

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA DE ARAÇATUBA**

**EFEITOS DE DIFERENTES DOSES E VIAS DE  
ADMINISTRAÇÃO DE GnRH SOBRE A  
CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE LH,  
PROGESTERONA, TAXAS DE OVULAÇÃO E PRENHEZ  
EM VACAS HPB**

**Fernando Franco Polizel**

**Médico Veterinário**

**ARAÇATUBA – SP**

**2019**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA DE ARAÇATUBA**

**EFEITOS DE DIFERENTES DOSES E VIAS DE  
ADMINISTRAÇÃO DE GnRH SOBRE A  
CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE LH,  
PROGESTERONA, TAXAS DE OVULAÇÃO E PREENHEZ  
EM VACAS HPB**

**Fernando Franco Polizel**

Orientadora: Profa. Adjunto Tereza Cristina Cardoso da Silva

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – Unesp, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

**ARAÇATUBA – SP**

**2019**

P769e

Polizel, Fernando Franco

Efeitos de diferentes doses e vias de administração de GnRH sobre a concentração sérica de LH, progesterona, taxas de ovulação e prenhez em vacas HPB / Fernando Franco Polizel. -- Araçatuba, 2019

80 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba

Orientadora: Tereza Cristina Cardoso da Silva Coorientador: Alicio Martins Júnior

1. GnRH. 2. Submucosa da Vulva. 3. LH. 4. Ovulação. 5. Bovinos. I.

Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

Título: EFEITOS DE DIFERENTES DOSES E VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DE GnRH  
SOBRE A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE LH, PROGESTERONA, TAXAS DE  
OVULAÇÃO E PREENHEZ EM VACAS HPB

AUTOR: FERNANDO FRANCO POLIZEL  
ORIENTADORA: TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA  
COORIENTADOR: ALICIO MARTINS JUNIOR

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ALICIO MARTINS JUNIOR  
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA  
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. CLÁUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE  
Curso de Zootenia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - Câmpus de Dracena/Unesp

Araçatuba, 15 de janeiro de 2019.

## **DADOS CURRICULARES**

**FERNANDO FRANCO POLIZEL** – nascido em 11 de dezembro de 1989, em Araçatuba – SP. Graduou-se em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), em 13 de dezembro de 2013. Durante a graduação foi bolsista de extensão em dois projetos, financiados pela Pró-Reitoria de Extensão da UNESP. Atua como médico veterinário autônomo, prestando serviços em diversas propriedades rurais na região de Araçatuba. Ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, na área de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) em 01 de agosto de 2016.

**"Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá".**

**AYRTON SENNA DA SILVA**

## DEDICATÓRIA

“Aos meus pais, Milson e Jacqueline, que são minha base forte, minha inspiração e meu alicerce”.

“Ao meu tio, avós, namorada, familiares e amigos, sempre próximos e queridos.”

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que esteve sempre ao meu lado, seja nos momentos bons e ruins, durante todos os dias da minha vida. Por ser o ar que eu respiro todas as manhãs, me dando saúde, força e muita fé para vencer todos os obstáculos.

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária, em nome de todos os professores e funcionários que colaboraram para a minha formação.

À Professora Tereza por estar sempre à disposição em me orientar e apoiar nessa jornada.

Ao Professor Alício, por ser um exemplo como profissional. Por todo apoio e nunca medir esforços para meu aperfeiçoamento como médico veterinário.

A professora Silvia e Yuri, pela paciência e dedicação nas análises estatísticas.

Ao professor Guilherme, pelos conselhos e ajuda nas análises laboratoriais desse trabalho.

Ao meu tio e padrinho Cássio, que como um pai, sempre me apoiou desde criança.

À minha família pelo apoio e amor incondicional, em especial, minha avó materna Jaira, e meus avós paternos Leontino (*in memorian*) e Ezercíria.

Às pessoas que se dedicaram arduamente a este projeto, minhas amigas e companheiras de laboratório Fernanda e Tairini.



Aos meus irmãos de coração, André, João Paulo, Marcos e Vitor, aos quais, desde a graduação na “Rep. Chiqueirão” me ensinaram o verdadeiro valor da amizade.

Às amizades que carrego ao longo da vida e durante a graduação, Carol, Maria Alice e Sabrina.

Ao Thiago, pela amizade, ajuda e parceria durante os anos de mestrado.

Aos animais da “Estância Franco”, que foram peça chave para que esse trabalho fosse realizado. Agradeço com todo o amor e respeito que sempre tive pelos animais.

## SUMÁRIO

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| LISTA DE TABELAS  |               |
| LISTA DE FIGURAS  |               |
| RESUMO  |               |
| ABSTRACT  |               |
| CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....                                | 15            |
| 1 INTRODUÇÃO.....   | 15            |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA.....  | 19            |
| 2.1 FISIOLOGIA DO CICLO ESTRAL DE BOVINOS.....                        | 19            |
| 2.2 DINÂMICA FOLICULAR.....   | 20            |
| 2.3 CONTROLE DA DINÂMICA FOLICULAR E OVULAÇÃO.....                    | 22            |
| 2.3.1 SINCRONIZAÇÃO DE UMA NOVA ONDA DE CRESCIMENTO<br>FOLICULAR..... | 22            |
| 2.3.2 SINCRONIZAÇÃO DA FASE LUTEÍNICA.....                            | 24            |
| 2.3.3 SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO DO FOLÍCULO<br>DOMINANTE.....         | 25            |
| 2.4 HORMÔNIO LIBERADOR DE GONADOTROFINAS.....                         | 26            |
| 2.5 PROSTAGLANDINA.....   | 28            |
| 2.6 PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO.....                                  | 29            |
| REFERÊNCIAS.....  | 31            |
| CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO.....                                   | 51            |
| RESUMO.....   | 52            |
| ABSTRACT.....   | 53            |
| 1 INTRODUÇÃO.....   | 54            |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS.....   | 56            |
| 3 RESULTADOS.....   | 59            |

|   |                  |    |
|---|------------------|----|
| 4 | DISCUSSÃO.....   | 61 |
|   | REFERÊNCIAS..... | 67 |

## LISTA DE TABELAS

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| <b>Tabela 1</b> – Distribuição dos animais de acordo com o grupo de tratamento, categoria animal, idade, número de partos, peso, escore de condição corporal e dias em lactação, expressos como média $\pm$ EPM.....   | 74            |
| <b>Tabela 2</b> – Diâmetro do folículo (mm) e do corpo lúteo (mm) dentro do protocolo “Ovsynch” segundo o grupo de tratamento (média $\pm$ EPM).....   | 77            |
| <b>Tabela 3</b> – Número de animais apresentando ovulação e prenhez, bem como o tempo decorrido até a ovulação e a área sob a curva de LH, conforme o grupo de tratamento e os dias em lactação (média $\pm$ EPM)..... | 78            |
| <b>Tabela Suplementar S1</b> – Concentração sérica (média $\pm$ EPM) de LH (ng/mL), conforme o momento de colheita de sangue dentro do protocolo “Ovsynch”.....  | 79            |
| <b>Tabela Suplementar S2</b> – Concentração sérica (média $\pm$ EPM) de progesterona (ng/mL), conforme o dia de colheita de sangue dentro do protocolo “Ovsynch” e após sete dias da IA.....                           | 80            |

