retrospective analysis, regarding the impact of occurrence of estrus between the P4 device removal and FTAI, was performed. Information from individual cows was compiled into a single data set for statistical analysis. Data were analyzed by logistic regression using the GLIMMIX procedure. Means (standard error) and percentages were used to describe all the response variables. Differences with  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

### 3. Results

#### *Experiment 1*

At the time of P4 device removal, cows in G200D6, G200D7 e G300D9 groups had greater ( $P < 0.05$ ) follicular diameter; at FTAI the groups in which the P4 device remained for 9 days had larger ( $P < 0.05$ ) follicular diameter; the follicular growth rate was higher ( $P < 0.05$ ) for the groups G200D6, G200D7 e G300D9 (Table 2). Occurrence of estrus ( $P = 0.63$ ) and P/AI ( $P = 0.67$ ) was similar among treatment groups (Table 2).

**Table 2.** Experiment 1 - reproductive response of suckled beef cows in postpartum anestrus after FTAI, according to the P4 device permanence, time of application and eCG dose.

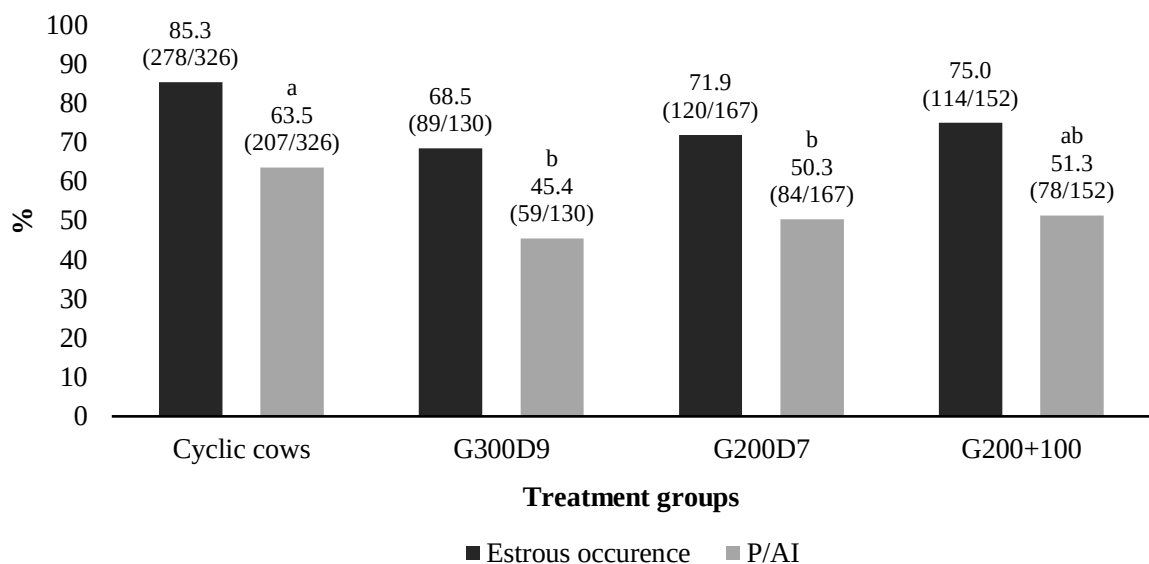
| Item                                   | Treatment groups   |                    |                    |                    | P value |
|----------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------|
|                                        | P4 9 days          |                    | P4 8 days          |                    |         |
|                                        | G300D9             | G200D7             | G300D8             | G200D6             |         |
| N° of animals                          | 20                 | 21                 | 20                 | 20                 | -       |
| BCS (1-5 scale)                        | 2.42±0.1           | 2.42±0.1           | 2.40±0.2           | 2.42±0.1           | 0.12    |
| LF diameter at P4 device removal (mm)  | 10.38 <sup>a</sup> | 10.46 <sup>a</sup> | 9.87 <sup>b</sup>  | 10.34 <sup>a</sup> | <0.05   |
| LF diameter at FTAI (mm)               | 14.53 <sup>a</sup> | 14.74 <sup>a</sup> | 13.16 <sup>c</sup> | 14.06 <sup>b</sup> | <0.05   |
| FGR P4 device removal to FTAI (mm/day) | 1.49 <sup>a</sup>  | 1.60 <sup>a</sup>  | 1.28 <sup>b</sup>  | 1.60 <sup>a</sup>  | <0.05   |
| Estrus occurrence (%)                  | 65.0 (13)          | 76.1 (16)          | 60.0 (12)          | 75.0 (15)          | 0.63    |
| P/AI (%)                               | 50.0 (10)          | 52.3 (11)          | 45.0 (9)           | 50.0 (10)          | 0.67    |

Abbreviations: P4, progesterone; FTAI, fixed-time artificial insemination; eCG, equine chorionic gonadotropin; P/AI, pregnancy per artificial insemination; BCS, body condition score; LF, largest follicle; FGR, follicular growth rate between de P4 device removal and FTAI.

<sup>a, b, c</sup> On the same line, means without a common superscript differed ( $P < 0.05$ ).

### Experiment 2

There was no difference in the follicular diameter at the P4 device removal ( $P=0.37$ ), at the TAI moment ( $P=0.42$ ), or in follicular growth rate ( $P=0.67$ ) among treatment groups. The estrus occurrence was also similar among the treatment groups (Figure 4). The P/AI was higher ( $P<0.05$ ) in cyclic cows when compared to G300D9 or G200D7. However, the G200+100 presented results similar to cyclic cows (Figure 4).



**Figure 4.** Experiment 2 - occurrence of estrus and pregnancy per artificial insemination (P/AI) in purebred and crossbred taurine suckled beef cows according to treatment with different doses and time of administration of eCG at the TAI protocol (Cyclic cows = 300UI at P4 device removal on day 9; G300D9 = 300UI at P4 device removal on day 9; G200D7 = 200UI 48h before P4 device removal, on day 7; G200+100 = 200UI 48h before plus 100UI at the P4 device removal). Cyclic cows = cows with a corpus luteum at day 0; G300D9, G200D7 and G200+100 = cows without a corpus luteum at day 0; Different letters between columns indicate statistical difference ( $P<0.05$ ).

