

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

**UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE GONADOTROFINA CORIÔNICA  
EQUINA SOBRE O CRESCIMENTO FOLICULAR E TAXA DE PRENHEZ EM  
NOVILHAS DE CORTE *BOS TAURUS* SUBMETIDAS A PROGRAMA DE  
INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

HIRYA FERNANDES PINTO

Uruguaiana, RS, Brasil

2018

**HIRYA FERNANDES PINTO**

**UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE GONADOTROFINA CORIÔNICA  
EQUINA SOBRE O CRESCIMENTO FOLICULAR E TAXA DE PREENHIZ EM  
NOVILHAS DE CORTE *BOS TAURUS* SUBMETIDAS A PROGRAMA DE  
INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu 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

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela dos Santos Brum

**Uruguaiana**

**2018**

**HIRYA FERNANDES PINTO**

**UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA SOBRE O CRESCIMENTO FOLICULAR E TAXA DE PRENHEZ EM NOVILHAS DE CORTE *BOS TAURUS* SUBMETIDAS A PROGRAMA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO**

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 02 de março de 2018.

Banca examinadora:

---

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

---

Prof. Dr. Fernando Silveira Mesquita  
Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

---

Prof. Dr. Joabel Tonellotto dos Santos  
Instituto Federal Farroupilha – IFF

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Mirian, Ricardo e irmã Hisys pelo incentivo e suporte financeiro concedido durante esta fase importante;

Agradeço ao Giovane W. Carloto pelo companheirismo, apoio emocional, e suporte técnico durante a idealização e execução do experimento que compôs este mestrado;

Aos orientadores, Fabio Leivas e Daniela Brum, pela acolhida junto ao Biotech, pela oportunidade de aprendizado e pela amizade construída;

A colega Daniele Missio, por ser meu esteió diário durante essa caminhada acadêmica, pela amizade e disponibilidade em ajudar a vencer as adversidades;

A equipe Biotech, estagiários, demais colegas de mestrado, pela colaboração durante as rotinas, experimentos e aulas;

Ao Gilson S. Pessoa e a Ana Paula Martini, pelo companheirismo e amizade destes últimos anos, na execução das pesquisas científicas que unem Biotech e Embryolab (UFSM);

Aos Médicos Veterinários que apoiaram este experimento, Rafael Lagrecca e Isac Roman pela oportunidade de trabalharmos juntos;

Aos produtores rurais, que abriram as porteiras de suas fazendas e disponibilizaram as novilhas e mão de obra para a realização desta pesquisa (Pitangueiras, Estância Renascer, Cabanha Santa Camila, Âncora, Posto Branco e Fepagro. MUITO OBRIGADA!)

A empresa Zoetis, pela parceria e financiamento deste experimento;

A CAPES, pela bolsa de estudos, fundamental durante este período de mestrado;

A UNIPAMPA, professores, funcionários e técnicos. Obrigada pela manutenção desta instituição que possibilita o ensino e aprendizado de qualidade.

A banca examinadora, Dr. Fernando Silveira Mesquita e Dr. Joabel Tonellotto dos Santos, obrigada pela disponibilidade.

*“Dedico a conclusão desta etapa e este trabalho, ao colega e amigo Igor Soares Leoni (In memoriam), que compartilhou a idealização desta conquista desde o princípio.”*

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal  
Universidade Federal do Pampa

### UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA SOBRE O CRESCIMENTO FOLICULAR E TAXA DE PREENHEZ EM NOVILHAS DE CORTE *BOS TAURUS* SUBMETIDAS A PROGRAMA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

AUTORA: Hiryra Fernandes Pinto  
ORIENTADOR: Fabio Gallas Leivas  
Uruguaiana-RS, 02 de março de 2018.

Com o potencial de expansão do mercado da carne bovina brasileira, o investimento em tecnologias que aperfeiçoam a eficiência reprodutiva, na pecuária de corte, é essencial para intensificação da produção. Biotécnicas como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) contribuem, acelerando ganhos genéticos, produtivos e intensificando a utilização das fêmeas em idade reprodutiva. Embora seja uma ferramenta consolidada, as pesquisas priorizam ajustes nos protocolos hormonais, considerando as particularidades dos grupos genéticos e categoria animal. Quando se trabalha com bovinos *Bos taurus* alguns ajustes se fazem necessário, pois a maioria dos protocolos foram desenvolvidos em gado *Bos Indicus*. Em relação às novilhas *Bos taurus* existem poucos estudos avaliando qual a menor dose efetiva de gonadotrofina coriônica equina (eCG) a ser utilizada, sem prejuízo as taxas de concepção. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito sobre o crescimento folicular e a taxa de prenhez utilizando diferentes doses de eCG em novilhas *B. taurus* submetidas à programa de IATF. Foram utilizadas 1080 novilhas com idade entre 24 e 26 meses, escore de condição corporal (ECC) de  $2,90 \pm 0,02$  (1- extremamente magro 5- extremamente gordo), em 8 fazendas comerciais no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. No dia 0 (D0), as novilhas foram avaliadas quanto à ciclicidade, (presença de corpo lúteo; CLD0) e escore de condição corporal (ECC) e receberam dispositivo de liberação lenta de P4 (CIDR®, Zoetis, Campinas, SP, Brazil) e 2 mg de benzoato de estradiol IM (E2; Gonadiol®, Zoetis, Brazil). No dia 7 (D7), foram administradas 12,5 mg de dinoprost trometamina IM (PGF; Lutalyse®, Zoetis, Brazil)

e no dia 9 (D9), o dispositivo de P4 foi removido e aplicado 0,5mg de cipionato de estradiol IM (E.C.P.®, Zoetis, Brazil). Neste momento, as novilhas foram divididas de forma homogênea em 3 tratamentos: 200 UI (n=387), 300 UI (n=357) ou 400 UI (n=336) de eCG. Todas foram pintadas na base da cauda com bastão de tinta (Raidl-Maxi, Raidex GmbH, Dettingen / Erms, Germany) no momento da remoção da P4. Os animais observados sem tinta no momento da IATF foram considerados em estro. A IATF foi realizada 48h após a remoção do implante de P4 (D11). Adicionalmente, 213 fêmeas foram examinadas por ultrassonografia nos dias D9 e D11 para mensurar o diâmetro do maior folículo (FL) e no dia 18 (D18) do corpo lúteo (CL). O diagnóstico de gestação foi realizado no D41. Para a análise estatística utilizou-se o procedimento GLIMMIX do SAS, e as variáveis comparadas pelo teste Tukey-Kramer ( $P < 0,05$ ). A redução da dose de eCG não influenciou o crescimento folicular ( $P = 0,22$ ); o diâmetro do maior folículo no D11 ( $P = 0,79$ ); ocorrência de estro ( $P = 0,92$ ); taxa de prenhez (P/IA;  $52,2\% \pm 2,54$ ,  $49,77\% \pm 2,63$ ,  $51,48\% \pm 2,73$ ;  $P = 0,46$ ) e o diâmetro do CL ( $18,60 \pm 0,57$ ,  $17,92 \pm 0,67$  e  $18,93 \pm 0,5$ ;  $P = 0,29$ ), respectivamente, para dose 200, 300 e 400 UI. No entanto, a presença de CL no D0 levou a maiores tamanhos do folículo dominante em D9 e D11 ( $P = 0,006$  e  $P < 0,0001$ ), do diâmetro do CL no D17 ( $< 0,0001$ ) e P/IA quando comparada as novilhas sem CL ( $57,7\%$  vs.  $44,8\%$   $P = 0,01$ ). Com base nestes resultados conclui-se que a redução da dose de eCG para 200 UI, não acarretou prejuízos à fertilidade das novilhas, e o status de ciclicidade antes da estação reprodutiva mostrou ser um importante fator para predizer o sucesso dos programas de IATF baseado em aplicação de E2 e exposição a P4.

**Palavras-chave:** Novilhas. eCG. Puberdade. Fertilidade. Ciclicidade

## ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree  
Programa de Pós Graduação em Ciência Animal  
Universidade Federal do Pampa

### UTILIZATION OF DIFFERENT DOSES OF EQUINE CHORIONIC GONADOTROPIN ABOUT ON OVARIAN RESPONSE, OCCURRENCE OF ESTRUS AND PREGNANCY RATE IN TAI PROTOCOL IN BOS TAURUS BEEF HEIFERS

AUTHOR: Hirya Fernandes Pinto

ADVISOR: Dr. Fabio Gallas Leivas

Uruguaiana, March 2<sup>nd</sup>, 2018.

With the potential for expansion of the Brazilian beef market, investment in technologies that improve the reproductive efficiency of beef cattle is essential for the intensification of production. Biotechniques such as fixed-time artificial insemination (TAI) contribute, accelerating genetic and productive gains and intensifying the use of females of reproductive age. Although it is a consolidated tool, research prioritizes adjustments in hormonal protocols, considering the particularities of genetic groups and animal categories. The administration of gonadotropins, such as equine chorionic gonadotrophin (eCG), is widely studied, aiming to raise conception rates. The objective of the present study was to evaluate the effect on follicular growth and pregnancy rate using different doses of eCG in *B. taurus* heifers submitted to TAI program. A total of 1080 heifers with 24 and 26 months and body condition score (BCS) of  $2.90 \pm 0.02$  (1-cachectic 5-obese) were used in 8 commercial farms in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. On day 0 (D0), heifers were evaluated for cyclicity (CLD0) and BCS and received a slow release device of P4 (CIDR®, Zoetis, Campinas, SP, Brazil) and 2 mg of benzoate of estradiol IM (E2; Gonadiol®, Zoetis, Brazil). On day 7 (D7), 12.5 mg of dinoprost tromethamine IM (PGF; Lutalyse®, Zoetis, Brazil) were given and on day 9 (D9)



the P4 device was removed and 0.5 mg estradiol cypionate IM (ECP®, Zoetis, Brazil). At this time, heifers were homogenously divided into 3 treatments: 200 IU (n = 387), 300 IU (n = 357) or 400 IU (n = 336) of eCG. All were painted at the base of the tail with an ink stick (Raidl-Maxi, Raidex GmbH, Dettingen / Erms, Germany) at the time of removal of P4. The animals observed without paint at the time of TAI were considered in estrus. TAI was performed 48 hours after removal of the P4 implant (D11). In addition, 213 females were examined by ultrasonography on days D9 and D11 to measure the diameter of the largest follicle (FL) and day (D18) of the corpus luteum (CL). The pregnancy rate was performed at D41. For the statistical analysis, the GLIMMIX SAS procedure was used, and the variables compared by the Tukey-Kramer test ( $P < 0.05$ ). Reduction of the eCG dose did not influence follicular growth ( $P = 0.22$ ); the diameter of the largest FL in D11 ( $P = 0.79$ ); occurrence of estrus ( $P = 0.92$ ); (P / IA,  $52.2\% \pm 2.54$ ,  $49.77\% \pm 2.63$ ,  $51.48\% \pm 2.73$ ,  $P = 0.46$ ), and the CL diameter ( $18.60 \pm 0.57$ ;  $17.92 \pm 0.67$  and  $18.93 \pm 0.5$ ,  $P = 0.29$ ), respectively, for dose 200, 300 and 400 IU. However, the presence of CL in the D0 led to larger sizes of the dominant follicle in D9 and D11 ( $P = 0.006$  and  $P < 0.0001$ ), CL diameter in D17 ( $< 0.0001$ ) and P / IA when compared to heifers without CL ( $57.7\%$  vs.  $44.8\%$   $P = 0.01$ ). Based on these results, it was concluded that reducing the dose of eCG to 200 IU did not impair fertility of heifers, and the status cycling status before the breeding season proved to be an important factor for predict the success of the application-based TAI programs of E2 and exposure to P4.