## LISTA DE FIGURAS

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>Figura 1</b> – Diagrama do delineamento Experimental.....  | 73            |
| <b>Figura 2</b> – Concentração sérica de LH (média ± EPM) relativa ao momento de colheita de sangue (M-40 a M120), no qual o M0 correspondeu à aplicação de GnRH-2..... | 75            |
| <b>Figura 3</b> – Concentração sérica de Progesterona (média ± EPM) relativa ao momento de colheita de sangue (D0, D7, D9 e D17).....                                   | 76            |

## **EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE DOSE REDUZIDA DE GNRH NA SUBMUCOSA DA VULVA SOBRE OS NÍVEIS DE LH, PROGESTERONA, DINÂMICA OVARIANA E CONCEPÇÃO EM REBANHO LEITEIRO**

**RESUMO** - O objetivo do presente trabalho foi verificar os efeitos da administração de meia dose de GnRH na submucosa da vulva sobre os níveis de LH, progesterona, dinâmica folicular ovariana e taxa de concepção em rebanho leiteiro, utilizando o protocolo “Ovsynch”, modificado. As vacas ( $n = 13$ ) e novilhas ( $n = 11$ ) foram pré-sincronizadas com duas injeções de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , com intervalo de 14 dias e 12 dias. Após a última prostaglandina, foi iniciado o protocolo “Ovsynch”, modificado pela inclusão de duas injeções de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . No momento da aplicação da segunda dose de GnRH (GnRH-2) os animais foram distribuídos de maneira homogênea para os grupos: controle (CN;  $n = 8$ ), animais recebendo 2,5 mL de cloreto de sódio 0,9% por via im, intramuscular (IM;  $n = 8$ ), injetado 10,5  $\mu\text{g}$  de GnRH por via intramuscular e submucosa da vulva (SV;  $n = 8$ ), recebendo 5,25  $\mu\text{g}$  de GnRH. As amostras de sangue foram colhidas no D0, D7, D9 e D17 para determinação da concentração sérica de progesterona, e para o LH, foram colhidas em cinco momentos no D9 (M-40, M0, M40, M80 e M120 min). Quanto ao LH, não houve diferença significativa entre os grupos IM e SV em todos os momentos, os quais foram significativamente maiores do que o CN, enquanto no SV, maiores valores de média foram obtidos para a área sob a curva de LH (ASC-LH) em comparação com os grupos IM e CN. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto à concentração de progesterona, independente do dia avaliado. Todos os grupos apresentaram o mesmo número de ovulação (6/8), porém, com menor média de tempo para IM e VS em comparação ao grupo controle. A taxa de concepção superior no grupo IM seguida por CN e VS. Concluindo, a administração de meia dose de GnRH na submucosa da vulva pode ser uma alternativa eficiente para a sincronização da ovulação em rebanho de leite.

**Palavras-chave:** Buserelina; Meia dose; Hormônio Luteinizante; Ovulação; "Ovsynch"

**EFFECTS OF LOW DOSE OF GnRH ADMINISTERED IN THE VULVA  
SUBMUCOSA ON LH AND PROGESTERONE LEVELS, OVARIAN DYNAMIC  
AND CONCEPTION RATE IN DAIRY CATTLE**

**ABSTRACT** - The aim of this study was to verify the effects of low dose of GnRH administered in the vulva submucosa on LH and progesterone levels, ovarian dynamics and conception rate in dairy cattle using a modified Ovsynch protocol. Cows ( $n = 13$ ) and heifers ( $n = 11$ ) were pre-synchronized with two injections of PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  administered with a 14-days interval. Twelve days after the last prostaglandin dose a modified Ovsynch protocol was initiated and at the time of the second dose of GnRH (GnRH-2) the animals were homogeneously distributed to groups: control (CN;  $n = 8$ ), receiving 2.5 mL of 0.9% sodium chloride, im, intramuscular (IM;  $n = 8$ ), receiving 10.5  $\mu$ g of GnRH intramuscular; and vulva submucosa (VS;  $n = 8$ ) with administration of 5.25  $\mu$ g of GnRH. Blood samples were collected to determine serum progesterone concentration on D0, D7, D9 and D17, and the level of LH at five moments on D9 (M-40, M0, M40, M80 and M120 min). Higher levels of LH were observed in IM and VS groups in comparison with CN, however no significant difference was found between IM and VS for any time of evaluation. The higher mean value for the area under LH curve (AUC-LH) was found in VS than for IM and CN. There was no difference among groups for progesterone levels measured on in the different days of the protocol. The number of ovulated animals was similar among groups, but the time elapsed to ovulation was lower in IM and VS than in control group. The conception rate was higher in IM group, followed by CN and then VS. In conclusion, half dose of buserelin acetate in the vulva submucosa can be an effective alternative for ovulation synchronization in dairy cattle.

**Keywords:** Buserelin; Half dose; Luteinizing Hormone; Ovulation; Ovsynch



## **CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

### **1 INTRODUÇÃO**

O leite é o produto mais importante do setor lácteo e sua produção tem aumentado durante as últimas décadas, especialmente nos países em desenvolvimento (GEROSA & SKOET, 2012). O esperado é que o consumo dobre até 2050, em comparação com 2000 (ALEXANDRATOS & BRUINSMA, 2012), possivelmente devido ao crescimento populacional, bem como à consciência de que o leite é considerado como essencial para uma boa saúde, por ser um alimento rico em nutrientes (MENESES et al., 2012).