### Experiment 3

The follicular diameter at day 7 was similar ( $P=0.44$ ) between treatments (Table 3). At the P4 device removal, G300D7 group presented superior ( $P=0.04$ ) follicular diameter, and the cyclic cows, G200D7 and G200+100 groups showed similar results to these (Table 3). At the TAI moment, the follicular diameter was similar ( $P=0.14$ ) among treatments. The G300D7 group also presents the highest ( $P=0.03$ ) follicular growth rate from day 7 to day 9. From day 9 to day 11, the cyclic cows showed greater ( $P=0.01$ ) follicular growth rate. From day 7 to day 11 follicular growth rate did not differ ( $P=0.34$ ) among treatment groups (Table 3). Cyclic cows

showed higher estrus ( $P=0.006$ ) and pregnancy rates ( $P=0.01$ ). However, among the treatment groups the results of estrus occurrence for G300D7 and P/AI for G200+100 was similar to those shown by cyclic cows (Figure 5).

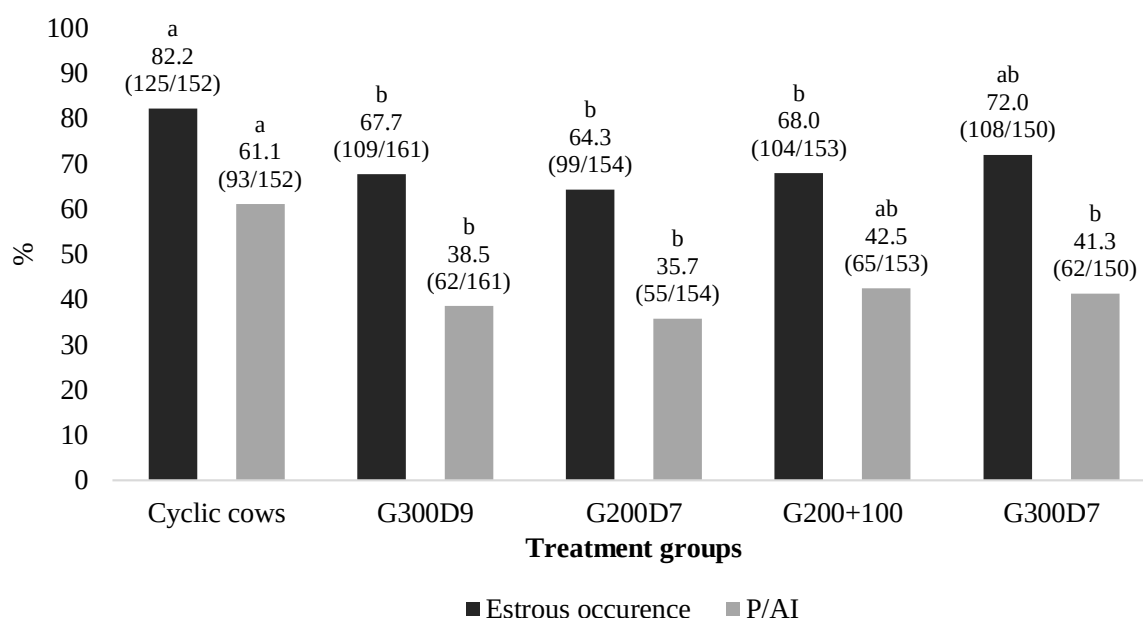
In addition, it was observed that cows with  $BCS < 2.75$  presented pregnancy rates significantly lower ( $P=0.0001$ ) than those with  $BCS \geq 2.75$  (Table 4). The ovarian function (CL or W/CL) at the beginning of the FTAI protocol and estrus occurrence also showed significant effect on P/AI (Table 4).

**Table 3.** Experiment 3 - ovarian follicular growth of purebred and crossbred taurine suckled beef cows in postpartum anestrus in response to different moment of administration and dose of eCG, at the FTAI protocol with 9 days of P4 device permanence.

| Item                               | Treatment groups       |                      |                        |                        |                       | P value |
|------------------------------------|------------------------|----------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|---------|
|                                    | Cyclic cows            | G300D9               | G200D7                 | G200+100               | G300D7                |         |
| N° of animals                      | 37                     | 34                   | 42                     | 39                     | 32                    | -       |
| LF diameter at day 7 (mm)          | 7.2±1.5                | 7.1±1.3              | 6.7±1.2                | 6.7±1.3                | 6.7±1.2               | 0.44    |
| LF diameter at P4 removal (mm)     | 10.0±1.0 <sup>ab</sup> | 9.8±0.9 <sup>b</sup> | 10.1±0.8 <sup>ab</sup> | 10.3±0.7 <sup>ab</sup> | 10.4±1.1 <sup>a</sup> | 0.04    |
| LF diameter at FTAI (mm)           | 12.7±1.6               | 12.6±1.8             | 12.0±1.8               | 12.5±1.5               | 12.0±1.8              | 0.14    |
| FGR day 7-9 (mm/day) <sup>c</sup>  | 1.4±0.7 <sup>ab</sup>  | 1.4±0.5 <sup>b</sup> | 1.6±0.7 <sup>ab</sup>  | 1.8±0.6 <sup>ab</sup>  | 1.8±0.8 <sup>a</sup>  | 0.03    |
| FGR day 9-11 (mm/day) <sup>d</sup> | 1.4±0.6 <sup>a</sup>   | 0.9±0.5 <sup>b</sup> | 0.6±0.5 <sup>b</sup>   | 0.7±0.4 <sup>b</sup>   | 0.7±0.5 <sup>b</sup>  | 0.01    |
| FGR day 7-11 (mm/day) <sup>e</sup> | 1.4±0.4                | 1.4±0.4              | 1.3±0.6                | 1.4±0.5                | 1.4±0.5               | 0.34    |

Abbreviations: P4, progesterone device; FTAI, fixed-time artificial insemination; LF, largest follicle; FGR, follicular growth rate between days 7 and 9<sup>c</sup>, between days 9 and 11<sup>d</sup> and between days 7 and 11<sup>e</sup>.