**Keywords:** Heifers. eCG. Puberty. Fertility. Cyclicity

## LISTA DE FIGURAS

<b>Fig. 1.</b> Experimental design .....	28
<b>Fig. 2</b> Occurrence of estrus and pregnancy per artificial insemination (P/AI) in <i>Bos taurus</i> beef heifers .....	37

## LISTA DE TABELAS

<b>Table. 1</b> Descriptive analyses according to farm location.....	34
<b>Table. 2</b> Effect of eCG treatments, on the variables ovarian response, estrus of occurrence, P/AI and corpus luteum diameter ( $P>0.05$ ). .....	35
<b>Table. 3</b> Effect of cyclicity on ovarian response, occurrence on estrus and P/AI, in heifers independent of eCG treatment used. ....	36

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Ciclo estral.....	14
2.2 Puberdade .....	15
2.2.1 Fatores que interferem na puberdade .....	15
2.2.1.1 Nutrição.....	16
2.2.1.2 Grupos genéticos .....	17
2.3 Manejos reprodutivo de novilhas .....	18
2.4 Programas hormonais .....	19
2.5 Utilização de eCG em programas de IATF .....	20
3 OBJETIVO.....	23
3.1 Objetivo geral .....	23
3.2 Objetivo específico.....	23
4 ARTIGO CIENTÍFICO .....	24
5 CONCLUSÃO .....	43
6 PERSPECTIVAS .....	44
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, composto por 215,2 milhões de cabeças (IBGE, 2016). Embora enfrente dificuldades operacionais internas, o país segue entre os líderes no ranking mundial de produção (2º colocado, 9,450 mil toneladas) e exportação (1º colocado, 1,760 mil toneladas) de carne bovina, sendo impulsionado pelas exportações (USDA, 2017). A disponibilidade de terra e água, a oferta de qualidade genética bovina, juntamente com a forte demanda internacional por proteína animal, são fatores que estimulam investimentos em tecnologia e infraestrutura. Com a necessidade de melhorar os índices zootécnicos, características como a eficiência reprodutiva e produtiva, são imprescindíveis na viabilidade econômica da bovinocultura de corte brasileira. Investimentos em biotécnicas, como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), possibilitam o manejo reprodutivo a campo e auxiliam o aumento da eficiência dos sistemas de criação de vacas e novilhas. Nesse sentido, a intensificação e adequação dos manejos, proporcionam maior aproveitamento das fêmeas em idade reprodutiva maximizando a eficiência do rebanho (um terneiro/vaca/ano).

Os programas de IATF proporcionam agilidade na seleção por precocidade sexual, melhoram o ganho genético e contribuem para se conseguir a uniformidade do rebanho, assim como para a redução do período da estação de parto, além de facilitar os manejos e uso da inseminação artificial (IA). A evolução dos programas de IATF levou ao incremento de bovinos inseminados no Brasil, levando à grande impacto no ganho genético. Embora consagrados, os protocolos hormonais utilizados em programas de IATF ainda passam por adaptações, visando aumentar as taxas de prenhez, considerando aspectos fisiológicos e econômicos.

A eficiência reprodutiva das fêmeas bovinas está diretamente associada com a idade e a época da primeira parição (primeiro, segundo ou terceiro serviço das novilhas). Novilhas que se tornam gestantes mais cedo e conseqüentemente tem o parto no início da temporada reprodutiva são consideradas como preceitos de longevidade e rentabilidade no sistema de produção (CUSHMAN et al., 2013; PERRY et al., 2007). No entanto, a precocidade sexual de novilhas é dependente de uma diversidade de estímulos ambientais, genéticos, fisiológicos e comportamentais (FORDE et al., 2011; SARTORI; BARROS, 2011). Assim, levando em consideração o sistema de criação extensivo e o grande número de fêmeas que chegam aos 22-24 meses de idade ainda em anestro, o aperfeiçoamento de programas reprodutivos para

antecipação da puberdade e sincronização de estro e ovulação em novilhas tornam-se economicamente necessários e viáveis.

Estratégias que intensifiquem a resposta dos tratamentos hormonais, como a administração de gonadotrofinas, são cada vez mais estudadas por serem capazes de aumentar a taxa de serviço e concepção em novilhas (PERES et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2010a). Neste contexto, a utilização da gonadotrofina coriônica equina (eCG) em programas de IATF em novilhas *Bos taurus*, assim como o ajuste da dose administrada são procedimentos pontuais que necessitam ser estudados, uma vez que, grande parcela dos relatos encontrados na literatura abrangem resultados envolvendo bovinos do grupo genético *B. Indicus*. Em novilhas de corte *B. taurus*, a utilização de eCG em programas de IATF ainda deixam lacunas a serem exploradas, pois atualmente as dosagens utilizadas para novilhas de corte *B. taurus*, são as preconizadas em vacas ou em outros grupos genéticos, sendo necessários mais estudos que compreendam as particularidades apresentadas para essa categoria.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Ciclo estral

Ciclo estral denomina-se o período compreendido entre um estro e outro, com intervalo médio de 21 dias (18 a 24 dias) em bovinos. Cada ciclo é composto por duas fases envolvendo a emergência de duas ou três ondas de crescimento folicular, sendo que apenas um folículo (FL), da última onda, atinge a dominância, maturação e ovulação (FORDE et al., 2011). O ciclo estral pode ser dividido em duas fases: folicular e luteínica. A fase luteínica (14 a 18 dias) é caracterizada pela luteinização das células foliculares. Cursa com a formação e predominância de um corpo lúteo (CL), que é responsável pela manutenção de altas concentrações de progesterona e caracteriza-se pela emergência de ondas de crescimento folicular (metaestro e diestro) sem a ocorrência da ovulação. Após a luteólise, com o desaparecimento do CL, segue a fase folicular (4 a 6 dias). Durante essa fase há predominância e maturação de um folículo dominante (FD), levando a altas concentrações de estradiol, seguida da manifestação do estro e ovulação (proestro e estro; FORDE et al., 2011).

A funcionalidade do eixo reprodutivo depende da maturação neuroendócrina e regulação das concentrações hormonais séricas. Desta forma, estímulos multifatoriais dão início à excitação de neuroreceptores hipotalâmicos. Em bovinos a secreção de estradiol pelo FL ativa pulsos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo (ATKINS; POHLER; SMITH, 2013). Seguidamente, um sistema de retroalimentação de alça curta inicia a comunicação entre hipotálamo-hipófise (HAFEZ, B.; HAFEZ, 2004), levando a modulação da secreção de GnRH. Este coordena a liberação de gonadotrofinas como o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e o Hormônio Luteinizante (LH), armazenados pela hipófise (ATKINS; POHLER; SMITH, 2013). O FSH e o LH são responsáveis pela sensibilização de receptores ovarianos, promovendo crescimento e maturação folicular, além da liberação de esteroides gonadais (DUITTOZ et al., 2016). As estruturas ovarianas, possuem função glandular, logo secretam inibina, ativina, estrógeno e progesterona realizando a comunicação entre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal estabelecendo uma relação de *feedback*. No entanto, este sistema só irá ocorrer de forma cíclica após a puberdade.

## 2.2 Puberdade

A puberdade é estabelecida a partir da primeira ovulação, antecedida por sinais de estro e seguida pela formação do CL funcional (ATKINS; POHLER; SMITH, 2013). Neste período, sucede a maturação do eixo reprodutivo, estabelecendo um padrão cíclico da atividade ovariana, tornando a fêmea apta a reproduzir (FORDE et al., 2011). Geralmente, novilhas *B. taurus* iniciam a puberdade entre 6 e 12 meses de idade, sob a influência do peso corporal, próximo de 250 Kg (FORDE et al., 2011).

Estímulos autócrinos e parácrinos implicam na sensibilização do eixo porta-hipotalâmico-hipofisário (HAFEZ, B.; HAFEZ, 2004). Prévias a puberdade, uma exacerbada sensibilidade a hormônios esteroides sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário leva a falha na atividade secretora de gonadotrofinas, impedindo que haja estímulo suficiente para o crescimento, divergência e maturação folicular (AMSTALDEN et al., 2014). Durante o período pré-púbere, os níveis de estrógeno (E2) circulantes, proveniente dos folículos, suprime a secreção de GnRH (DAY et al., 1987; MORAN; QUIRKE; ROCHE, 1989), o qual realiza o efeito inibitório (*feedback* negativo) sobre a liberação episódica de LH, mantendo sua concentração sérica em baixa frequência (DAY et al., 1987). Cerca de 50 dias que antecedem o estro púbere, dá-se a diminuição do *feedback* negativo do E2 no hipotálamo, aumentando a frequência dos pulsos de GnRH/LH (DAY et al., 1987; MORAN; QUIRKE; ROCHE, 1989; PERRY, 2016), sendo esta condição necessária para que ocorra a ovulação de um folículo dominante (FD). No entanto, entre a primeira ovulação e a puberdade existe uma assincronia, que leva a ocorrência de ciclos estrais curtos e ovulações silenciosas (MORAN; QUIRKE; ROCHE, 1989)

### 2.2.1 Fatores que interferem na puberdade

O status nutricional e a seleção genética são características importantes para o desenvolvimento de ciclos estrais normais. Assim, a maturação do sistema reprodutivo é influenciada pela sinalização de hormônios metabólicos. Estes modulam a ação de neuropeptídeos hipotalâmicos na secreção de GnRH e aumento da concentração sérica de progesterona (AMSTALDEN et al., 2014; BYERLEY et al., 1987). Adicionalmente o início



da puberdade ainda sofre influência da seleção por características reprodutivas (BASARAB et al., 2007).