O Brasil é responsável por 5,3%, aproximadamente 493 milhões de toneladas de leite produzidas no mundo (USDA, 2015), além de possuir o segundo maior rebanho bovino, com 219 milhões de cabeças (USDA, 2016). Segundo o IBGE (2014), desse total, 10,9% correspondem a vacas em lactação. Apesar dos números, a média nacional de produção de leite por vaca ao ano é de 1.526 litros, sinalizando que os sistemas de produção são pouco especializados (ZOCCAL, 2015).

Apesar do progresso genético, melhorias na nutrição e práticas de gestão terem aumentado a produção de leite, durante as últimas décadas, a fertilidade de vacas leiteiras não acompanhou tal crescimento (LÓPEZ-GATIUS et al., 2004). Pelo contrário, a perda da eficiência reprodutiva é mais acentuada em rebanhos leiteiros de alta produção (LUCY, 2001). A reprodução é um dos principais componentes de um sistema de produção rentável. O estresse fisiológico e ambiental proporcionado pelas altas temperaturas em sistemas de produção prejudica a ingestão adequada de nutrientes, resultando em baixa condição corporal, queda na produção de leite e baixo desempenho reprodutivo (BUTLER, 2000).

A queda nos índices reprodutivos em vacas leiteiras é um problema mundial, e o aumento da produção leiteira é o fator mais associado à sua

queda, pois ambas possuem correlação genética negativa (LUCY, 2001). Outros estudos indicam que doenças tais como: cetose, mastite, retenção de placenta, metrite, pneumonia, cisto ovariano e doenças podais têm grande efeito sobre a fertilidade, porém, afetam uma percentagem menor de animais, quando comparadas ao nível de produção de leite ou à perda de condição corporal (LUCY, 2001; DOBSON et al., 2007; SANTOS et al., 2010).

Além dos fatores já mencionados, a fertilidade em vacas leiteiras está relacionada a aspectos biológicos de grande importância e complexidade, ligados à fisiologia, manejo, ambiência e estresse térmico (LUCY, 2001; DOBSON et al., 2007; SANTOS et al., 2010). Com relação à fisiologia reprodutiva, a ocorrência de anestro e baixas concentrações de estrógeno ( $E_2$ ) e progesterona ( $P_4$ ), aumento da taxa de ovulação múltipla e perdas embrionárias são eventos que interferem diretamente nos índices reprodutivos.

A observação e detecção de cios também estão relacionadas com a queda na eficiência reprodutiva, pois o cio tornou-se mais difícil de detectar, uma vez que tem sido de menor duração e menor número de montas, devido à diminuição da produção de estrógeno, redução da liberação de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e conseqüentemente a redução do pico de hormônio luteinizante (LH) (LUCY, 2001; DOBSON et al., 2007; SANTOS et al., 2010).

A diminuição no consumo de matéria seca e produção de leite por vaca tem acarretado uma queda surpreendente na fertilidade de rebanhos leiteiros comerciais (CUTULLIC et al., 2012; KAWASHIMA et al., 2012). Há uma relação negativa entre a concentração de  $P_4$  circulante e a ingestão de matéria seca em vacas leiteiras (RABIEE et al., 2001, 2002), aumentando o metabolismo hepático da  $P_4$  devido à elevação do fluxo de sangue para o fígado (WILTBANK et al., 2011). Moreira et al. (2001) observaram que 23% das vacas de alta produção leiteira possuíam concentrações de  $P_4 < 1,0$  ng/ml (animais em anestro) por volta de 60 dias após o parto.

A utilização da  $P_4$  é chave na fertilidade do rebanho leiteiro, no qual o objetivo é a utilização da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), precedida

de protocolos hormonais de indução e sincronização da ovulação (WILTBANK et al., 2011). No entanto, em rebanhos leiteiros com manejo intensivo e alta produção leiteira, observa-se também uma associação negativa entre a alta produção de leite e a manifestação comportamental do cio (CROWE & WILLIAMS 2012; CUTULLIC et al., 2009, 2012).

Os programas de sincronização têm como objetivo facilitar o manejo reprodutivo em propriedades de gado leiteiro, eliminando a necessidade de detecção do estro (DEJARNETTE et al., 2001). Uma estratégia para incrementar o desempenho reprodutivo é assegurar uma alta taxa de inseminação através da utilização de protocolos de sincronização, e para alcançar melhor resultado ao sincronizar a ovulação, é necessária a obtenção de um folículo dominante ao final do protocolo.

Vários programas de sincronização têm sido desenvolvidos nos últimos anos com o objetivo de tornar a IATF mais difundida. Um dos mais conhecidos programas, o “Ovsynch” (PURSLEY et al., 1997a, b), tem sido indicado para a inseminação de vacas *bos taurus* em tempo fixo para o primeiro serviço.

A administração de GnRH e seus análogos é normalmente realizada pela via intramuscular, porém, devido ao seu peso molecular baixo, o hormônio pode ser absorvido pela via subcutânea, ou através de membranas mucosas (RAEHS et al., 1988; DONNEZ et al., 1989). Após a aplicação de GnRH via intramuscular, o LH é liberado pela adenohipófise e alcança o pico de concentração na corrente sanguínea em duas horas, seguido pela ovulação de um folículo dominante decorridas em média 30 horas (CHENAULT et al., 1990; PURSLEY et al., 1995).

Vias alternativas para administração GnRH foram testadas em bovinos e outras espécies. São necessárias doses mais altas de GnRH, quando administrado por via subcutânea, ao invés da via intravenosa, para se obter efeitos similares, e sua administração ou dose incorreta resulta em liberação tardia de LH (CONN et al., 1986). Além disso, a intensidade da liberação de LH é afetada pela dose administrada e potência do análogo de GnRH utilizado

(CHENAULT et al., 1990; SOUZA et al., 2009; DIAS et al., 2010; GIORDANO et al., 2012a).

A via nasal em humanos necessitou do aumento da dose de buserelina (CHRISP & GOA, 1990), já o leuprolide pela via vaginal, em roedores, só foi eficiente com a adição de ácidos orgânicos (OKADA et al., 1982) ou ácido cítrico (OKADA et al., 1983), e a estilação de diferentes análogos de GnRH pela via vaginal em bovinos, só obteve sucesso ao ser comparada a via usual quando a dose de gonadorelina foi de 1.000 µg e de buserelina 80 µg e ambas com adição de 10% de ácido cítrico (WIJMA et al., 2017). Outra via alternativa testada em bovinos foi a intrauterina, obtendo níveis de LH menores quando comparada a via intramuscular (BAS et al., 2012, 2014).