<sup>a, b</sup> On the same line, means without a common superscript differed ( $P<0.05$ ). Data was presented as mean ± standart deviation of the mean.



**Figure 5.** Experiment 3 - occurrence of estrus and pregnancy per artificial insemination (P/AI) in taurine suckled beef cows according to treatment with different doses and time of administration of eCG at the TAI protocol (Cyclic cows = 300UI at P4 device removal on day 9; G300D9 = 300UI at P4 device removal on day 9; G300D7 = 300UI 48h before P4 device removal, on day 7; G200D7 = 200UI 48h before P4 device removal, on day 7; G200+100 = 200UI 48h before plus 100UI at the P4 device removal). Cyclic cows = cows with a corpus luteum at day 0; G300D9, G200D7 and G200+100 = cows without a corpus luteum at day 0. Different letters between columns indicate statistical difference ( $P < 0.05$ )

**Table 4.** Experiment 3 - pregnancy rates of purebred and crossbred taurine suckled beef cows in postpartum anestrus according to the BCS and presence or absence of a corpus luteum at the beginning of FTAI protocol, and the estrus occurrence rate at FTAI.

| Item                                         | Nº of animals | P/AI % <sup>d</sup>     | P values |
|----------------------------------------------|---------------|-------------------------|----------|
| <i>BCS (scale 1-5)</i>                       |               |                         |          |
| 2,00                                         | 81            | 24,7 <sup>c</sup> (20)  | 0,0001   |
| 2,50                                         | 525           | 41,7 <sup>b</sup> (219) |          |
| 2,75                                         | 24            | 54,2 <sup>a</sup> (13)  |          |
| 3,00                                         | 112           | 60,7 <sup>a</sup> (68)  |          |
| 3,50                                         | 28            | 60,7 <sup>a</sup> (17)  |          |
| <i>Presence or absence of CL<sup>e</sup></i> |               |                         |          |
| Without CL                                   | 618           | 39,6 <sup>b</sup> (245) | < 0,0001 |
| With CL                                      | 152           | 63,1 <sup>a</sup> (96)  |          |
| <i>Occurrence of estrus<sup>f</sup></i>      |               |                         |          |
| No estrus                                    | 225           | 23,5 <sup>b</sup> (53)  | < 0,0001 |
| Estrus                                       | 545           | 61,7 <sup>a</sup> (336) |          |

Abbreviations: BCS, body condition score; CL, corpus luteum; P/AI, pregnancy per artificial insemination.

<sup>a, b, c</sup> On the same column, means without a common superscript differed. <sup>d</sup> Data are presented as average pregnancy rate (number of cows that became pregnant/number of cows submitted to fixed-time artificial insemination).

<sup>e</sup> Pregnancy rate of cows that presented or not presented a CL on day 0 of the FTAI protocol. <sup>f</sup> Pregnancy rate of cows that presented estrus or not on day 0 at the FTAI.



#### 4. Discussion

The use of eCG in FTAI protocols stimulates follicular growth, promoting greater estrus occurrence and pregnancy rates [6]. The anticipated administration of this gonadotropin may contribute to a longer period of action and, consequently, potentiation of these benefits. In addition, dose reduction due to anticipation allows for a reduction in the cost of the FTAI protocol. Among all the experiments carried out in this study to evaluate the effect of different doses and time of eCG administration in FTAI protocols applied to purebred and crossbred taurine suckled beef cows in postpartum anestrus, the main results found were: 1) the protocols with 9 days of P4 device permanence were able to induce a higher follicular growth rate and a DF of greater diameter at TAI, regardless of the dose and time of application of the eCG; 2) the anticipation of the eCG dose to 48h before de P4 device removal (day 7) on TAI protocol induced a higher follicular growth rate between days 7 and 9, enabling a larger DF at P4 device removal; 3) the fractionation of the eCG dose was the only treatment capable of inducing a pregnancy rate similar to that of cyclic cows that showed the greatest results; 4) the anticipation of 200IU of eCG presented similar results of follicular development, estrus occurrence and pregnancy rates that the conventional treatment (300IU on day 9).

This study started by evaluating the anticipation (to 48h before the P4 device removal and 96h before FTAI) and reduction (300IU to 200IU) of the eCG dose in TAI protocols with different times of P4 device permanence (8 or 9 days). It was observed that regardless of the dose and time of eCG application, the protocol in which the P4 device remained for 9 days enabled a larger DF at FTAI (mean of  $\geq 14,5\text{mm}$ ). This result is similar to that found in another study of our research group [19,20], in which different doses of eCG (300IU and 400IU) were used at the time of P4 device removal in protocols with different exposure times to P4 device (8 or 9 days), and the DF diameter at FTAI also was largest when the P4 device remained for 9 days, regardless de eCG dose. This result could be expected since the DF had an extra day of development. When the progesterone device remained for 8 days, the anticipation (to day 6) and reduction (to 200UI) of the eCG dose enabled a follicular diameter at FTAI similar (approximately 14mm) to that of the protocol with 9 days of P4 device permanence while the conventional treatment (300IU on day 8) presented a lower result (approximately 13mm). Based on this, it is important to highlight that the DF acquires ovulatory capacity when reaching approximately 8 and 10 mm in diameter in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle, respectively [21,22]. However, ovulation happens when this follicle reaches 10-12 mm and 14-20 mm in diameter for these same genetic groups [23]. Ovulation of a larger diameter DF is related to

higher serum E2 concentrations in the pre-ovulatory period [24–26]. In turn, high concentrations of E2 are related to higher estrus demonstration rates [27], preparation of the uterine environment [28], transport and viability of sperm in this environment [29], contributing to the highest conception rates [24,25,27]. Larger ovulatory follicles are also related to the formation of a larger CL volume and higher concentrations of P4 after ovulation [26,30], which contributes to a greater probability of embryonic/fetal survival [24,31]. Tortorella et al. [17] also observed greater follicular growth when anticipated the eCG dose (400IU) to day 6 of a protocol with 8 days of P4 device permanence. However, the follicular diameter at the time of application of the ovulation inducer (GnRH on day 9) was low for all animals, as well as the estrus and pregnancy rates. Despite presented numerical difference in our study, the estrus occurrence and pregnancy rates were similar between groups (G200D6, G300D8, G200D7 and G300D9), but were evaluated in a small number of animals.