### **2.2.1.1 Nutrição**

O status nutricional influencia diretamente no desempenho reprodutivo dos bovinos. As reservas energéticas e o perfil metabólico pós-natal são considerados fatores determinantes no progresso da puberdade (AMSTALDEN et al., 2014; DAY et al., 1984). Estudos relatam que a idade a puberdade apresenta-se menor quanto maior o ganho de peso antes e pós desmame (PATTERSON et al., 1992; WILTBANK et al., 1966). Mesmo quando bezerras são desmamadas precocemente ( $73 \pm 3$  dias de idade), ao receber uma dieta com alto ganho de energia apresentam aumento da frequência dos pulsos de LH, acelerando a ocorrência da puberdade (GASSER et al., 2006). O aumento das reservas corporais antes do desmame, leva a maior síntese e secreção de hormônios metabólicos, como a leptina (CARDOSO et al., 2014). O aumento da leptina, atua sobre a expressão de neurônios reguladores da secreção de GnRH, levando a redução dos sinais inibitórios promovido pelo neuropeptídeo Y (NPY), estimulando sinais excitatórios de propimelanocortina (POMC) e aumentando a inervação de neurônios Kisspeptin (Kiss). Além disso, a leptina atua sobre a sinalização neural mediando conexões aferentes a GnRH, sobretudo, agindo em células sensitivas no núcleo arqueado. Desta forma, o aumento das taxas de ganho de peso, durante o período juvenil influencia a expressão de genes no núcleo arqueado. Este aumento de sinalização na interação de hormônios metabólicos pós-natal, pode ser observada em estudos realizados em camundongos e novilhas, onde o ganho de condição corporal atuou positivamente promovendo a maturação do eixo neuroendócrino reprodutivo (AMSTALDEN et al., 2014).

No sistema de criação extensivo, como o utilizado no Brasil, o consumo de forragens com baixo teor nutricional é um dos principais fatores que retardam a maturidade sexual de novilhas. A idade em que indivíduo atinge a maturidade sexual, portanto, tende a ser proporcional ao seu peso adulto (TAYLOR; FITZHUGH H. A., 1971), quanto mais leve, mais avançada será a idade à puberdade (SHORT; BELLOWS, 1971; WILTBANK et al., 1966). Sendo assim, a influência nutricional é um dos fatores que traz maior impacto à fertilidade do rebanho.

### 2.2.1.2 Grupos genéticos

As distinções entre novilhas *B. indicus* e *B. taurus* são maiores do que a conformação morfológica. Desde que a ultrassonografia passou a ser utilizada e as características ovarianas passaram a ser estudadas, aliadas a concentrações séricas de hormônios metabólicos, esteroides e andrógenos estas diferenças são cada vez mais conhecidas. O desencadear da puberdade assemelha-se entre os dois grupos genéticos, no entanto ocorre de forma mais precoce em fêmeas *B. taurus* (RODRIGUES; KINDER; FITZPATRICK, 2002). Isto pode ser explicado pela interferência humana na seleção genética de novilhas *Bos taurus* para puberdade (BASARAB et al., 2007; CROWLEY et al., 2011), desenvolvendo a precocidade sexual e alta produtividade (NOGUEIRA, 2004). Especificamente é estabelecida variação entre 9 a 12 meses de idade para taurinas e 16 a 40 meses para zebuínas (FAJERSSON et al., 1991).

Mesmo quando novilhas de ambos os grupos genéticos são submetidas às mesmas condições de manejo, nutrição e ambiente, são observadas diferenças substanciais de cunho fisiológico. Apesar do menor diâmetro das estruturas ovarianas, novilhas *B. indicus* apresentam maior concentração de hormônios esteroides, quando comparado a fêmeas *B. taurus*. É sugerido que essa evolução da produção de esteroides em fêmeas *B. indicus* é proporcional à maior concentração de colesterol circulante (SARTORI et al., 2016). Ainda, hormônios metabólicos também atuam, interagindo na proliferação celular e esteroidogênese (WEBB et al., 2004). O sistema IGF1 e a insulina são reguladores metabólicos que atuam a nível hepático na depuração de hormônios esteroides e estão associadas com a atividade ovariana (SARTORI et al., 2010, 2016). É observado em fêmeas *B. indicus* que as concentrações de IGF-1 circulante estão correlacionadas positivamente ao maior número de folículos emergentes por onda folicular (ALVAREZ et al., 2000). Mesmo assim, novilhas *B. taurus* apresentam-se mais eficientes em características reprodutivas, mostrando que a seleção dos animais por características reprodutivas são essenciais para melhorar a fertilidade do rebanho, mesmo que esse impacto seja observado a longo prazo.

### 2.3 Manejos reprodutivo de novilhas

A conformação, a condição corporal, o fator genético e a hereditariedade são aspectos importantes para produtividade, no entanto, o manejo estratégico das novilhas é fundamental. Sabe-se que novilhas, devem conceber logo no início da estação reprodutiva, para conseguir atingir a máxima capacidade de produção (kg/terneiro/vaca/ ao longo da vida reprodutiva). Novilhas de corte que concebem cedo, durante a época inicial de reprodução e parem no primeiro período de 21 dias da estação de parto, apresentaram maior percentual de prenhez e peso de desmame de terneiros, nos primeiros 6 partos (CUSHMAN et al., 2013). Além disso, a taxa de prenhez por IA é menor para novilhas em seu primeiro estro em comparação com as inseminadas no segundo ou terceiro estro, podendo ser observado incremento de 21% na fertilidade do primeiro ao terceiro estro (BYERLEY et al., 1987). Portanto, a seleção de animais jovens e aptos a reproduzir no início da estação reprodutiva é imprescindível para eficiência e longevidade de fêmeas bovinas de corte. Neste sentido, as terapias hormonais também podem auxiliar, visto que, favorecem a puberdade e/ou melhoram as taxas de serviço, estimulando o aumento de eficiência reprodutiva.

Durante a puberdade, a maturação, crescimento uterino, estruturas ovarianas e regulação dos receptores neurais hipotalâmicos ocorrem em sincronia (ATKINS; POHLER; SMITH, 2013). Estes indicativos para ciclicidade podem ser mensurados a partir do exame ginecológico interno avaliando-se o grau de contratilidade uterina, diâmetro e presença de estruturas ovarianas. Baseado nesta concepção, Anderson *et al.*, (1991) propuseram a classificação do Escore do Trato Reprodutivo (ETR) usando uma escala entre 1 e 5, indicando imaturidade sexual, anestro, pré puberdade e puberdade. No: ETR 1, o útero é pequeno, sem a presença de tônus e os ovários são pequenos e com folículos não palpáveis; no ETR 2, o útero é pequeno, sem tônus e os ovários possuem FL pequenos (8 mm); no ETR 3, o útero apresenta tônus e os ovários contem FL médios (8-10 mm); no ETR 4, o útero apresenta tônus e os ovários possuem FL grandes (> 10mm); já no ETR 5, o útero apresenta tônus e há a presença de CL em um dos ovários, demonstrando que a fêmea está ciclando.

Estudos confirmam que o ETR pode ser utilizado como marcador para diagnosticar ou estimar a eficiência reprodutiva de novilhas, possibilitando o reconhecimento e seleção de novilhas púberes (ROSENKRANS; HARDIN, 2003). Seguindo este método, novilhas diagnosticadas púberes (ETR 5) ou muito próximo da puberdade (ETR 4), apresentam maior probabilidade de prenhez em programas de sincronização de estro e ovulação, quando

comparadas a novilhas imaturas (ETR 3, 2 ou 1; PERRY, 2012). A imaturidade sexual torna-se um agravante no manejo de novilhas que adentram a estação reprodutiva, principalmente em novilhas diagnosticadas com ETR 2 e 1. Para esta situação, estímulos exógenos como a utilização de esteroides associando progestágenos pode ser uma ferramenta eficaz para indução da puberdade.

## 2.4 Programas hormonais

Os programas de sincronização de estro e ovulação para IA estão no mercado a mais de 30 anos. (LAMB et al., 2010). Inicialmente o desenvolvimento de um protocolo de sincronização para novilhas não foi tão fácil, devido à dificuldade em sincronizar as ondas foliculares com o mesmo nível de sucesso que o alcançado em vacas (LAMB et al., 2006). O desenvolvimento de protocolos de sincronização da ovulação práticos e econômicos facilitam os manejos de IA, no entanto, devem ser avaliados considerando a sua eficácia na sincronização do estro entre populações de novilhas cíclicas ou não (LEITMAN et al., 2008). As pesquisas mostraram que as novilhas nem sempre ovulam folículos em resposta aos protocolos GnRH, amplamente utilizados para o gado leiteiro, e que foram a gênese dos protocolos desenvolvidos para a sincronização de estro em bovinos de corte (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995). Estratégias como a exposição de novilhas à progestágenos mostraram ser eficientes em modular a secreção pulsátil de LH, diminuindo o *feedback* negativo de estradiol, promovendo a indução de puberdade. Para isto, diversos manejos foram estudados, nas formas de implante intravaginal (ANDERSON; MCDOWELL; DAY, 1996); via oral (IMWALLE; PATTERSON; SCHILLO, 1998); ou subcutânea (GRINGS et al., 1998).

A manipulação hormonal do ciclo estral baseado em progesterona e estrógeno (P4+E2) em programas de IATF auxilia na modulação hipotalâmica regulando a liberação de gonadotrofinas (BO et al., 2000; PESSOA et al., 2015). Estratégias utilizando P4+E2 se mostraram eficazes, quando manipuladas antes da estação reprodutiva, aumentando a percentagem de novilhas púberes antes da IATF. Este manejo capacita à formação do CL de função normal quando comparado às novilhas não expostas, influenciando positivamente os resultados de prenhez (JÚNIOR et al., 2010; VRISMAN et al., 2018).

No entanto, estudos realizados em novilhas submetidas a programas de IATF mostram que a exposição a altas concentrações de P4 exógena, pode restringir o crescimento do FD, intervindo negativamente sobre a taxa de ovulação e o sucesso da gestação em novilhas nelore (CARVALHO et al., 2008). As concentrações de P4 sérica atuam negativamente sobre o crescimento folicular, quando seguem em altas concentrações séricas após a divergência do FD. Para isto, resultados de pesquisa sugerem que a administração de PGF2 $\alpha$  auxilia no crescimento final do folículo pré ovulatório (FP), tanto quando aplicada no dia 0 (CARVALHO et al., 2008), como 2 dias antes da remoção do dispositivo intravaginal (SÁ FILHO et al., 2009). Contudo, levando em consideração a puberdade e a fisiologia reprodutiva dos grupos genéticos, é notado maior velocidade de metabolização de P4 em raças *B. taurus*, quando comparada ao cruzamento entre raças *B. indicus x B. taurus* e *B. indicus* (CARVALHO et al., 2008). Isto sugere que novilhas taurinas não são tão sensíveis à ação de P4. Além disto, estratégias como a utilização de gonadotrofinas tornam-se uma alternativa importante, uma vez que melhoram as taxas de crescimento folicular e ovulação.

## **2.5 Utilização de eCG em programas de IATF**

Buscando potencializar os resultados na taxa de prenhez, estratégias como a administração de gonadotrofinas são consideradas substanciais. A eCG é uma glicoproteína descoberta na década de 30, produzida pelas células dos cálices endometriais de éguas entre 40 e 130 dias de gestação (MURPHY; MARTINUK, 1991). Em equinos, a eCG causa ovulação ou luteinização de folículos durante a gestação, elevando a progesterona circulante. Em outras espécies, a eCG apresenta característica folículo estimulante e luteinizante (COLE; HART, 1930; MURPHY; MARTINUK, 1991), ou seja, realiza a ligação aos receptores de FSH e LH localizados nas células da granulosa e da teca, promovendo crescimento e maturação folicular e consequente ovulação (SOUMANO; LUSSIER; PRICE, 1998).