Em bovinos a maioria dos trabalhos foi realizada para comparar diferentes doses e análogos, porém, a via submucosa da vulva não foi testada para administração de GnRH em bovinos, sendo necessários estudos para testar essa via de aplicação.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Fisiologia do ciclo estral em bovinos

O ciclo estral compreende o intervalo entre dois estros, com período de duração em média de 21 dias, variando de 17 a 24 dias, sendo interrompido por prenhez, doença reprodutiva ou metabólica (BALL & PETERS, 2007). A vida reprodutiva em bovinos inicia-se entre 12 e 14 meses, com variações diferentes da raça, metabolismo e características individuais (BALL & PETERS, 2007). O desenvolvimento das gônadas acontece na puberdade e, assim como em outros mamíferos, os ruminantes iniciam sua vida reprodutiva a partir do momento da liberação de GnRH, provocando o crescimento de um ou mais folículos dominantes, na dependência do número de ondas foliculares, sendo *bos taurus* apresentando duas a três e *bos indicus* duas a quatro ondas (CUNNINGHAM, 2004; SIROIES & FORTUNE, 1998; ALVES et al., 2002).

A divisão do ciclo estral é caracterizada por fases, evidenciadas por modificações internas e externas, bem como comportamental. As vacas são classificadas como poliéstricas anuais, as fases do ciclo divididas em proestro, estro, metaestro e diestro (REECE, 1996). O proestro dura em média 5 a 7 dias e compreende a fase em que ocorre a regressão do corpo lúteo e recrutamento folicular para uma nova ovulação (REECE, 1996).

No estro, a vulva da fêmea torna-se edemaciada e dilatada, além do relaxamento da cérvix. As glândulas uterinas, cervicais e vaginais secretam muco de consistência viscosa, e há aceitação das fêmeas pelo macho. O tempo de duração médio do estro é de 18 horas. O estro em bovinos é caracterizado por alterações físicas e comportamentais, segundo FERREIRA, (2010), poderá haver: aumento da vocalização, agitação, anorexia, vulva brilhante e edemaciada, secreção vaginal, hábito de receber e realizar monta em outras vacas e touros e estar receptiva a cópula.

Durante o metaestro, as células epiteliais que revestem o folículo rompido do ovário sofrem rápida hiperplasia e hipertrofia, tornando-se

luteinizadas, dando origem ao corpo lúteo (CL). O diestro é o intervalo entre os estros, com a presença do corpo lúteo e com duração entre 10 e 13 dias. Durante o estro, são encontradas outras alterações como atividade das glândulas uterinas, relaxamento da musculatura do útero, cérvix fechada e vagina com lábios enrugados (ARTHUR, 1979).

Para que a ciclicidade seja constante é necessária à regulação da liberação de vários hormônios, os quais provocam produção nas gônadas, que agem através de mecanismos de retroalimentação (FERREIRA, 2010). O eixo hipotálamo-hipófise gonadal é o responsável por integrar o sistema nervoso central e endócrino, além de regular funções metabólicas, como, equilíbrio hídrico, crescimento, lactação e reprodução (GONZÁLEZ, 2002).

O GnRH é o hormônio responsável por regular a reprodução, produzido e secretado através de dois locais distintos, localizados no hipotálamo, os centros controladores de secreção tônica, que são responsáveis pela secreção desse hormônio em pequenas quantidades, e aquele controlador da onda pré-ovulatória, que libera quantidades grandes desse hormônio em vários picos (HAFEZ & HAFEZ, 2004). Seguido da secreção, o GnRH é liberado pelo sistema porta-hipotalâmico-hipofisário, alcançando a adenohipófise e, assim, estimulando a produção e liberação das gonadotrofinas: Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH) (RATHBONE et al., 2001).

## **2.2 Dinâmica folicular**

A dinâmica folicular compreende o desenvolvimento e a regressão de folículos antrais por meio de ondas que levam a formação de um folículo pré-ovulatório. Esse processo ocorre no ciclo estral (SENGER, 2003) e, também, durante a gestação, pós-parto e em novilhas pré-púberes (BÓ et al., 2000).

Os padrões de crescimento das ondas foliculares variam de acordo com a raça, subespécie, idade e peso a puberdade. As fêmeas *Bos indicus* possuem

comumente um padrão de três a quatro ondas de crescimento folicular, enquanto os animais *Bos taurus* variam entre duas a três ondas (VIANA et al., 2000; WOLFENSON et al., 2004).

Ao ser estimulado pelo FSH e LH, o ovário produz ondas de desenvolvimento folicular. Essa onda é caracterizada por três estágios, sendo divididos em: recrutamento, seleção e dominância. A fase de recrutamento marca o início da onda folicular após um estímulo gonadotrófico, com duração média de dois a três dias, representada pelo crescimento de um grupo de folículos altamente sensíveis ao FSH (ARIAS et al., 2006). Nessa etapa, os folículos medem em torno de 4 mm de diâmetro e, dependem muito do FSH para que haja crescimento do diâmetro folicular e aumento da capacidade esteroidogênica (GINTHER et al., 2002).

Posteriormente à fase de recrutamento, ocorre a seleção, responsável pelo desenvolvimento do folículo dominante e atresia dos folículos subordinados, controlados pelo FSH e LH (DRIANCOURT, 2001). A concentração séria de FSH começa a declinar devido a produção de inibina. O outro inibidor do FSH é o estradiol, produzido pelo folículo dominante, coadjuvante no processo de atresia dos folículos subordinados. A queda de FSH é primordial para a fase de seleção, pois o folículo dominante não necessita de altas concentrações do mesmo para se desenvolver (GINTHER, et al., 2002).

À medida que ocorre o crescimento do folículo dominante, há maior produção de estradiol, que é responsável pela liberação de GnRH, consequentemente determinando o pico de LH e a ovulação. A ovulação predominantemente na ausência da progesterona, produzida pelo CL (SENGER, 2003). Isso explica porque durante a fase luteal há atresia do folículo dominante, e quando precede a luteólise do folículo dominante torna-se capaz de ovular. Após ovular, as células foliculares sofrem a ação do LH, responsável por luteinizar as células foliculares remanescentes do folículo ovulatório e dão forma ao corpo lúteo. O CL por sua vez, produz  $P_4$  que prepara e mantém o útero para a prenhez. A  $P_4$  causa efeito inibitório sob a

liberação da onda de GnRH, isso a torna essencial na inibição no equilíbrio do ciclo. Quando há interrupção da onda de GnRH, conseqüentemente não ocorre liberação do pico de LH e a ovulação. Mesmo assim é contínua a liberação de GnRH e FSH em níveis basais, permitindo que haja desenvolvimento dos folículos (BÓ et al., 2000).