In experiments 2 and 3, only the protocol with 9 days of P4 device permanence was used based on its larger DF at FTAI presented on experiment 1. Still, in experiment 1, the reduction in the dose of eCG applied on day 7 showed results of follicular diameter similar to the conventional dose applied on day 9. Additionally, in experiment 2 the same dose (200IU on day 7) also showed a numerically lower result, so it was decided to introduce one more treatment group, anticipating the conventional eCG dose (300IU) to day 7. When the application of eCG is anticipated to 48 hours before P4 device removal (96h before FTAI) it can happen before the follicular divergence and dominance. The follicular divergence occurs when the FD reaches approximately 6 mm and 8.5 mm in diameter for *Bos indicus* [22,32] and *Bos taurus* females [33] respectively. When eCG is administered before follicular deviation it can stimulate the growth of more than one follicle presented in the ovaries [34], causing a higher incidence of multiple ovulation and twin pregnancies. However, in the present study this was not observed.

The results of follicular development in experiments 2 and 3, showed that anticipation of eCG induced a larger DF diameter at P4 device removal and a higher follicular growth rate between days 7 and 9. The DF diameter at FTAI did not differ between treatments. Additionally, the follicular growth rate between days 9 and 11 or 7 and 11 also did not differ. Despite remaining in circulation for 120 hours after application as shown in other studies [7,9,10], our results seem to confirm that the peak action of eCG is around 48 hours after application, since the anticipation of the eCG dose (200IU or 300IU to day 7) demonstrated follicular diameter at FTAI similar to conventional treatment (at P4 device removal) and not an increase in these results as expected. Another study evaluated the effect of 400 IU of eCG 48h before removal

of the P4 device (day 6) [17]. However, these authors used GnRH as an ovulation inducer 24 h after the P4 device removal and the FTAI was performed 16 h after GnRH application. Although the anticipation of eCG showed better results of follicular growth, these were low for both groups in the same way as the estrus and pregnancy demonstration rates. When compared to our results, it may be explained by the longer duration of the ovulation synchronization protocol used for FTAI in our study, that allowed follicular growth for a longer period and greater DF diameter at FTAI. Still based on the results of follicular growth, Araújo et al. [16] did not observe improvement in the results of follicular growth, CL development and pregnancy rate when they anticipated 400IU of eCG for 24h or 48h before the P4 device removal in Holstein cows. However, the results of these authors showed a significant numerical difference and the study was carried out with dairy cows that have higher hepatic steroid metabolism and consequently lower serum P4 concentrations during the estrous cycle [35]. This stimulates follicular growth and a larger ovulatory follicle diameter, causing milk cows not to show so many benefits when treated with eCG [36].

Our results of estrus occurrence and pregnancy rates were greater cyclic cows and the only treatment group capable of inducing similar results was the one that received the fractionated eCG dose between days 7 (200IU) and 9 (100IU). Cyclic cows were used as a comparative because it has been shown in other studies that they have better reproductive performance in FTAI programs when compared to anestrus cows. This is generally related to the hormonal environment associated with the first ovulation after the anestrus period and the fact that the first luteal phase after this period has a shorter duration due to the ovulation of small follicles [37,38]. Suckled anestrus cows and cows with poor nutritional condition presenting insufficient LH pulsatility, compromising follicular development and causing non-ovulation or ovulation of small follicles [4]. The benefits of using eCG in ovulation synchronization protocols for FTAI, mostly in cows in this conditions are related to its ability to bind to both FSH and LH receptors [1,6]. The treatment with eCG increase final follicular development, follicular diameter at FTAI, estrus occurrence, ovulation and pregnancy rates [15,39–41]. In addition, the use of eCG is also related to the formation of a larger CL after ovulation and higher concentrations of circulating P4 [39,42,43]. Therefore, we consider the similar result between the fractionation of the eCG dose and the cyclic cows to be very positive, because it allowed cows in less favorable physiological conditions to achieve results close to those of females who have already reestablished the appropriate hormonal environment for reproduction. Despite having demonstrated follicular diameter similar to other treatments at FTAI, we can infer that fractionation of the eCG dose kept its concentrations high for longer

and this provided a better follicular environment and stimulated oocyte maturation [44]. Therefore, only the group that received the fractionated eCG dose between days 7 (200IU) and 9 (100IU) had a pregnancy rate similar to cyclic cows.

Still, it is important to note that there are studies showing that the reduction of the eCG dose applied at P4 device removal, to 200IU of eCG in *Bos indicus* heifers [12] and cows [13] 200IU of eCG in *Bos Taurus* heifers [14], and 300 IU of eCG in *Bos taurus* cows [15] can be used without any loss in reproductive performance. However, when Marquezini et al. [45] used 200IU of eCG at the P4 device removal in purebred and crossbred taurine suckled beef cows, did not obtain any improvement in pregnancy rates, as compared with no treatment with eCG, in a GnRH-based treatment regimen. In our study, the anticipation of 200IU of eCG for 48h before the P4 device removal demonstrated results of follicular growth, estrus and pregnancy rates similar to the conventional treatment of 300IU at the P4 device removal. This confirms part of our hypothesis that anticipating the application of eCG would allow a dose reduction and consequently a reduction in the cost of the FTAI protocol.