A eCG é uma molécula composta de duas subunidades ( $\alpha$  - composta por 96 aminoácidos; e  $\beta$  - composta por 149 aminoácidos) com grande quantidade de carboidratos (aproximadamente 45% de sua massa), principalmente a N-acetil-neuramina (ou ácido siálico; MURPHY; MARTINUK, 1991b). Estas características conferem alto peso molecular e meia vida longa, permanecendo perceptível até 10 dias após a aplicação (PAPKOFF, 1981).

Quando administrada após a divergência folicular favorece o crescimento final do FD, melhora as taxas de ovulação, leva a formação de CL de maior volume, estimulando a expressão de enzimas esteroidogênicas e levando a maiores taxas de concepção. A aplicação do eCG, antes da divergência folicular, parece ativar através do sistema IGF1, os caminhos necessários para aumentar a disponibilidade de glicose e o crescimento celular (SALES et al., 2016). Em programas hormonais a administração da eCG mais usual é realizada após a divergência folicular e auxilia a encurtar o anestro pós-parto em vacas, sendo capaz de induzir crescimento e ovulação de folículos em novilhas pré-puberes (DORNELES TORTORELLA et al., 2013; DUFFY et al., 2004). Sobretudo, é observado maior intensidade estimulatória em fêmeas com folículos pequenos e médios (4-8 mm de diâmetro) melhorando os resultados de prenhez (SÁ FILHO et al., 2010b), assim como em vacas lactantes, em anestro pós parto e com baixo ECC (BÓ et al., 2007, 2016; MARQUES et al., 2013 MARQUEZINI et al., 2013). A proliferação celular está relacionada com a secreção de estradiol e a preparação do ambiente uterino (BARUSELLI et al., 2004; DORNELES TORTORELLA et al., 2013; MENEGHETTI et al., 2009; RIGOGLIO et al., 2013; SÁ FILHO et al., 2010a, 2009). Além disso, as novilhas tratadas com eCG apresentaram maiores taxas de detecção e ovulação do estro, devido ao aumento subsequente das concentrações de estradiol (PERES et al., 2009; RODRIGUES et al., 2013). Após a ovulação, a eCG segue atuando, melhorando a qualidade do CL, apresentando capacidade de ligar a receptores de LH no CL e aumentando a capacidade luteotrófica, com a proliferação de células lúteas grandes (SOUSA et al., 2016). Estudos em vacas mestiças comprovam as alterações morfofuncionais no CL, a partir da utilização de eCG, levando ao aumento do volume e produção de P4 durante a fase lútea subsequente (RIGOGLIO et al., 2013). Ou seja, o tratamento com eCG tem efeito angiogênico e aumenta a densidade vascular no parênquima lúteo (MOURA et al., 2015).

Em programas de IATF em vacas lactantes, é comprovado que o tratamento com eCG melhora as taxas de ovulação e prenhez, assim como eleva as concentração sérica de progesterona após a ovulação tanto para *B indicus* (SÁ FILHO et al., 2010a, 2009; SALES et al., 2011) como para *B. taurus* (CUTAIA et al., 2003; PESSOA et al., 2015; SMALL et al., 2009). Atualmente, as pesquisas buscam adequar a melhor forma de utilização da eCG, considerando o metabolismo hormonal de cada categoria, grupo genético e visando à diminuição do volume de aplicação (AYRES et al., 2009; PESSOA et al., 2015; SÁ FILHO et al., 2009). A redução do volume de eCG administrada possibilita maior economia em protocolos hormonais sem causar prejuízos na taxa de prenhez. Estudos relatam resultados satisfatórios ao reduzir a dose de 400 UI para 300 UI de eCG em vacas lactantes, tanto para

*Bos indicus* (SÁ FILHO et al., 2010a), como para *Bos taurus* (PESSOA et al., 2015). Alguns estudos apontam a utilização de dosagens ainda menores, como 200UI, levando a resultados positivos em vacas de corte *B. indicus* lactantes (DOROTEU. E. M.; OLIVEIRA. R. A. E PIVATO. I., 2015). No entanto, vacas *B. indicus* apresentam diferenças sutis quando comparado a *B. taurus*, como a sensibilização a gonadotrofinas exógenas. Para vacas *B. taurus* lactantes este resultado não se confirmou (MARQUEZINI et al., 2013).

Efeito semelhante ao das vacas foi observado em novilhas *B. indicus*, levando ao incremento nas taxas de concepção em programas de IATF (BARUSELLI et al., 2004; BÓ et al., 2007; MARQUES et al., 2005). Além disso, o tratamento com diferentes concentrações de eCG no momento da remoção da P4, também foi eficiente para novilhas *B. indicus*, melhorando o diâmetro folicular no momento da IATF (11,50 +/- 0,10 mm, 11,90 +/- 0,11 mm e 12,00 +/- 0,10 mm) aumentando as taxas de ovulação (83,8%, 88,5% e 94,3%), concentração de progesterona sérica no D18 (2,77 +/- 0,11 ng / mL, 3,81 +/- 0,11 ng / mL e 4,87 +/- 0,11 ng / mL), e prenhez (41,3%, 47,0% e 46,7%) para os tratamentos: 0, 200 e 300 UI de eCG, respectivamente (PERES et al., 2009). Posteriormente, resultados similares foram observados em novilhas *B. indicus* ciclando, onde diferentes doses foram testadas levando a taxas de concepção de 40,8%, (122/299) vs 45,8%, (132/288) para 200 e 300 UI de eCG, respectivamente (GIROTTTO et al., 2016). No entanto para novilhas *B. taurus* não existem estudos avaliando a dosagem mais adequada a ser utilizada e/ou se a redução da dose pode ser efetivada sem prejudicar a fertilidade em programas de IATF. Portanto, torna-se relevante avaliar o efeito de diferentes doses de eCG em novilhas *B. taurus*, visto que os protocolos utilizados extrapolam as concentrações utilizadas em outras categorias animais ou grupos genéticos.

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo geral**

- Avaliar o efeito da redução da dose de eCG (20UI) em novilhas de corte (*Bos taurus*) submetidas a protocolos de sincronização da ovulação para IATF

#### **3.2 Objetivo específico**

Avaliar a o efeito da redução do eCG (400, 300 e 200UI) sobre:

- A taxa de estro e prenhez;
- O crescimento final do provável folículo pré ovulatório, a partir do monitoramento do crescimento folicular por ultrassonografia;
- O diâmetro do CL por ultrassonografia 7 dias após a inseminação;
- A interação com a ciclicidade das novilhas.



#### 4 ARTIGO CIENTÍFICO

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

## Ovarian and pregnancy responses of beef heifers treated with different doses (200, 300 and 400 IU) of equine chorionic gonadotropin in an estradiol plus progesterone based TAI protocol

### ABSTRACT

This study evaluated the effect of different doses (200, 300 or 400 IU) of equine chorionic gonadotrophin (eCG) in timed artificial insemination (TAI) protocol on follicular growth, occurrence of estrus and pregnancy rate in *Bos taurus* beef heifers. A total of 1080 heifers presenting 24-26 months old, and average body score of  $2.9 \pm 0.02$  (1 to 5 scale), from 8 commercial beef farms were utilized. At the onset of the synchronization (D0), heifers were examined by ultrasound to evaluate the presence of CL (CLD0) and received an intravaginal P4 device plus 2 mg of estradiol benzoate IM. On D7, 12.5 mg of dinoprost IM were administered. The P4 device was removed and it was administered 0.5mg of estradiol cypionate IM on D9. At this moment, heifers were blocked by the presence of CL on D0 and were randomly assigned in one of three treatments: 200 IU (n=387), 300 IU (n=357) or 400 IU (n=336) of eCG. Estrus occurrence was evaluated using tail chalk painted at P4 device removal and evaluated at TAI 48 later (D11). A subset of heifers (n=213) had the largest follicle (LF) evaluated at D9 and at D11 and the new the corpus luteum (CL) formed at D18. No effect of eCG treatment was detected on LF on D11 ( $P=0.79$ ), on occurrence of estrus ( $P=0.92$ ), and on 30d pregnancy rate (52.2%, 49.8% and 51.5% for 200IU, 300IU and 400IU, respectively;  $P=0.46$ ). Regardless of the treatment ( $P=0.12$ ) greater pregnancy rate (30d) was detected when heifers presented a CL at onset of the synchronization protocol (CL 57.7% vs. No CL 44.8 %  $P= 0.01$ ). Therefore, it's possible reduce the dose of eCG from 400IU to 200IU in *Bos taurus* beef heifers with no detrimental impact on ovarian, estrus and pregnancy responses.

**Keywords:** Heifers. eCG. Follicular grow. Pregnancy rates. Cyclicity

## 1. Introduction

In beef cattle production systems, female fertility is a factor of high impact being the production cost absorbed by born calves. Heifers that reach puberty early are more likely to become pregnant in their first breeding season and have greater lifetime productivity [1]. Therefore, adequate reproductive management in heifers to achieve gestation at the beginning of the breeding season is essential for the female's future productive life. In extensive breeding systems the exposure to ovulation synchronization protocols is fundamental to improve the conception results in heifers.

In heifers, the treatment with gonadotrophins, as the equine chorionic gonadotropin (eCG) at the time of CIDR removal, increases fertility in TAI protocol and is related with the additional stimulus in the follicular development, enhancing probability of ovulation and pregnancy [2–5]. Also has been used to minimize the negative effects of progesterone on follicular development [1,6]. The eCG is a glycoprotein of long half-life produced by the cells of the endometrial cups in pregnant mares [7]. Furthermore, eCG leads to formation of larger corpus luteum (CL) and increase circulating progesterone (P4) [3–5,8,9]. However, eCG represents a high cost in the synchronization conventional protocol [3,10] (400IU, 48.78%). Reduction of the eCG dose utilized can be economically important enabling an application of the protocol without reducing pregnancy rates at FTAI.

Previous studies showed the positive effects of eCG treatment in cows, mainly in those presenting low body condition score (BCS) or not cycling at onset of the synchronization protocol [2,3,8,11–14]. Studies in suckled *Bos indicus* cows demonstrated that the reduction of 400 to 300 IU, in E2-plus-P4-based synchronization protocols, were similarly efficient to improve pregnancy to artificial insemination [2]. In addition, other studies reported the satisfactory efficiency of the administration of lower doses, such as 200 IU, of eCG in suckled *B. indicus* beef cows and heifers [1,15]. In *Bos taurus* suckled beef cows synchronized the reduction doses of 400 IU to 300IU also showed satisfactory results [11] However, with a GnRH-plus-PGF2a-based TAI protocol, Marquezini et al. [16], failed to find any improvement on pregnancy per artificial insemination (P/AI) after administering 400IU of eCG versus calf removal and 200 IU of eCG versus control group (0UI). Finding the minimal effective dose of eCG reduce costs of TAI programs and deserves further investigation. However, the minimal effective doses need to be tested in *B. taurus* beef heifers since for *B. taurus* heifers no reports are found on the effective dose to be used.