### **2.3 Controle da dinâmica folicular e ovulação**

Os primeiros protocolos reprodutivos surgiram visando a manipulação do ciclo estral de bovinos concentrou-se no cio como base para determinar o momento da inseminação. Os progestágenos sintéticos foram inicialmente utilizados com objetivo de prolongar o período do diestro, de modo que a supressão do tratamento resultava em sincronização do comportamento estral (MACMILLAN, 2010).

Segundo Barros e Ereno (2004), o estudo sobre a fisiologia e o conhecimento sobre o ciclo estral, principalmente na última década, permitiu a elaboração de protocolos hormonais voltados para a regulação do desenvolvimento folicular e momento da ovulação. Os protocolos de IATF surgiram como ferramentas para aumentar o ganho genético e a eficiência reprodutiva dos rebanhos bovinos. Tais protocolos visam o estabelecimento de uma nova onda de crescimento folicular, controle da fase progesterônica e indução da ovulação.

#### **2.3.1 Sincronização de uma nova onda de crescimento folicular**

A sincronização da emergência da onda de crescimento folicular tem por objetivo fazer com que todos os animais. Atualmente, existem dois protocolos hormonais base mais utilizados para alcançar esse objetivo, um deles faz uso da administração de GnRH, induzindo a ovulação ou luteinização do folículo dominante (PURSLEY et al., 1995) e induzindo a atresia folicular por meio da utilização de estrógeno e P<sub>4</sub> (BÓ et al., 1994).



O benzoato de estradiol (BE), cipionato de estradiol (CE) e o 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>-17 $\beta$ ) têm sido utilizados em substituição ao GnRH ao induzir a ovulação em protocolos de IATF. Os estrógenos são muito utilizados em países latinos, como Brasil e Argentina, porém, pouco utilizados em outros países, devido a restrições legais (MOENTER et al., 1990). Souza et al., (2005) compararam as concentrações circulantes dos três tipos de estradiol e observaram que o E<sub>2</sub>-17 $\beta$  obteve maior pico e menor meia vida, seguido por BE e CE ao utilizar a mesma dose de 1 mg.

O estímulo por parte do GnRH, leva a emergência de uma nova onda folicular através da indução da ovulação do folículo dominante ou em promover a atresia de folículos menores, resultando em uma padronização do tamanho folicular (tamanhos intermediário). Para que a ovulação ocorra, é necessária a presença de um folículo com essa capacidade, ou seja, com mais de 9 mm. Junto com essa padronização, os animais que tem uma interrupção do crescimento da onda, passam por um novo recrutamento (MACMILLAN & THATCHER, 1991). Essa emergência folicular acontece dois dias depois, nas vacas que forem responsivas a administração do fármaco (BÓ et al., 2002).

Segundo Vasconcelos (1999) o GnRH é responsável por uma alta porcentagem de ovulação em vacas de leite, porém, há a probabilidade da ovulação ser mais baixa em vacas em anestro, quando comparada com vacas que estão ciclando (FERNANDES et al., 2001; VASCONCELOS et al., 2009a). A forma pela qual a primeira administração de GnRH tem em induzir a ovulação depende do momento da onda de desenvolvimento folicular e fase do ciclo estral em que o animal se encontra (GEARY et al., 2000).

### **2.3.2 Controle da fase luteínica**

A segunda etapa dos protocolos de sincronização de estro consiste na manipulação da fase luteínica, implicando na diminuição da concentração de P<sub>4</sub> para que se inicie o proestro e desenvolvimento do folículo ovulatório. A PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  ou seus análogos (Cloprostenol e Dinoprost trometamina) são agentes

luteolíticos empregados para sincronização da luteólise em bovinos (ODDE, 1990). Todavia, o emprego da  $PGF_{2\alpha}$  é limitado, pois depende da presença de um CL funcional, para ocorrência da regressão morfológica e funcional dessa estrutura. Além disso, a resposta a sua administração também é influenciada pela maturidade do corpo lúteo, portanto, tratamentos realizados no começo ou final do ciclo estral não são totalmente efetivos na indução da luteólise (WILTBANK, 2000).

Os pesquisadores Pharriss & Wyngarden (1969) relataram a  $PGF_{2\alpha}$  como um agente possivelmente envolvido com a regressão do CL, após o entendimento de seus efeitos de vasoconstrição e presença no tecido uterino.

Deste modo, a  $PGF_{2\alpha}$  firmou-se como o tratamento mais empregado na sincronização de bovinos, sendo rotineiramente utilizada nas fazendas, mesmo nas vacas em anestro, pois na maioria das vezes, os animais não são avaliados no início do protocolo (HENRICKS et al., 1974). Segundo Odde (1990) a  $PGF_{2\alpha}$  tem ação sobre o CL a partir do quinto dia do ciclo estral, sendo mais efetiva no 12º dia e alcançando a fase de platô até o 17º.

Há um debate em torno da padronização da dose de  $PGF_{2\alpha}$  necessária para causar uma luteólise completa do CL formado pela sincronização do desenvolvimento folicular (WHITTIER et al., 2010; CUERVO-ARANGO et al. 2011), sendo o CL de vacas, refratário a uma única dose de  $PGF_{2\alpha}$  (25 mg de Dinoprost) até o sexto dia do ciclo estral (fase inicial) (ROWSON et al., 1972; HENRICKS et al., 1974; BEAL et al., 1980).

Ao sincronizar a onda folicular com GnRH, obtém-se um CL de 5,5 dias em protocolos com 7 dias de intervalo entre a primeira aplicação de GnRH e a luteólise, como é o caso do protocolo "Ovsynch". Nos protocolos que possuem cinco dias de intervalo, a luteólise ocorre de três a cinco dias (PURSLEY et al., 1995; WHITTIER et al., 2010; CUERVO-ARANGO et al., 2011; VALLDECABRES-TORRES et al., 2012). No caso de apenas uma dose de  $PGF_{2\alpha}$  (25 mg de Dinoprost), há consenso de que não é efetiva em protocolos com cinco dias de intervalo (WHITTIER et al., 2010; CUERVO-ARANGO et al., 2011; VALLDECABRES-TORRES et al., 2012), porém, quando

os protocolos são de 7 dias, há discordância entre os autores em relação a porcentagem de vacas que não sofreram luteólise completa, variando de 5 a 40% (MOREIRA et al., 2000; GUMEN et al., 2003; BRUSVEEN et al., 2009; CUERVO-ARANGO et al., 2011).