Other important results of our study regardless of treatment were pregnancy rates according to different BCS, reproductive status at the beginning of the TAI protocol and the occurrence or not of estrus. It was possible to observe that cows with BCS <2.75 had a pregnancy rate lower than those with BCS  $\geq$ 2.75. Approximately 80% of the cows used in our study had BCS between 2 and 2.5, which may be related to not so great pregnancy rates. Similar results have been demonstrated in other studies [1,46]. Likewise, cows that did not show estrus at FTAI also had lower pregnancy rates. According to Cooke, et al. [31] the non-occurrence of estrus until the FTAI moment is related to a smaller follicular diameter, lower circulating E2 concentrations in pre-ovulatory period, smaller CL after ovulation and, consequently, lesser pregnancy rates.

## 5. Conclusions

In conclusion, the fractionation of the eCG dose between days 7 (200IU) and 9 (100IU) was the only treatment group that demonstrated pregnancy rates similar to its of cyclic cows, demonstrating the potential to induce in suckled beef cows in postpartum anestrus a result similar to that of animals that naturally present an adequate hormonal environment for reproduction. The anticipation of 300IU or 200IU presented results of follicular growth, estrus occurrence and pregnancy rates similar to de conventional treatment with 300IU applied on P4 device removal and not an increase in results as expected. The anticipation of 200UI (applied

96h before FTAI) has not shown superior results to the conventional treatment as expected, but the similar results are an indication that the dose reduction can be applied as an alternative to reduce the costs of the FTAI protocol.

Acknowledgment: CAPES, Zoetis Brazil, Ourofino, partner properties.

## References

- [1] Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bó GA. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci* 2004;82–83:479–86. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.025>.
- [2] Gonçalves PBD, Oliveira JF. de, Silveira RS da, Ferreira R. Anestro Pós-Parto Em Vacas De Corte. I Simpósio Int Reprodução Anim Apl 2002:105–16.
- [3] Wiltbank MC, Gümen A, Sartori R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* 2002;57:21–52. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00656-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00656-2).
- [4] Yavas Y, Walton JS. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: A review. *Theriogenology* 2000;54:25–55. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00323-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00323-X).
- [5] Bó GA, de la Mata JJ, Baruselli PS, Menchaca A. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology* 2016;86:388–96. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.053>.
- [6] Baruselli P, Jacomini JO, Sales JN, Creozaldi GA. Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. *An. do III Simpósio Int. Reprodução Anim. Apl.*, 2008, p. 146–67.
- [7] Murphy BD, Martinuk SD. Equine Chorionic Gonadotropin 1991:27–44. <https://doi.org/10.1210/edrv-12-1-27>.
- [8] Murphy BD. Equine chorionic gonadotropin - an enigmatic but essential tool. *Anim Reprod* 2012;9:223–30.
- [9] Menzer C, Schams D. Radioimmunoassay for PMSG and its application to in-vivo studies. *J Reprod Fert* 1978;55:339–345. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0550339>.
- [10] Siddiqui MAR, Shamsuddin M, Bhuiyan MMU, Akbar MA, Kamaruddin KM. Effect of feeding and body condition score on multiple ovulation and embryo production in zebu cows. *Reprod Domest Anim* 2002;37:37–41. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2002.00329.x>.
- [11] Núñez-Olivera R, De Castro T, García-Pintos C, Bó G, Piaggio J, Menchaca A. Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol' based treatment in postpartum anestrous beef cattle. *Anim Reprod Sci* 2014;146:111–6. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.02.017>.
- [12] Peres RFG, Júnior IC, Filho OGS, Nogueira GP, Vasconcelos JLM. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. *Theriogenology* 2009;72:681–9. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.04.026>.
- [13] Doroteu EM, Oliveira RA de, Pivato I. Avaliação de diferentes doses de eCG na resincronização da ovulação em vacas nelore lactantes submetidas à IATF. *Rev Bras Saúde e Produção Anim* 2015;16:449–57. <https://doi.org/10.1590/s1519-99402015000200019>.

- [14] Pinto HF, Missio D, dos Santos Brum D, Carloto GW, Martini AP, Pessoa GA, et al. Decreasing the dose of equine chorionic gonadotropin does not affect ovarian or pregnancy responses of purebred taurine and crossbred beef heifers. *Anim Reprod Sci* 2020;218. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106474>.
- [15] Pessoa GA, Martini AP, Carloto GW, Rodrigues MCC, Claro Júnior I, Baruselli PS, et al. Different doses of equine chorionic gonadotropin on ovarian follicular growth and pregnancy rate of suckled *Bos taurus* beef cows subjected to timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* 2016;85:792–9. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.057>.
- [16] Araújo ML, Barbosa LP, Biscarde CEA, Mendes CS, Lents MP, Pinheiro EEG, et al. Diferentes momentos de aplicação de gonadotrofina coriônica equina em protocolo de inseminação artificial em tempo fixo para vacas de leite. *Arq Bras Med Veterinária e Zootec* 2019;71:1934–9. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10282>.
- [17] Tortorella RD, Ferreira R, Santos JT dos, Neto OSA, Barreta MH, Oliveira JF, et al. The effect of equine chorionic gonadotropin on follicular size , luteal volume , circulating progesterone concentrations , and pregnancy rates in anestrous beef cows treated with a novel fixed-time artificial insemination protocol. *Theriogenology* 2013;79:1204–9. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.02.019>.
- [18] CBDR A. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal 1998.
- [19] Roman I, Leivas FG, Carloto GW, Pessoa GA, Francisco CC, Farias LB, et al. Dose de gonadotrofina coriônica equina (300 ou 400UI) e tempo de permanência (8 ou 9 dias) do dispositivo de progesterona em protocolos de IATF com vacas *Bos taurus* de corte lactantes: impacto na ocorrência de estro e na taxa de prenhez. In: *Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões*, Foz do Iguaçu; 2016:232. (Abstract)
- [20] Velasquez PF, Pessoa GA, Roman I, Junior IC, Leivas FG, Brauner CA, et al. Impacto da dose de gonadotrofina coriônica equina (300 ou 400UI) e tempo de permanência do dispositivo de progesterona (8 ou 9 dias) no crescimento folicular em protocolos de IATF com vacas *Bos taurus* de corte. *Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões*, Foz do Iguaçu; 2016:229. (Abstract)
- [21] Sartori R, Fricke PM, Ferreira JCP, Ginther OJ, Wiltbank MC. Follicular Deviation and Acquisition of Ovulatory Capacity in Bovine Follicles1. *Biol Reprod* 2001;65:1403–9. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.5.1403>.
- [22] Gimenes LU, Sá Filho MF, Carvalho NAT, Torres-Júnior JRS, Souza AH, Madureira EH, et al. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology* 2008;69:852–8. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.01.001>.
- [23] Bó GA, Baruselli PS, Martínez MF. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci* 2003;78:307–26. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00097-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00097-6).
- [24] Perry GA, Smith MF, Lucy MC, Green JA, Parks TE, MacNeil MD, et al. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:5268–73. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501700102>.
- [25] Perry GA, Swanson OL, Larimore EL, Perry BL, Djira GD, Cushman RA. Relationship of follicle size and concentrations of estradiol among cows exhibiting or