We hypothesized that in *Bos taurus* beef heifers submitted to a P4-plus-E2-based TAI, the reduction of the eCG dose to 200IU can be used without affecting pregnancy rate. Thus, the aims of the present study were to evaluate the impact of the eCG doses (400, 300 or 200 IU) administrated at P4 removal, and verify the effect of dose on ovarian follicular growth, pregnancy rates and corpus luteum diameter.

## 2- Material and methods

### 2.1. Animals and management

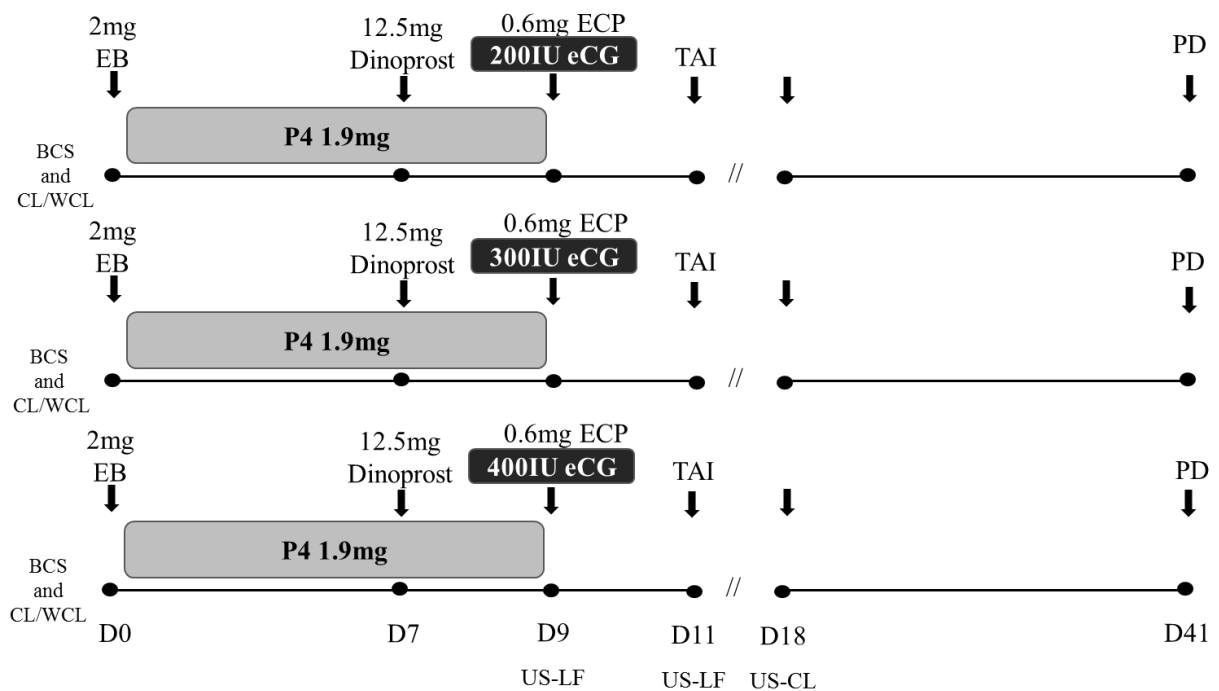
This experiment was conducted in eight commercial beef farms located in two distinguished regions (Region 1: 29°47'S - 56°58'O and region 2: 29°27'S-53°42'O) of Rio Grande do Sul State, Brazil, during the period from July of 2016 to January 2017. The study was carried on 1080 *Bos taurus* beef heifers (Angus, Hereford, Brangus and Braford), ranging between 24 - 26 months of age. Were given BCS (1= emaciated, 5= obese [18]) and CL D0 or No CL at enrollment (D0). Information regarding the heifers breed, BCS and CL D0 at the beginning of the TAI protocol, and breeding group within each farm location is shown in **Table 1**.

All the experimental procedures and protocols described in this study were approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation from the Universidade Federal do Pampa (protocol number 033/16).

### 2.2. Experimental design

The TAI protocol (Fig. 1) was initiated on random days of the estrous cycle, designated as D0. At this moment, heifers were blocked by the presence of CL on D0 (n = 704). Within each they were randomly assigned into one of three treatments with 200IU (n=387), 300IU (n=357) or 400IU (n=336) of eCG, IM (Novormon<sup>®</sup>, Zoetis, Campinas, São Paulo, Brazil) administered on D9. The synchronization protocol consisted of the insertion of

a controlled internal drug releasing device (CIDR, 1.9 g of P4; Zoetis) on D0 and 2 mg of intramuscular (IM) estradiol benzoate (Gonadiol<sup>®</sup>, Zoetis). At seventh day of protocol (D7) all heifers received 12.5 mg of Dinoprost Tromethamine (Lutalyse<sup>®</sup>, Zoetis). On D9 the P4 device was removed, the females had their tail-heads painted with chalk paint (Raidl-Maxi, Raidex GmbH, Dettingen / Erms, Germany), plus 0,5 mg of estradiol cypionate IM (E.C.P.<sup>®</sup>, Zoetis) were administered to all animals. The heifers were timed artificially inseminated 48 hours later (Fig. 1). Semen from 16 different bulls was using during TAI. All batches from each bull were analyzed. Only batches with sperm quality features exceeding the minimum requirements of the Brazilian College of Animal Reproduction [17], namely 35% progressive sperm motility and a maximum of 30% total abnormal sperm cells after thawing, were used.



**Fig. 1.** Experimental design. BE=2 mg of estradiol benzoate; ECP=0.6 mg of estradiol cypionate; dinoprost = 12.5 mg of dinoprost tromethamine; FTAI = timed artificial insemination performed 48 hours after removal of the progesterone (P4) insert; BCS= body condition score; CL/WCL= cyclicity/ without cyclicity; LF= largest follicle; CL= corpus luteum; US= ultrasound examinations PD= pregnancy diagnosis.

### *2.3. Ultrasonography examinations*

Transrectal ultrasonography of both ovaries was first on the day (D0) to identify the presence or absence of a CL. At the time of implant removal (D9) and immediately before TAI (D11), ovaries were evaluated to measure the diameter of the largest follicle (LF), and 7 days later (D18) to determine the presence and the diameter of the resulting CL. A real-time ultrasonic scanner equipped with a 6.0 MHz/ 8.0 MHz linear transducer (Aloka- SSD500) was used. The growth rate of the LF (mm/day) were defined as the difference between the diameter of the LF on Days 11 and 9, divided by the number of days (two). In day 18 (D18), was measured the size of a CL, on the same ovary where the LF was detected on Day 11. Pregnancy diagnosis was performed by ultrasonography 30 days after TAI. Pregnancy per AI (P/AI) was defined as the number of pregnant heifers divided by the total number of heifers submitted to TAI in each treatment (200 IU, 300 IU or 400 IU eCG).

### *2.4. Detection of estrus*

The cows had their tailheads marked with chalk (Raidl-Maxi; RAIDEX GmbH, Dettingen/Erms, Germany) at the removal of the P4 insert (D9). The occurrence of estrus was evaluated at TAI and was determined based on the removal of the tailhead mark. Estrus we deemed to have occurred in cattle without a tailhead chalk mark at TAI.

### *2.5. Statistical analysis*

Statistical analysis we performed using the SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2000). Explanatory variables considered for inclusion in the statistical models were BCS, treatments of eCG and presence of a CL on D0. Dependent variables (diameter of the LF on D9, diameter of the LF at FTAI, growth rate of the LF from the time of implant removal (D9) until TAI (D11) and diameter of the CL 7 days after TAI), were analyzed by two-way ANOVA using PROC GLM. Response variables were tested accordingly to their homogeneity and normality of variances using Guide Data Analysis from SAS. The follicle growth rate (FG) was determinate by equation:  $FG = (\text{diameter of LF at D11} - \text{diameter of LF at D9}) / 2$

diameter of LF at D9)/2 days. The data of follicle growth rate was analyzed by Glimmix of SAS, using Gaussian response distribution, not blocked and included fixed effects: body score condition, treatment, cyclicity (occurrence of CL at D0 of protocol) and cyclicity vs treatment. The diameter of the CL on D7 after TAI and pregnancy rate, was log transformed to reach normality. These variables were analyzed using the procedure Glimmix of SAS, the averages were compared by Tukey-Kramer test. Differences were considered significant when  $P \leq 0.05$ .

### **3- Results**

#### *3.1 – Effects of treatment on ovarian response, estrus occurrence and pregnancy rates*

The growth rates of the LF at the time of implant removal (D9) until artificial insemination (D11:P=0.43) and CL diameter (D18:P=0.29) were similar among treatments. Also, the percentage of heifers that displayed estrus and pregnancy rate did not differ among treatments (Table 2).

#### *3.2 – Effects of cyclicity on pregnancy rate and CL diameter*

The ovarian function (CL or No CL) at the start of treatment showed significant effect. Heifers with CL at D0 presented larger diameter follicles from the time of implant removal until TAI (D9:P=0.006; D11:P<0.0001), in addition, the diameter of the CL (P<0.0001) and pregnancy rate (P=0.01) was greater (Table 3).

#### *3.3 – Treatments and cyclic status interaction*

There was no interaction between eCG doses (200, 300 and 400IU) and the presence of CL on D0. The estrus occurrence was similar non- cycling or cycling heifers (P= 0.26) as the P/AI (P=0.12; Fig. 2) among treatments. Although be observed there is a cyclic status effect on pregnancy rates between treatment.

#### 4- Discussion

In this study, it was demonstrated that it is possible to reduce the eCG doses from 400 IU to 200IU, at P4 removal time, without a negative impact on ovarian follicular growth, estrous occurrence and pregnancy rate in *B. taurus* beef heifers, subjected to an E2-plus-P4-based TAI protocol. Additionally, an improvement on P/AI was observed in heifers that had CL on D0, showing effect the cyclic status on reproductive management. The reduction dose from 200 IU enable a reduction cost of 12.19%, respectively of total value of the protocol without reduces pregnancy rates at TAI.

Previous studies showed the benefits of eCG administration in synchronization protocols, demonstrated effectiveness to increase follicular development and pregnancy rates in herds exhibiting high prevalence of anestrus cows or presenting a low BCS at the onset of the synchronization program in *B. indicus* (400 / 300IU) and *B. taurus* (400IU) beef cows [3,4,8,18–20]. Furthermore, other studies evaluating reduction eCG doses helping to reduce costs of TAI programs, in *B. indicus* beef cows (300 to 200IU), and cycling heifers (300 and 200IU) or no cycling heifers (200IU)[1,12,21,22]. However few studies report results for eCG in *B. taurus*. Marquezini et al. [16] failed to find any improvement P/AI after administering 200 IU of eCG in *B. taurus* suckled beef cows, in GnRH based protocol. On the other hand, Pessoa *et al.* [11] reported that supplementation with 400 and 300 IU doses were equally efficient to improve to P/AI in *B. taurus* suckled beef cows in p4+E2 based protocol. The variability of pregnancy outcomes in response to eCG may be related to the dose and timing of eCG treatment, BCS, days postpartum of the cows, and eficienting of protocol. The GnRH based protocol produces distinct differences in the ovulation rate reasons for failure to synchroniz, whereas only a small number of anestrus cows ovulate [22,23]. Therefore to *B. taurus* beef heifers, our results demonstrated that reduction doses to 200IU was effective, demonstrating similar results P/AI compared 300 or 400IU. This result indicates that heifers may be less demanding than lactating cows and this may be related to greater steroid metabolism in lactating cows, the rate of cyclicity or follicular development at the onset of the synchronization. The maximal size the ovulatory follicle, and CL is simillar between heifers or lacting cows, however, heifers showing greater maximal concentration of E2 after luteolysis, and peak concentration of circulating P4 than cows [25].