Os programas de IATF buscam sempre manusear os animais o mínimo possível, isso implica na diminuição do estresse e na diminuição dos custos. Por esses motivos, a segunda dose de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  vem sendo discutida pelos pesquisadores. Quando se administra uma única dose de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  para o controle do ciclo estral em vacas, existe maior probabilidade de luteólise a partir do dia 6 do ciclo, pois no início da fase luteal, anterior a esse período, existem controvérsias das condições necessárias para que ocorra a luteólise completa. Um dos questionamentos é referente a dose. Assim, Cuervo-arango et al. (2011), estudaram os efeitos de 50 mg de Dinoprost aplicados  $102 \pm 6$  horas após a ovulação em 4 novilhas HPB e encontraram taxa de luteólise de 50%. Valldecabres-torres et al. (2012) testaram a dose normal de 150  $\mu\text{g}$  e dose dobrada de 300  $\mu\text{g}$  de D-cloprostenol em 4 momentos (96, 108, 124 e 130 horas após a ovulação). Esses pesquisadores encontraram correlação positiva entre o aumento da dose de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e a porcentagem de animais apresentando regressão luteal. Com 60% e 80% de regressão no dia 6,5 utilizando dose de 150 e 300  $\mu\text{g}$ , respectivamente.

### **2.3.3 Sincronização da ovulação do folículo dominante**

Os programas de IATF buscam aumentar a taxa de fertilidade através da sincronização da ovulação (PURSLEY et al., 1995; CIPRIANO et al., 2011). Várias pesquisas comprovam que a inseminação artificial deve ocorrer de acordo com a previsão da ovulação (AYRES et al., 2008), justificando o uso dos indutores de ovulação para sincronizar esse evento.

A indução pode ser feita com GnRH e estrógeno (DRIANCOURT, 2001), na qual ambos os hormônios são responsáveis por estimular a secreção e

liberação do LH, podendo ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação: os estrógenos agem através da estimulação do GnRH a nível hipotalâmico, para então induzir o pico de LH, levando mais tempo para que isso ocorra. Sendo assim, sua administração deve ser antecipada em um ou dois dias. O GnRH, estimula diretamente o pico de LH, podendo ser administrado dois dias após o término da fase progesterônica (FERREIRA, 2010).

O uso de estrógenos é alternativo para induzir a ovulação como, por exemplo, os ésteres de estradiol utilizados no Brasil, tais como: E<sub>2</sub>-17β, BE e o CE (SOUZA et al., 2005). O BE possui alta solubilidade, isso faz com que ele antecipe o pico de LH, com um aumento da amplitude e diminuição da frequência (SALES et al., 2012). Por outro lado, o CE induz um pico de LH mais tardio, com menor amplitude e maior frequência. A diferença no mecanismo de ação desses dois ésteres de estradiol decorre do fato de o CE que é menos solúvel em água do que o BE, resultando em uma ação mais prolongada (VYNCKIER et al., 1990). É necessário salientar essas diferenças, pois em um protocolo de IATF é importante definir o momento ideal para a administração, visando a ovulação.

## **2.4 Hormônio Liberador de Gonadotrofinas**

O GnRH possui papel central no ciclo reprodutivo, isso faz com que ele seja utilizado em protocolos de sincronização em bovinos de leite e corte (PETERS, 2005; HERBERT & TRIGG, 2005) e, quando combinado com PGF<sub>2α</sub>, é responsável pela sincronização do estro e da ovulação, coordenando o desenvolvimento folicular, luteólise e ovulação (PETERS, 2005; PURSLEY et al., 1995). No protocolo “Ovsynch” (PURSLEY et al., 1995) o GnRH é aplicado 48 horas após a prostaglandina, com as ovulações ocorrendo em média 32 horas após sua administração.

O GnRH natural (gonadorelina) e seus análogos comerciais (buserelina e lecirelina, entre outros) são amplamente utilizados na terapia de cistos ovarianos em bovinos ou na indução da ovulação no momento da inseminação (THATCHER et al., 1993; PETERS, 2005). Alguns dos análogos comerciais de GnRH disponíveis no mercado são agonistas aprovados e comercializados para o uso, em bovinos na Europa e América do Norte, como o decapeptídeo (diacetato de gonadorelina ou tetra-diacetato) e dois nonapeptídeos (acetato de lecirelina e buserelina). A lecirelina difere pela substituição da leucina D-terciário pela glicina na posição 6 e pela substituição de glicina por etilamida na posição 10, enquanto a buserelina tem uma D-serina na posição 6 e etilamida na posição 10 (PETERS, 2005).

Apesar das inúmeras informações sobre o GnRH, obtidas ao longo dos anos, existe uma variabilidade na resposta reprodutiva, dependendo do ambiente endócrino após a administração de GnRH e seus análogos, as quais poderiam, em parte, ser atribuídas aos efeitos que o hormônio causa em tecidos reprodutivos (D'OCCHIO & ASPDEN, 1999).

As primeiras pesquisas sobre as vias da administração dos agonistas de GnRH utilizaram as vias usuais como a intravenosa, subcutânea e intramuscular. Outros estudos, envolvendo a via oral como alternativa, obteve apenas 0,1% de biodisponibilidade do fármaco, devido à sua degradação pela peptidase gastrointestinal (CHRISP & GOA, 1990). A via intranasal mostrou uma variação de 4-21% de biodisponibilidade (CHRISP & GOA, 1990), necessitando de doses maiores de buserelina. A via vaginal foi outra alternativa investigada em ratas, e resultou em uma biodisponibilidade de 20% após combinação de leuprolide com ácidos orgânicos (OKADA et al., 1982) e quando adicionou 5% de ácido cítrico, aumentou a absorção vaginal de leuprolide (OKADA et al., 1983). Pesquisadores testaram a via intravaginal em bovinos, com diferentes doses, análogos e adição de ácido cítrico (WIJMA et al., 2017). As concentrações de LH foram semelhantes aquelas obtidas por meio da administração via usual apenas quando a dose de gonadorelina foi de 1.000 µg e a de buserelina 80 µg, ambas com adição de ácido cítrico (WIJMA

et al., 2017). A via intrauterina foi testada por Bas et al., (2012 e 2014) objetivando verificar a absorção de gonadorelina; observaram que os níveis de LH foram menores nos grupos de tratamento quando comparados a via intramuscular, porém, com média de tempo de ovulação de 60 horas (BAS et al., 2012), e 48 horas, com ácido cítrico (BAS et al., 2014).