- not exhibiting estrus during a fixed-time AI protocol. *Domest Anim Endocrinol* 2014;48:15–20. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2014.02.001>.
- [26] Vasconcelos JLM, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank MC. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 2001;56:307–14. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00565-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00565-9).
- [27] Sá Filho MF, Crespilho AM, Santos JEP, Perry GA, Baruselli PS. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Anim Reprod Sci* 2010;120:23–30. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.03.007>.
- [28] Perry GA, Perry BL. Effect of preovulatory concentrations of estradiol and initiation of standing estrus on uterine pH in beef cows. *Domest Anim Endocrinol* 2008;34:333–8. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2007.09.003>.
- [29] Hawk HW. Sperm Survival and Transport in the Female Reproductive Tract. *J Dairy Sci* 1983;66:2645–60. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)82138-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)82138-9).
- [30] Mussard ML, Burke CR, Behlke EJ, Gasser CL, Day ML. Influence of premature induction of a luteinizing hormone surge with gonadotropin-releasing hormone on ovulation, luteal function, and fertility in cattle. *J Anim Sci* 2007;85:937–43. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-592>.
- [31] Cooke RF, Pohler KG, Vasconcelos JLM, Cerri RLA. Estrous expression during a fixed-time artificial insemination protocol enhances development and interferon-tau messenger RNA expression in conceptuses from *Bos indicus* beef cows. *Animal* 2019;13:2569–75. <https://doi.org/10.1017/S1751731119000636>.
- [32] Sartorelli ES, Carvalho LM, Bergfelt DR, Ginther OJ, Barros CM. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology* 2005;63:2382–94. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.017>.
- [33] Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod* 1996;55:1187–94. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.6.1187>.
- [34] Hosseini A, Niasari-Naslaji A, Voigani M, Gharagozloo F. Effect of time of eCG administration on the fate of ovarian follicle in Holstein heifers. *Iran J Vet Res* 2018;19:15–21. <https://doi.org/10.22099/ijvr.2018.4762>.
- [35] Sartori R, Rosa GJM, Wiltbank MC. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci* 2002;85:2813–22. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74368-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74368-3).
- [36] Randi JF, Sánchez JM, Mary M, Herlihy, Valenza A, Kenny D, Butler S, et al. Effect of equine chorionic gonadotropin treatment during a progesterone-based timed artificial insemination program on reproductive performance in seasonal-calving lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2018;101:10526–35. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2018-14495>.
- [37] Day ML. Hormonal induction of estrous cycles in anestrous *Bos taurus* beef cows. *Anim Reprod Sci* 2004;82–83:487–94.



- <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.002>.
- [38] Rhodes FM, Burke CR, Clark BA, Day ML, Macmillan KL. Effect of treatment with progesterone and oestradiol benzoate on ovarian follicular turnover in postpartum anoestrous cows and cows which have resumed oestrous cycles. *Anim Reprod Sci* 2002;69:139–50. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00141-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00141-5).
  - [39] Sá Filho MF, Ayres H, Ferreira RM, Marques MO, Reis EL, Silva RCP, et al. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. *Theriogenology* 2010;73:651–8. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.004>.
  - [40] Filho PPC e S, Sales JNS, Filho MS, Perecin F. Effects of equine chorionic gonadotropin on follicular, luteal and conceptus development of non-lactating *Bos indicus* beef cows subjected to a progesterone plus estradiol-based timed artificial insemination protocol. *Ital J Anim Sci* 2013;12:381–5. <https://doi.org/10.4081/ijas.2013.e61>.
  - [41] Sales JNS, Bottino MP, Silva LACL, Girotto RW, Massoneto JPM, Souza JC, et al. Effects of eCG are more pronounced in primiparous than multiparous *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* 2016;86:2290–5. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.07.023>.
  - [42] Pitaluga PCSF, Sá Filho MF, Sales JNS, Baruselli PS, Vincenti L. Manipulation of the proestrous by exogenous gonadotropin and estradiol during a timed artificial insemination protocol in suckled *Bos indicus* beef cows. *Livest Sci* 2013;154:229–34. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.02.023>.
  - [43] Alvarez RH, Pugliesi G, Nogueira Natal FL, Rocha CC, Ataíde Júnior GA, Ferreira Melo AJ, et al. Reproductive performance of *Bos indicus* beef cows treated with different doses of equine chorionic gonadotropin at the end of a progesterone-estrogen based protocol for fixed-time artificial insemination. *Theriogenology* 2018;118:150–6. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.06.003>.
  - [44] Dickinson SE, Geary TW, Monnig JM, Pohler KG, Green JA, Smith MF. Effect of preovulatory follicle maturity on pregnancy establishment in cattle: the role of oocyte competence and the maternal environment. *Anim Reprod* 2016;13:209–16. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-ar879>.
  - [45] Marquezini GHL, Mercadante VRG, Olson KC, Jaeger JR, Perry GA, Stevenson JS, et al. Effects of equine chorionic gonadotropin on follicle development and pregnancy rates in suckled beef cows with or without calf removal. *J Anim Sci* 2013;91:1216–24. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5382>.
  - [46] Filho OGS, Meneghetti M, Peres RFG, Lamb GC, Vasconcelos JLM. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology* 2009;72:210–8. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.02.008>.