The LF diameter, in at TAI appears to be an indicator of follicle maturity and fertility [26–28]. Management practices that optimize ovulatory follicle size may improve fertility [27]. The eCG administration in the time of removal P4 stimulates cellular proliferation and



increase the cell diameter and steroidogenesis, stimulates growth and maturation of the LF, resulting in the CL morphologically greater and to increased lipogenic activity, angiogenesis and plasticity from the extracellular matrix of the uterine environment [2,3,6,8,9,13,14,29]. In addition, heifers treated with eCG had greater estrus detection and ovulation rates, due to subsequent increase in estradiol concentrations [1,21]. In *B. taurus* eCG-treated cows presented greater follicular growth, larger diameter of the LF at TAI and P/IA [11]. Peres *et al* [1] study in *B. indicus* beef heifer was observed the eCG use improved the results and the minimum dose used (200IU) was sufficient to promote adequate follicular growth and pregnancy rates. In this study, regardless of the dose used the growth rate LF from D9 to D11, CL diameter and pregnancy rate at 30 days were similar among treatments, confirming the effectiveness of the dose of 200 IU. Thus, we can suggest that in *B. taurus* heifers the reduction of the dose of eCG to 200 IU is sufficient to enable follicular growth, maturation, ovulation and functional CL formation.

The cyclicity status before the breeding season influences the results of reproductive performance and is consequence of the interactive effects and nutrition, age, and genetics [30]. The age puberty and conception affect longevity of cows impacting on the profitability and sustainability of the herd. The pregnancy success it depends of the percentage of heifers that reaching puberty before or early in the breeding season [31]. Therefore fertility is strongly related as the conception rate to first service for both dairy and beef heifers. The heifers conceive to give birth first birthing season increased longevity and kilograms weaned throughout life [26,32]. Non-cycling heifers, the lower results in TAI, is usually due to endocrine events occur in characteristic of first ovulation, and short-lived duration of the first ovulatory CL [30]. In this study, non-cycling heifers (without CL on D0), demonstrated lower LF diameter (D9 and D11), smaller CL diameter in D18 and reduced P/AI, when compared to cyclic heifers. This result corroborate with Sá Filho *et al.* [33] reported *B. indicus* heifers with CL on Day 0 also had more P/AI when compared to heifers without CL (49.1% and 30% respectively;  $P = 0.02$ ). So with, cyclic heifers, selected by the reproductive condition score, have better P/AI results [34,35]. Furthermore, in this study, although the estrus rate was similar, in non cycling heifer, the ovulation of smaller follicles produced lower fertility at TAI, showing decrease to pregnancy rates, regardless of treatment, and this was observed more pronounced in low dose of eCG, as 200IU ( $P=0.12$ ). Numerical difference was also observed in *B. taurus* beef cows, about interaction between cyclic status and treatment when noncyclic cows treated with eCG was previously observed despite similar P/AI (300 and 400IU) [11]. In *B. indicus* their results increase when observed non-cycling heifers was eCG

treated [10]. Therefore, especially for non-cycling heifers, positive effect of the eCG can be observed resulting in the follicular growth rates, occurrence of estrus, and on P/AI.

In conclusion, this study demonstrated what the fertility of *B. taurus* beef heifers was not affected by reduction of eCG dose to 200 IU. This reduction is important to increase the applicability of the technique because it reduces the cost of the synchronization protocol. In addition, the status of cyclicity is a determining factor in predicting pregnancy success in an E2-plus-P4-based TAI.

Acknowledgment: CAPES, Zoetis Brasil, Agrop. Pitangueira, Estância Renascer, Santa Camila, Âncora, Posto Branco, Baviera e Fepagro.

**Table. 1** Descriptive analyses according to farm location.

Region of state	Farm	N° of heifers	Mean BCS (1-5)	Cyclicity % (n)	Estrus, % (n) <sup>a</sup>	P/IA, % (n) <sup>b</sup>
Center West	A	76	3.44±0.01	31.58 (24)	76.32 (58)	69.74 (53)
	B	176	2.59±0.01	89.20 (157)	83.52 (147)	58.52 (103)
	C	399	3.06±0.01	84.46 (337)	81.70 (326)	51.63 (206)
South West	D	42	2.97±0.01	59.52 (25)	97.62 (41)	57.14 (24)
	E	46	2.76±0.01	17.39 (8)	86.96 (40)	50.00 (23)
	F	47	2.70±0.01	23.40 (11)	93.62 (44)	53.19 (25)
	G	93	2.47±0.01	10.75 (10)	88.17 (82)	20.43 (19)
	H	201	2.93±0.01	65.67 (132)	92.04 (185)	59.70 (120)
Overall		1080	2.87±0.01	65.19 (704)	85.46 (923)	53.06 (573)

Abbreviations: BCS, body condition score;

a Occurrence of estrus between progesterone insert removal and timed artificial insemination (FTAI).

b Pregnancy per AI (P/AI) 30 days after FTAI.

**Table. 2** Effect of eCG treatments, on the variables ovarian response, occurrence of estrus, pregnancy rates and corpus luteum diameter.

Item	Treatments <sup>a</sup>			P values
	200UI	300UI	400UI	
<i>Estrus and pregnancy responses (all heifers)</i>				
	387	357	336	
BCS (1-5 scale)	2.90±0.02	2.88±0.02	2.91±0.02	
Occurrence of estrus, % <sup>d</sup>	86.56	84.87	84.82	0.92
P/IA, %	52.2	55.46	51.49	0.46
<i>Ovarian dynamic (subset of 214 heifers)</i>				
N° animals	72	75	67	
LF. Diameter D9 <sup>b</sup>	10.37±0.2	10.47±0.2	10.79±0.2	0.66
LF. Diameter D11 <sup>c</sup>	13.41±0.2	13.10±0.3	13.54±0.3	0.79
Growth rate of the LF, mm/day	1.52±0.1	1.4±0.1	1.75±0.1	0.43
CL. Diameter D 18	18.60±0.5	17.92±0.6	18.93±0.5	0.29

Abbreviations: LF, largest follicle diameter; P/IA, pregnancy per artificial insemination; CL corpus luteum; BCS, Body condition score evaluated at the onset of the synchronization protocol

<sup>a</sup> Heifers received a P4 insert and 2 mg of intramuscular estradiol benzoate on the first day of the protocol for synchronization.

<sup>b</sup> D9= The insert was removed 9 days after, and cows were received 0,6 mg of estradiol cypionate and eCG treatment with 200, 300, or 400 IU. To measure the diameter of the largest follicle.

<sup>c</sup> D11= To measure the diameter of the largest follicle, and was realized.

<sup>d</sup> Occurrence of estrus = percentage of heifers that displayed estrus between P4 insert removal and the artificial insemination.

**Table. 3** Effect of cyclicity on ovarian response, occurrence of estrus and pregnancy rates, in heifers independent of eCG treatment used.

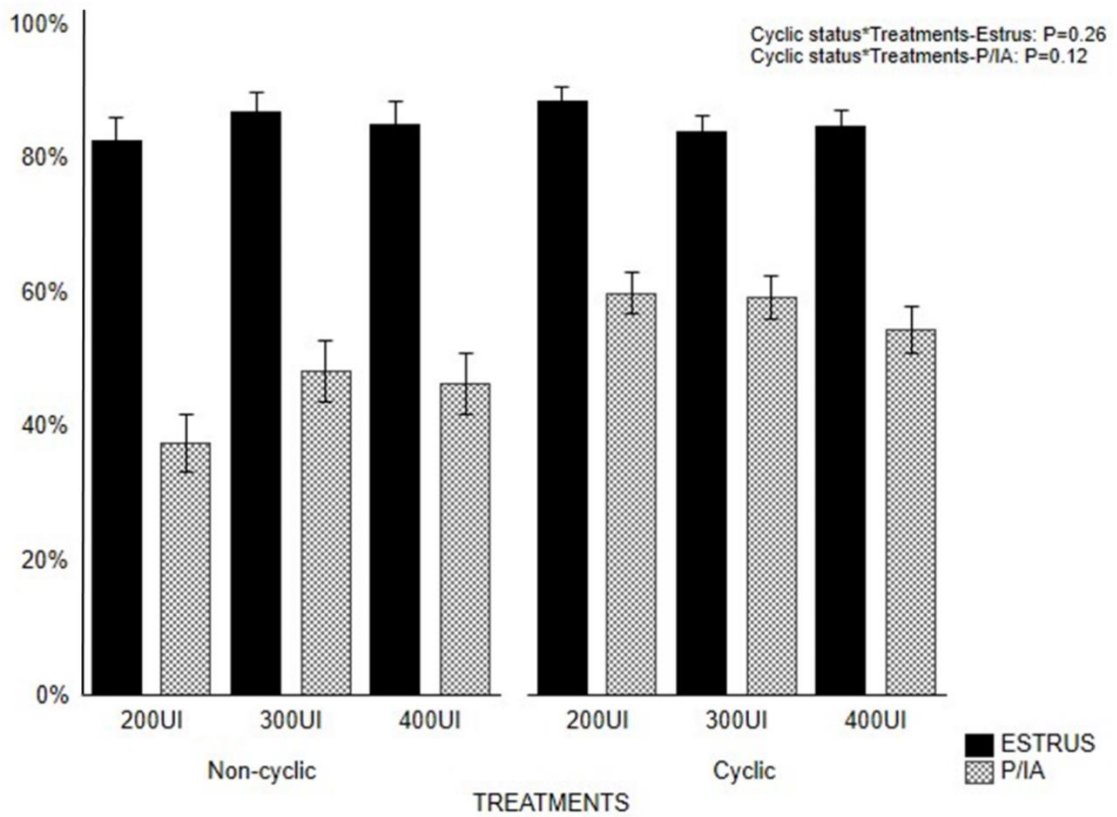
Item	Anestrus cyclic / cycling		P values
	No Cyclicity	Cyclicity	
Nº of animals (heifers 1080)	376	704	
Ovarian Follicle response (heifers 214)			
LF. Diameter D9 <sup>a</sup> , mm	10.1±0.2	10.94±0.1	0.006
LF. Diameter D11 <sup>b</sup> , mm	12.44±0.3	14.06±0.2	<0.0001
Growth rate of the LF, mm/day	1.45±0.1	1.62±0.08	0.23
Estrus and pregnancy (all heifers)			
Occurrence of estrus, % <sup>c</sup>	84.8	85.7	0.47
P/IA, %	44.8	57.7	0.01
CL. Diameter D 18	16.8±0.5	19.64±0.4	<0.0001

Abbreviations: LF largest follicle diameter; P/AI, pregnancy per artificial insemination; CL, corpus luteum.