## 2.5 Prostaglandina

As prostaglandinas são moléculas que derivam do ácido araquidônico e linoleico. Sendo que a  $PGF_{2\alpha}$  é essencial na reprodução dos mamíferos domésticos, pois atua no desenvolvimento folicular, ovulação, regressão luteal, implantação, manutenção gestacional e fisiologia puerperal (WEEMS et al., 2006). Seus análogos sintéticos são utilizados na sincronização farmacológica do ciclo estral de fêmeas bovinas (ODDE, 1990), devido a sua ação luteolítica, que promove vasoconstrição e em seguida uma cascata apoptótica.

Sua ação luteolítica foi descoberta na década de 70, e influenciou, coincidentemente, no aumento dos índices de fertilidade dos rebanhos. Ao se empregar a prostaglandina, algumas limitações devem ser consideradas (WILTBANK, 1975), como a não resposta do CL inicial ao tratamento, sendo suplantada com a repetição da dose de  $PGF_{2\alpha}$  em um intervalo de 10 a 14 dias, com o aparecimento do CL responsivo. Outro fator é a não indução de estro em vacas que não estão ciclando e, por último, a variabilidade no aparecimento de estro, devido às diferenças, entre as fêmeas, no crescimento dos folículos, diferente do período de regressão luteal (WILTBANK, 1975)

Além da função luteolítica, a  $PGF_{2\alpha}$  também tem sido associada a ovulação em vacas e novilhas (BRIDGES & FORTUNE, 2007; PEIFER et al., 2009), através de um mecanismo diferente da luteólise (PFEIFER et al., 2009). Esse mecanismo, ainda não foi totalmente esclarecido, com inúmeros estudos buscando compreender sua ação na indução da ovulação (MURDOCH et al., 1993; FORTUNE et al., 2009). A primeira hipótese sugeriu que a  $PGF_{2\alpha}$  estaria envolvida na liberação de GnRH (ZOR et al., 1970). Posteriormente, outros

trabalhos relacionaram a aplicação de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  exógena ao aumento na liberação de LH em ovinos (CARLSON et al., 1973), ratas (RATNER et al., 1974) e vacas (RANDEL et al., 1996). Ao ser utilizada em protocolos de sincronização de ovulação, associada à progestágenos, a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  pode potencializar os efeitos da  $\text{P}_4$  exógena após sua remoção (PFEIFER et al., 2009) aumentando a resposta da hipófise ao GnRH (RANDEL et al., 1996) e, assim, induzindo a ovulação. A PGF tem efeito direto na hipófise anterior (WEEMS et al., 2006), resultando em maior liberação de LH (RANDEL et al., 1996).

A  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e seus análogos comerciais podem ser utilizados isoladamente ou associados à outros hormônios reprodutivos (THATCHER et al., 2002). Sua aplicação exógena é feita usualmente pela via intramuscular, porém, algumas evidências indicam que a administração do hormônio por meio da submucosa da vulva tem efeito direto nos ovários, evitando a circulação sistêmica (GIOSO et al., 2005). Ao usar radiografia contrastada, Gioso et al. (2005) demonstrou a existência de anastomoses entre os vasos sanguíneos da vulva, útero e ovários.

## **2.6 Protocolos de sincronização**

Ao longo do tempo foram feitos vários estudos visando a obtenção de melhores resultados de fertilidade em vacas leiteiras, principalmente, com a introdução de programas de sincronização da ovulação, com o objetivo de manipular o ciclo estral de bovinos. A partir da criação do protocolo “Ovsynch”, em 1995, houve melhora da fertilidade dos rebanhos leiteiros (SANTOS et al., 2010). O protocolo permitiu o uso da IATF sem necessidade de detecção do estro, utilizando aplicações de hormônios como a  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , intercalada por duas aplicações de GnRH, em dias programados, aumentando o número de inseminações e possibilitando uma taxa de concepção (TC) similar aquela obtida com uso da IA, após a detecção de cio natural.

A primeira aplicação de GnRH resulta na ovulação do folículo dominante, que está presente em 50-70% dos casos, e subsequente emergência de uma

nova onda folicular 36 a 48 horas depois. Caso essa onda coincida com os primeiros três dias de uma onda folicular espontânea, esta segue seu desenvolvimento normal para um folículo dominante nos 7 dias seguintes. A  $\text{PGF}_{2\alpha}$  administrada 7 dias depois tem como finalidade a indução da luteólise, resultando no crescimento final do folículo dominante. A segunda dose de GnRH, no dia 9 (48 horas depois), eleva o LH ao seu pico, e provoca a ovulação do folículo dominante (pré-ovulatório), 30 horas depois da administração. É Recomendado que a IATF seja realizada 16-22 horas após sua aplicação (AZEVEDO et al., 2014). A administração de mais uma dose de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  no D8 do tradicional protocolo “Ovsynch”, aumentou a proporção de vacas com luteólise completa, elevando a TC de 32% para 37% (CARVALHO et al., 2015).

A  $\text{PGF}_{2\alpha}$  pode ser aplicada pela primeira vez entre 23 e 29 dias após o parto, já que a primeira ovulação ocorre em média aos  $19 \pm 11$  após a parição (DE VRIES et al., 2006), e o CL não responde à  $\text{PGF}_{2\alpha}$  até 5 a 7 dias da ovulação. As vantagens em utilizar a sincronização vão muito além de programar o cio dos animais, já que um número grande de vacas leiteiras sofre de doenças uterinas no pós-parto. As administrações de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  iniciadas até 26 dias após a parição auxiliam na involução uterina e na eliminação de infecções sem a necessidade de antibióticos, programando o cio para uma próxima inseminação e pré-sincronizando o animal para melhores resultados em programas de IATF (SANTOS et al., 2010).