## 5 CONCLUSÃO

- A antecipação da aplicação de 300UI de eCG para 48h antes da remoção do dispositivo de P4 (i.e. 96h antes da IATF) apresentou resultados de crescimento folicular, cio e prenhez semelhantes ao tratamento convencional de 300UI no momento da remoção do dispositivo de P4, não justificando a adição de um manejo para sua utilização;
- A antecipação de 200UI de eCG para 48h antes da remoção do dispositivo de P4 apresentou resultados de crescimento folicular, cio e prenhez semelhantes ao tratamento convencional de 300UI no momento da remoção do dispositivo de P4, mostrando-se uma alternativa a ser utilizada para redução do custo do protocolo de IATF;
- O fracionamento da dose de eCG (200UI 48h antes da remoção do dispositivo de P4 + 100UI no momento da remoção do dispositivo de P4) apresentou resultados de prenhez semelhantes ao das vacas cíclicas.

## **6 PERSPECTIVAS**

A partir dos resultados obtidos, futuros estudos podem ser realizados para:

- Expandir o número de animais comparando o fracionamento da dose de eCG e o tratamento convencional de 300UI no momento da remoção do dispositivo de P4 para avaliar os efeitos com menos grupos de tratamento;
- Expandir o número de animais comparando a antecipação de 200UI de eCG e o tratamento convencional de 300UI no momento da remoção do dispositivo de P4 para viabilizar a redução da dose em vacas de corte em anestro;

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G. P.; SINGH, J. Ovarian follicular and luteal dynamics in cattle. In: HOPPER, R.M. **Bovine Reproduction**. 1ª Ed. Wiley-Blackwell, c. 24, p. 219, 2014.

AERTS, J. M. J.; BOLS, P. E. J. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 45, p. 180-187, 2010.

ALVAREZ, R. H. et al. Reproductive performance of *Bos indicus* beef cows treated with different doses of equine chorionic gonadotropin at the end of a progesterone-estrogen based protocol for fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v.118, p. 150-156, 2018.

AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, G. L. Neuroendocrine control of estrus and ovulation. In: HOPPER, R.M. **Bovine Reproduction**. 1ª Ed. Wiley-Blackwell, c. 23, p. 203, 2014.

ARAÚJO, M. L. et al. Diferentes momentos de aplicação de gonadotrofina coriônica equina em protocolo de inseminação artificial em tempo fixo para vacas de leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.71, n.6, p.1934-1939, 2019.

Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC). Beef Report - Perfil da pecuária no Brasil, 2020.

BARUSELLI, P. S. et al. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 479-486, 2004.

\_\_\_\_\_; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.205-211, abr./jun. 2007.

\_\_\_\_\_ et al. Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOB em tempo fixo. In: **Anais do 3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, p. 146-167 2008.

\_\_\_\_\_ et al. Review: Using artificial insemination vs. natural service in beef herds. **Animal**, v. 12, p. 45-52, 2018.

BASTOS, G. M. et al. Hormonal induction of ovulation and artificial insemination in suckled beef cows under nutritional stress. **Theriogenology**, v. 62, p. 847-853, 2004.

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

\_\_\_\_\_; BARUSELLI, P. S. Synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Animal**, v. 8, p. 144-150, 2014.

\_\_\_\_\_. et al. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. **Theriogenology**, p. 1-9, 2016.

CARVALHO, J. B. P. et al. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus* and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 167-175, 2008.

CAVALIERI, J.; GAINA, C; HEPWORTH, G. Randomised controlled trial of the effect of concentrations of progesterone before artificial insemination on fertility in ovulatory and anovulatory *Bos indicus* cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 96, n. 9, 2018.

COOKE, R. F. et al. Estrous expression during a fixed-time artificial insemination protocol enhances development and interferon-tau messenger RNA expression in conceptuses from *Bos indicus* beef cows. **Animal**, p. 1-7, 2019.

CORWE, M. A. et al. Parturition to resumption of postpartum cyclicity: comparative aspects of beef and dairy cows. **Animal**, v. 8, p. 40-53, 2014.

DAY, M. L. Hormonal induction of estrous cycles in anestrous *Bos taurus* beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 487-494, 2004.

D'OCCHIO, M. J.; BARUSELLI, P. S.; CAMPANILE, G. Influence of nutrition, body condition, and metabolic status on reproduction in female beef cattle: A review. **Theriogenology**, v. 125 p. 277-284, 2019.

DOROTEU, E. M.; OLIVEIRA, R. A.; PIVATO, I. Avaliação de diferentes doses de eCG na ressincronização da ovulação em vacas nelore lactantes submetidas à IATF. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 16, p. 449-457, 2014.

EMERICK, L. L. et al. Retorno da atividade ovariana luteal cíclica de vacas de corte no pós-parto: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.203-212, 2009.

FORDE, N. et al. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3–4, p. 163–169, 2011.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, c. 82-83, p. 109-126, 2004.

GIMENES, L. U. et al. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**. v. 69, p. 852-858, 2008.

GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1187-1194, 1996.

\_\_\_\_\_. The theory of follicle selection in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 57, p. 85-99, 2016.

GONÇALVES, P. B. D. et al. Anestro pós-parto em vacas de corte. In: **Anais do 1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. p. 105-116, 2004.

\_\_\_\_\_; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2ª Ed. São Paulo:Roca, 408p. 2008.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7ª Ed. Barueri: 2004.

HAWK, H. W. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. **Journal of Dairy Science**, v. 66, p. 2645-2660, 1983.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Produção da pecuária municipal 2019, 2020.

LAMB, G. C. et al. Control of the estrous cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle: A review. **Journal of Animal Science**, v. 88, (Suppl. E), p. 181-192, 2010.