<sup>a</sup> D9= the insert P4 was removed heifers were received 0,5 mg of estradiol cypionate and eCG treatment with 200, 300, or 400 IU. To measure the diameter of the largest follicle.

<sup>b</sup> D11= to measure the diameter of the largest follicle, and was realized artificial insemination.

<sup>c</sup> Occurrence of estrus= percentage of heifers that displayed estrus between P4 insert removal and the artificial insemination.



**Fig. 2** Occurrence of estrus and pregnancy per artificial insemination (P/AI) in *Bos taurus* beef heifers (heifers; n= 1080). Interaction treatment with different doses of eCG (200, 300, or 400 IU) and the cyclic status (evaluated by ultrasound presence of CL at insertion of P4 insert;  $P > 0.05$ ).

## References

- [1] Peres RF, Claro I, Sá Filho OG, Nogueira GP, Vasconcelos JL. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. *Theriogenology* 2009;72:681–9. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.04.026.
- [2] Sá Filho OG, Meneghetti M, Peres RF, Lamb GC, Vasconcelos JL. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology* 2009;72:210–8. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.02.008.
- [3] 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. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.11.004.
- [4] Sales JN, Crepaldi GA, Girotto RW, Souza AH, Baruselli PS. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. *Anim Reprod Sci* 2011;124:12–8. doi:10.1016/j.anireprosci.2011.02.007.
- [5] Bó GA, Baruselli PS. Synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Animal* 2014;8 Suppl 1:144–50. doi:10.1017/S1751731114000822.
- [6] Rigoglio NN, Fátima LA, Hanassaka JY, Pinto GL, Machado AS, Gimenes LU, et al. Equine chorionic gonadotropin alters luteal cell morphologic features related to progesterone synthesis. *Theriogenology* 2013;79:673–9. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.11.023.
- [7] Murphy BD, Martinuk SD. Equine chorionic gonadotropin. *Endocr Rev* 1991;12:27–44. doi:10.1210/edrv-12-1-27.
- [8] Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bo 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. doi:10.1016/j.anireprosci.2004.04.025.
- [9] Sousa LM, Mendes GP, Campos DB, Baruselli PS, Papa PC. Equine Chorionic Gonadotropin Modulates the Expression of Genes Related to the Structure and Function of the Bovine Corpus Luteum. *PLoS One* 2016;11:e0164089. doi:10.1371/journal.pone.0164089.
- [10] Sá Filho MF, Torres-Júnior JR, Penteadó L, Gimenes LU, Ferreira RM, Ayres H, et al. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Anim Reprod Sci* 2010;118:182–7. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.10.004.
- [11] 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* 2015. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.09.057.
- [12] Dias CC, Wechsler FS, Day ML, Vasconcelos JL. Progesterone concentrations, exogenous equine chorionic gonadotropin, and timing of prostaglandin F(2 $\alpha$ ) treatment affect fertility in postpuberal Nelore heifers. *Theriogenology* 2009;72:378–85. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.03.006.
- [13] Meneghetti M, Sá Filho OG, Peres RF, Lamb GC, Vasconcelos JL. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: basis for development of protocols. *Theriogenology* 2009;72:179–89. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.02.010.
- [14] Dorneles Tortorella R, Ferreira R, Tonello Dos Santos J, de Andrade Neto O, Barreta MH, Oliveira JF, et al. The effect of equine chorionic gonadotropin on follicular size, luteal volume, circulating progesterone concentrations, and pregnancy rates in anestrus beef cows treated with a novel fixed-time artificial insemination protocol. *Theriogenology* 2013;79:1204–9. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.02.019.
- [15] DOROTEU. E. M.; OLIVEIRA. R. A. e PIVATO. I. Evaluation of different eCG doses



- in resynchronization of ovulation in lactating nelore cows subjected to fixed-time insemination. *Rev Bras Reprod Anim* 2015;16:449–57.
- [16] 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. doi:10.2527/jas2012-5382.
- [17] Animal CBDR. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 1998.
- [18] Cutaia L, Tríbulo R, Moreno D, Bó GA. Effect of eCG treatment in postpartum beef cows synchronized with progesterone vaginal devices and estradiol benzoate and inseminated at a fixed-time. *Theriogenology* 2003;59:216.
- [19] Small JA, Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. *Theriogenology* 2009;71:698–706. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.09.045.
- [20] Nett TM, Turzillo AM, Baratta M, Rispoli LA. Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Domest Anim Endocrinol* 2002;23:33–42.
- [21] Rodrigues AD, Peres RF, Lemes AP, Martins T, Pereira MH, Day ML, et al. Progesterone-based strategies to induce ovulation in prepubertal Nelore heifers. *Theriogenology* 2013;79:135–41. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.09.018.
- [22] Butler SAA, Atkinson PC, Boe-Hansen GB, Burns BM, Dawson K, Bo GA, et al. Pregnancy rates after fixed-time artificial insemination of Brahman heifers treated to synchronize ovulation with low-dose intravaginal progesterone releasing devices, with or without eCG. *Theriogenology* 2011;76:1416–23. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.06.010.
- [23] Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF<sub>2</sub>alpha and GnRH. *Theriogenology* 1995;44:915–23.
- [24] Vasconcelos JL, Silcox RW, Rosa GJ, Pursley JR, Wiltbank MC. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows.

- Theriogenology 1999;52:1067–78. doi:10.1016/S0093-691X(99)00195-8.
- [25] Sartori R, Haughian JM, Shaver RD, Rosa GJM, Wiltbank MC. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J Dairy Sci* 2004;87:905–20. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73235-X.
- [26] Cushman RA, Kill LK, Funston RN, Mousel EM, Perry GA. Heifer calving date positively influences calf weaning weights through six parturitions. *J Anim Sci* 2013;91:4486–91. doi:10.2527/jas.2013-6465.
- [27] Perry GA, Smith MF, Roberts AJ, MacNeil MD, Geary TW. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J Anim Sci* 2007;85:684–9. doi:10.2527/jas.2006-519.
- [28] Vasconcelos JL, 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.
- [29] Fatima LA, Baruselli PS, Gimenes LU, Binelli M, Renno FP, Murphy BD, et al. Global gene expression in the bovine corpus luteum is altered after stimulatory and superovulatory treatments. *Reprod Fertil Dev* 2013;25:998–1011. doi:10.1071/rd12155.
- [30] Perry GA. Factors affecting puberty in replacement beef heifers. *Theriogenology* 2016;86:373–8. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.051.
- [31] Short RE, Bellows RA. Relationships among Weight Gains, Age at Puberty and Reproductive Performance in Heifers. *J Anim Sci* 1971;32:127–31. doi:10.2527/jas1971.321127x.
- [32] Wathes DC, Pollott GE, Johnson KF, Richardson H, Cooke JS. Heifer fertility and carry over consequences for life time production in dairy and beef cattle. *Animal* 2014;8 Suppl 1:91–104. doi:10.1017/S1751731114000755.
- [33] Júnior IC, Filho OGS, Peres RFG, Aono FHS, Day ML, Vasconcelos JLM. Reproductive performance of prepubertal *Bos indicus* heifers after progesterone-based treatments. *Theriogenology* 2010;74:903–11. doi:https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.04.015.

- [34] Perry GA. Physiology and Endocrinology Symposium: Harnessing basic knowledge of factors controlling puberty to improve synchronization of estrus and fertility in heifers. *J Anim Sci* 2012;90:1172–82. doi:10.2527/jas.2011-4572.
- [35] Gutierrez K, Kasimanickam R, Tibary A, Gay JM, Kastelic JP, Hall JB, et al. Effect of reproductive tract scoring on reproductive efficiency in beef heifers bred by timed insemination and natural service versus only natural service. *Theriogenology* 2014;81:918–24. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.01.008.

## 5 CONCLUSÃO

-A redução da dose de eCG para 200IU, pode ser utilizada em programas de IATF sem prejudicar a fertilidade das novilhas;

-As diferentes doses (200, 300 e 400 UI) levaram a taxas de ocorrência de estro e concepção semelhante para novilhas de corte *B. taurus* submetidas a programas de IATF.

-As avaliações ultrassonográficas mostraram que a redução da dose de eCG levou a semelhantes taxas de crescimento folicular e de formação do corpo lúteo.

-Novilhas ciclando antes do programa de IATF, apresentaram maior diâmetro de folículo dominante e corpo lúteo, além de superior taxa de concepção após IATF independente da dose de eCG utilizada.

## 6 PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos neste estudo, as perspectivas seguintes são avaliar:

- a taxa de concepção de novilhas *B. taurus* ciclando com e sem a utilização de eCG ;
- a taxa de concepção de novilhas *B. taurus* submetidas a programas de IATF com exposição à progesterona por 8 e 9 dias e diferentes doses de eCG.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, P. et al. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. **J Anim Sci**, v. 78, n. 5, p. 1291–1302, 2000.

AMSTALDEN, M. et al. Reproduction Symposium: hypothalamic neuropeptides and the nutritional programming of puberty in heifers. **J Anim Sci**, v. 92, n. 8, p. 3211–3222, 2014.

ANDERSON, K. J. et al. The use of reproductive tract scoring in beef heifers. **Agri-Practice**, v. 12, n. 4, p. 19–26, 1991.

ANDERSON, L. H.; MCDOWELL, C. M.; DAY, M. L. Progestin-induced puberty and secretion of luteinizing hormone in heifers. **Biol Reprod**, v. 54, n. 5, p. 1025–1031, 1996.

ANIMAL, C. B. D. R. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. [s.l: s.n.].

ATKINS, J. A.; POHLER, K. G.; SMITH, M. F. Physiology and endocrinology of puberty in heifers. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 29, n. 3, p. 479–92, 2013.

AYRES, H. et al. Validation of body condition score as a predictor of subcutaneous fat in Nelore (*Bos indicus*) cows. **Livestock Science**, v. 123, n. 2–3, p. 175–179, 2009.

BARUSELLI, P. S. et al. The use of hormonal treatments to improve reproductive

performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Anim Reprod Sci**, v. 82–83, p. 479–486, 2004.

BASARAB, J. A. et al. Relationships between progeny residual feed intake and dam productivity traits. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 87, n. 4, p. 489–502, 2007.

BO, G. A. et al. Local versus systemic effects of exogenous estradiol-17 beta on ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen implants. **Anim Reprod Sci**, v. 59, n. 3–4, p. 141–157, 2000.

BÓ, G. A. et al. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. **Soc Reprod Fertil Suppl**, v. 64, p. 223–236, 2007.

BÓ, G. A. et al. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 388–396, 2016.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Animal**, v. 8 Suppl 1, p. 144–150, 2014.

BUTLER, S. A. A. et al. Pregnancy rates after fixed-time artificial insemination of Brahman heifers treated to synchronize ovulation with low-dose intravaginal progesterone releasing devices, with or without eCG. **Theriogenology**, v. 76, n. 8, p. 1416–1423, 2011.

BYERLEY, D. J. et al. Pregnancy rates of beef heifers bred either on puberal or third estrus. **J. of Anim Sci**, v. 65, n. 3, p. 645–650, 1987

CARDOSO, R. C. et al. Reciprocal changes in leptin and NPY during nutritional acceleration of puberty in heifers. **J Endocrinol**, v. 223, n. 3, p. 289–298, 2014.

CARVALHO, J. B. et al. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, n. 2, p. 167–175, 2008.

COLE, H. H.; HART, G. H. The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat. **American Journal of Physiology--Legacy Content**, v. 93, n. 1, p. 57–68, 1930.

CROWLEY, J. J. et al. Genetic relationships between feed efficiency in growing males and beef cow performance. **J Anim Sci**, v. 89, n. 11, p. 3372–3381, 2011.

CUSHMAN, R. A. et al. Heifer calving date positively influences calf weaning weights through six parturitions. **J Anim Sci**, v. 91, n. 9, p. 4486–4491, 2013.

CUTAIA, L. et al. Effect of eCG treatment in postpartum beef cows synchronized with progesterone vaginal devices and estradiol benzoate and inseminated at a fixed-time. **Theriogenology**, v. 59, n. 1, p. 216, 2003.

DAY, M. L. et al. Endocrine mechanisms of puberty in heifers: estradiol negative feedback regulation of luteinizing hormone secretion. **Biol Reprod**, v. 31, n. 2, p. 332–341, 1984.

DAY, M. L. et al. Endocrine mechanisms of puberty in heifers. Role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. **Biol**



**Reprod**, v. 37, n. 5, p. 1054–1065, 1987.

DIAS, C. C. et al. Progesterone concentrations, exogenous equine chorionic gonadotropin, and timing of prostaglandin F(2alpha) treatment affect fertility in postpuberal Nelore heifers.

**Theriogenology**, v. 72, n. 3, p. 378–385, 2009.

DORNELES TORTORELLA, R. 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, n. 8, p. 1204–1209, 2013.

DOROTEU. E. M.; OLIVEIRA. R. A. E PIVATO. I. Avaliação de diferentes doses de eCG na ressincronização da ovulação em vacas nelore lactantes submetidas à IATF Evaluation of different eCG doses in resynchronization of ovulation in lactating nelore cows subjected to fixed-time insemination. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 16, n. 2, p. 449–457, 2015.

DUFFY, P. et al. The effect of eCG or estradiol at or after norgestomet removal on follicular dynamics, estrus and ovulation in early post-partum beef cows nursing calves.

**Theriogenology**, v. 61, n. 4, p. 725–734, 2004.

DUITTOZ, A. et al. **The timing of puberty (oocyte quality and management)**. [s.l.: s.n.]. v. 13

E PINTO, J. et al. Treatment with eCG decreases the vascular density and increases the glandular density of the bovine uterus. **Reprod Domest Anim**, v. 49, n. 3, p. 453–462, 2014.

FAJERSSON, P. et al. The effects of dietary protein on age and weight at the onset of puberty in Brown Swiss and Zebu heifers in the tropics. **Theriogenology**, v. 35, n. 4, p. 845–855, 1991.

FATIMA, L. A. et al. Global gene expression in the bovine corpus luteum is altered after stimulatory and superovulatory treatments. **Reprod Fertil Dev**, v. 25, n. 7, p. 998–1011, 2013.

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

GASSER, C. L. et al. Induction of precocious puberty in heifers III: hastened reduction of estradiol negative feedback on secretion of luteinizing hormone. **J Anim Sci**, v. 84, n. 8, p. 2050–2056, 2006.

GIROTTO, R. W. et al. Effect of using PGF<sub>2a</sub> on D0 and different doses of eCG on D8 of TAI protocols with Cronipres® mono dose 1g on conception rate of Nelore cyclic heifers. **Animal Reproduction**, v. 13, n. 3, p. 392, 2016.

GRINGS, E. E. et al. Effect of nutritional management, trace mineral supplementation, and norgestomet implant on attainment of puberty in beef heifers. **J Anim Sci**, v. 76, n. 8, p. 2177–2181, 1998.

GUTIERREZ, K. et al. Effect of reproductive tract scoring on reproductive efficiency in beef heifers bred by timed insemination and natural service versus only natural service. **Theriogenology**, v. 81, n. 7, p. 918–924, 2014.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7<sup>a</sup> ed. Barueri: 2004.

IMWALLE, D. B.; PATTERSON, D. J.; SCHILLO, K. K. Effects of melengestrol acetate on onset of puberty, follicular growth, and patterns of luteinizing hormone secretion in beef heifers. **Biology of reproduction**, v. 58, n. 6, p. 1432–1436, Jun. 1998.

JÚNIOR, I. C. et al. Reproductive performance of prepubertal *Bos indicus* heifers after progesterone-based treatments. **Theriogenology**, v. 74, n. 6, p. 903–911, 2010.

LAMB, G. C. et al. Synchronization of estrus and artificial insemination in replacement beef heifers using gonadotropin-releasing hormone, prostaglandin F<sub>2</sub>alpha, and progesterone. **J Anim Sci**, v. 84, n. 11, p. 3000–3009, 2006.

LAMB, G. C. et al. Control of the estrous cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle: A review1. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. suppl\_13, p. E181–E192, 2010.

LEITMAN, N. R. et al. Comparison of protocols to synchronize estrus and ovulation in estrous-cycling and prepubertal beef heifers. **J Anim Sci**, v. 86, n. 8, p. 1808–1818, 2008.

MARQUES, M. O. et al. Efeitos da administração de eCG e de Benzoato de Estradiol para sincronização da ovulação em vacas zebuínas no período pós-parto. **Simpósio Internacional de Reproducción Animal**, p. 27-29. 2003.

MARQUES, M. O. et al. Efeito do tratamento com PGF<sub>2</sub> $\alpha$  na inserção e/ou tratamento com eCG na remoção do dispositivo intravaginal de progesterona na taxa de concepção à

inseminação artificial em tempo fixo em novilhas nelore. **Acta Sci Vet**, v. 33, 2005.

MARQUEZINI, G. H. L. 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**, v. 91, n. 3, p. 1216–1224, 2013.

MENEGHETTI, M. et al. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: basis for development of protocols. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 179–189, 2009.

MORAN, C.; QUIRKE, J. F.; ROCHE, J. F. Puberty in heifers: A Review. **Animal Reproduction Science**, v. 18, n. 1, p. 167–182, 1989.

MOURA, C. E. et al. Microvascularization of corpus luteum of bovine treated with equine chorionic gonadotropin. **Microsc Res Tech**, v. 78, n. 9, p. 747–753, 2015.

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

NOGUEIRA, G. P. Puberty in South American *Bos indicus* (Zebu) cattle. **Anim Reprod Sci**, v. 82–83, p. 361–372, 2004.

PAPKOFF, H. Variations in the properties of equine chorionic gonadotropin. **Theriogenology**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 1981.

PATTERSON, D. J. et al. Evaluation of reproductive traits in *Bos taurus* and *Bos indicus* crossbred heifers: relationship of age at puberty to length of the postpartum interval to estrus. **J Anim Sci**, v. 70, n. 7, p. 1994–1999, 1992.

PERES, R. F. et al. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v. 72, n. 5, p. 681–689, 2009.

PERRY, G. A. et al. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. **J Anim Sci**, v. 85, n. 3, p. 684–689, 2007.

PERRY, G. A. Physiology and Endocrinology Symposium: Harnessing basic knowledge of factors controlling puberty to improve synchronization of estrus and fertility in heifers. **J Anim Sci**, v. 90, n. 4, p. 1172–1182, 2012.

PERRY, G. A. Factors affecting puberty in replacement beef heifers. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 373–378, 2016.

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**, 2015.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF<sub>2</sub>alpha and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915–923, 1995.

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.

RODRIGUES, A. D. et al. Progesterone-based strategies to induce ovulation in prepubertal Nelore heifers. **Theriogenology**, v. 79, n. 1, p. 135–141, 2013.

RODRIGUES, H. D.; KINDER, J. E.; FITZPATRICK, L. A. Estradiol regulation of luteinizing hormone secretion in heifers of two breed types that reach puberty at different ages. **Biol Reprod**, v. 66, n. 3, p. 603–609, 2002.

ROSENKRANS, K. S.; HARDIN, D. K. Repeatability and accuracy of reproductive tract scoring to determine pubertal status in beef heifers. **Theriogenology**, v. 59, n. 5–6, p. 1087–1092, 2003.

SÁ FILHO, M. F. 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, 2010a.

SÁ FILHO, M. F. et al. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Anim Reprod Sci**, v. 118, n. 2–4, p. 182–187, 2010b.

SÁ FILHO, O. G. et al. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 210–218, 2009.

SALES, J. N. et al. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were

less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. **Anim Reprod Sci**, v. 124, n. 1–2, p. 12–18, 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.

SARTORI, R. et al. Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, v. 67, p. 357–375, 2010.

SARTORI, R. et al. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 32–40, 2016.

SARTORI, R.; BARROS, C. M. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. **Anim Reprod Sci**, v. 124, n. 3–4, p. 244–250, 2011.

SHORT, R. E.; BELLOWS, R. A. Relationships among Weight Gains, Age at Puberty and Reproductive Performance in Heifers. **Journal of Animal Science**, v. 32, n. 1, p. 127–131, 1971.

SMALL, J. A. et al. Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 698–706, 2009.

SOUMANO, K.; LUSSIER, J. G.; PRICE, C. A. Levels of messenger RNA encoding ovarian

receptors for FSH and LH in cattle during superovulation with equine chorionic gonadotrophin versus FSH. **J Endocrinol**, v. 156, n. 2, p. 373–378, 1998.

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.

TAYLOR, C. S.; FITZHUGH H. A., J. Genetic relationships between mature weight and time taken to mature within a breed. **J Anim Sci**, v. 33, n. 4, p. 726–731, 1971.

USDA. Livestock and Poultry: World Markets and Trade. **United States Department of Agriculture-Foreign Agricultural Service**, 2017.

VASCONCELOS, J. L. et al. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v. 56, n. 2, p. 307–314, 2001.

VRISMAN, D. P. et al. Corpus luteum dynamics after ovulation induction with or without previous exposure to progesterone in prepubertal Nellore heifers. **Theriogenology**, v. 106, p. 60–68, 2018.

WATHES, D. C. et al. Heifer fertility and carry over consequences for life time production in dairy and beef cattle. **Animal : an international journal of animal bioscience**, v. 8 Suppl 1, p. 91–104, May 2014.

WEBB, R. et al. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. **J Anim Sci**, v. 82 E-Suppl, p. E63-74, 2004.



WILTBANK, J. N. et al. Effects of Heterosis on Age and Weight at Puberty in Beef Heifers.  
**Journal of Animal Science**, v. 25, n. 3, p. 744–751, 1966.