MEIKLE, A. et al. Influences of nutrition and metabolism on reproduction of the female ruminant. In: Proceedings of the 10th International Ruminant Reproduction Symposium. **Animal Reproduction**, v.15, (Suppl.1), p.899-911. 2018.

MENZER, C. SCHAMS, D. Radioimmunoassay for PMSG and its application to in vivo studies. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 55, p. 339, 1979.

MIHM, M.; BLEACH, E. C. L. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 217-237, 2003.

MONA E PINTO, J. et al. Treatment with eCG decreases the vascular density and increases de glandular density of bovine uterus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 453-462, 2014.

MOURA, C. E. et al. Microvascularization of corpus luteum of bovine treated with equine chorionic gonadotropin. **Microscopy Research and Technique**, v. 78, n. 9, p. 747–753, 2015.

MURPHY, B. D. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p.223-230, 2012.

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

MUSSARD, M. L. et al. Influence of premature induction of a luteinizing hormone surge with gonadotropin-releasing hormone on ovulation, luteal function and fertility in cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 937–943, 2007.

NÚÑEZ-OLIVERA, R. et al. Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol' based treatment in postpartum anestrous beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 146, p. 111-116, 2014.

NÚÑEZ-OLIVEIRA, R.; CUADRO, F.; MENCHACA, A. Is prostaglandin F2 $\alpha$  administration at the beginning of a progesterone and estradiol-based treatment for FTAI an effective strategy in *Bos taurus* heifers? **Animal Reproduction Science**, v. 210, 2019.

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

PERES, R. F. G. et al. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and non-lactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v. 62, p. 681-689, 2009.

PERRY, G. A. et al. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. **PNAS USA**, v. 102, n. 14, p. 5268-5273, 2005.

\_\_\_\_\_; PERRY, B. L. Effect of preovulatory concentrations of estradiol and initiation of standing estrus on uterine pH in beef cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 34, p. 333-338, 2008.

\_\_\_\_\_. et al. Relationship of follicle size and concentrations of estradiol among cows exhibiting or not exhibiting estrus during a fixed-time AI protocol. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 48, p. 15–20, 2014.

PESSOA, G. A. et al. Different doses of equine chorionic gonadotropin on ovarian follicular growth and pregnancy rate of suckled *Bos taurus* beef cows subjected to timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 85, n. 5, p. 792–799, 2016.

PINTO, H. F. et al. Decreasing the dose of equine chorionic gonadotropin does not affect ovarian or pregnancy responses of purebred taurine and crossbred beef heifers. **Animal Reproduction Science**, 106474. doi:10.1016/j.anireprosci.2020.106474, 2020.

PITALUGA, P. C. S. F. et al. Manipulation of the proestrous by exogenous gonadotropin and estradiol during a timed artificial insemination protocol in suckled *Bos indicus* beef cows. **Livestock Science**, v. 154, n. 1–3, p. 229–234, 2013.

RIGOGLIO, N. N. et al. Equine chorionic gonadotropin alters luteal cell morphologic features related to progesterone synthesis. **Theriogenology**, v. 79, n. 4, p. 673–679, 2013.

ROMAN, I. et al. Dose de gonadotrofina coriônica equina (300 ou 400UI) e tempo de permanência (8 ou 9 dias) do dispositivo de progesterona em protocolos de IATF com vacas *Bos taurus* de corte lactantes: impacto na ocorrência de estro e na taxa de prenhez. **In: Anais da 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, Foz do Iguaçu, p. 232, 2016 (Resumo).

SÁ FILHO, M. F. et al. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, v. 120, n. 1–4, p. 23–30, 2010a.

\_\_\_\_\_. et al. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. **Theriogenology**, v. 73, n. 5, p. 651–658, 2010b.



\_\_\_\_\_ et al. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 182-187, 2010c.

\_\_\_\_\_ et al. Inductions of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 129, p. 132-139, 2011.

SALES, J. N. et al. Effects of eCG are more pronounced in primiparous than multiparous *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 86, n. 9, p. 2290–2295, 2016.

SANTOS, M. H. et al. Decreasing from 9 to 7 days the permanence of progesterone inserts make possible their use up to 5 folds in suckled Nelore cows. **Theriogenology**, v. 111, p. 56-61, 2018.

SANTOS, R. et al. Protocolo com nove dias de progesterona para inseminação artificial em tempo fixo em vacas taurinas adaptadas ao clima tropical. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70, n.6, p.1899-1906, 2018.

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

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

SCHAMS, D. et al. Some studies on pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle J.M. Sreenan (Ed.), Control of Reproduction in the Cow, Martinus Nijhoff, The Hague, pp. 122-143, 1978.

SIDDIQUI, M.A. et al. Effect of feeding and body condition score on multiple ovulation and embryo production in zebu cows. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 37, p. 37–41, 2002.

SILVA FILHO, P. P. C. et al. Effects of Equine Chorionic Gonadotropin on follicular, luteal and conceptus development of non-lactating *Bos indicus* beef cows subjected to a progesterone plus estradiol-based timed artificial insemination protocol. **Italian Journal of Animal Science**, v. 12, e. 61, 2013.

SOUSA, L. M. et al. Equine Chorionic Gonadotropin Modulates the Expression of Genes Related to the Structure and Function of the Bovine Corpus Luteum. **PLoS One**, v. 11, n. 10, p. e0164089, 2016

TORTORELLA, R.D. *et al.* The effect of equine chorionic gonadotropin on follicular size, luteal volume, circulating progesterone concentrations, and pregnancy rates in anestrous beef cows treated with a novel fixed-time artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v.79, p.204-209, 2013.

VASCONCELOS, J. L. M. et al. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v. 56, p. 307-314, 2001.

VELASQUEZ, P. F. et al. Impacto da dose de gonadotrofina coriônica equina (300 ou 400UI) e tempo de permanência do dispositivo de progesterona (8 ou 9 dias) no crescimento folicular em protocolos de IATF com vacas *Bos taurus* de corte. **In: Anais da 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, Foz do Iguaçu, p. 229, 2016 (Resumo).

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

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