O protocolo original sofreu várias modificações ao longo do tempo, inclusive uma pré-sincronização com duas administrações de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , com intervalo de 14 dias, sendo realizados 10 a 14 dias antes do protocolo original (“Presynch-Ovsynch”). Outras combinações de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e GnRH como: “G6G”, “PG3G” e “Double-Ovsynch” resultaram em aumento na TC, atingindo valores acima de 40% (SANTOS et al., 2010; RIBEIRO et al., 2012; AZEVEDO et al., 2014; SANTOS et al., 2016). O uso do “Presynch” permitiu intervir no desenvolvimento dos folículos antes da administração da primeira dose de GnRH, resultando no aumento do número de animais no período entre 5 e 12



dias do ciclo, período em que ocorre maior resposta ovulatória, antes de iniciar o “Ovsynch”, elevando a TC, quando comparados com o protocolo sem a pré-sincronização (AZEVEDO et al., 2014).

O protocolo “Presynch-Ovsynch” pode aumentar até 38% a TC, com 33% de aumento ao realizar a primeira IA, e 30% nas inseminações seguintes, com detecção de estro, sendo que com o protocolo “Double-Ovsynch” essa média subiu para 45% e 30% para primeira e demais inseminações, respectivamente. Enfatizou-se, ainda, a escolha do protocolo mais adequado para cada exploração e controle na administração dos hormônios para que não houvesse falhas na ação dos mesmos (GIORDANO et al., 2012a),

O desenvolvimento de protocolos de IATF proporcionaram uma melhora nos programas de gestão produtiva, alinhando benefícios reprodutivos e econômicos para as fazendas leiteiras, otimizando sua capacidade e eficiência (SANTOS et al., 2010). Com essa ferramenta em mãos, os produtores conseguiram diminuir o intervalo entre partos, o primeiro serviço, os dias em aberto e a taxa de serviços, proporcionando benefícios nas taxas de concepção e prenhez (LUCY, 2001; GALVÃO et al., 2013)

O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos da administração de meia dose de GnRH na submucosa da vulva no momento da segunda dose de GnRH do protocolo “Ovsynch”, avaliando-se os níveis de LH e progesterona, a dinâmica funcional ovariana e a taxa de concepção, em rebanho leiteiro.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; KASTELIC, J. P.; KO, J. C.; GINTHER, O. J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of reproduction and fertility**, v. 94, n. 1, p. 177-188, 1992.

ADAMS, G. P.; KOT, K.; SMITH, C. A.; GINTHER, O. J. Effect of the dominant

follicle on regression of its subordinates in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 1, p. 267-275, 1993.

ALEXANDRATOS, N.; BRUINSMA, J. World Agriculture: **Food and Agricultural Organization (FAO)**, Rome, ESA Working Paper, v. 12, n. 02, p. 2030-2050, 2012.

ALVES, N. G.; COSTA, E. P. Da; GUIMARÃES, J. D.; SILVA, M. R.; ZAMPERLINI, B.; COSTA, F. M. J.; SANTOS, A. D. F.; MIRANDA NETO, T. Atividade Ovariana em Fêmeas Bovinas da Raça Holandesa e Mestiças Holandês x Zebu, Durante Dois Ciclos Estrais Normais Consecutivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 627-634, 2002.

ALVES, B.G et.al. **Curso de Transferência de Embriões**, Uberlandia, p. 47, 2007.

ALMERAYA, A. P. **Manejo Reproductivo en Bovinos em Sistemas de Producción de Leche**. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de Mexico, 2010.

ARIAS, L. A. Q.; PABLO, C. D.; HERRADÓN, P. J. G.; MARTÍNEZ, A. I. P.; GONZÁLEZ, J. J. B. **Ecografía y Reproducción em la Vaca**, Universidade de Santiago de Compostela, 2006.

ARTHUR, H.G. **Reprodução e Obstetrícia em Veterinária**. Guanabara, 4 ed, 1979.

AZEVEDO, C.; CANADA, N.; SIMÕES, J. *Ovsynch* hormonal protocol and their modifications on dairy cows: a review. **Archivos de Zootecnia**, v. 63, n. 244, p. 173-187, 2014.

AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; TORRES-JÚNIOR, J. R.S.; DEMÉTRIO, C.G.B.; DE LIMA, C. G.; BARUSELLY, P. S. 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.

BALL, P. J.; PETERS, A. R. Manejo reproductivo em bovinos em sistemas de produção de leite. México: **Reproduction in cattle**, (3ª Ed), United Kingdom: Blackwell Publishing Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, 2007.

BARROS, C.M.; ERENO, R.L. Avanços em tratamentos hormonais para a inseminação artificial com tempo fixo (IATF) em bovinos de corte. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 23-34, 2004.

BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA, E.H. **Simpósio sobre controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes**. São Paulo: Fundação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, p. 332, 2000.

BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.D.O.; CARVALHO, N.A.T.D.; BERBER, R.C.D.A.; VALENTIM, R.; CARVALHO FILHO, A.F.D.; COSTA NETO, W.P. Dinâmica folicular e taxa de prenhez em novilhas receptoras de embrião (*Bos taurus indicus x Bos taurus taurus*) tratadas com o protocolo "Ovsynch" para inovulação em tempo fixo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 96-106, 2003.

BAS, S.; PINTO, C.G.; DAY, M.L.; SCHUENEMANN, G.M. Effect of intrauterine administration of gonadotropin releasing hormone on serum LH concentrations in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.78, p.1390–1397, 2012.

BAS, S.; MAQUIVAR, M.G.; COUTINHO, M.A.; DAY, M.L.; DAGLIO, M.C.; HARGUINDEGUY, S.; TITLER, M.; SCHUENEMANN, G.M. Effect of intrauterine administration of gonadotropin releasing hormone with glycerol on serum LH concentrations in lactating dairy cows. **Anim. Reprod. Sci.** v.145, p.15–22, 2014.

BEAL, W. E.; MILVAE, R. A.; HANSEL, W. Oestrous cycle length and plasma progesterone concentrations following administration of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  early in the bovine oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 59, n.2, p. 393-396, 1980.

BRIDGES, P.J.; FORTUNE, J. E. Regulation, action and transport of prostaglandins during the periovulatory period in cattle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 263, p. 1-9, 2007.

BRIDGES, G. A.; HESSER, L. A.; GRUM, D. E.; MUSSARD, M. L.; GASSER, C. L.; DAY, M. L. Decreasing the interval between GnRH to PGF<sub>2</sub> $\alpha$  from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 843-851, 2008.

BRUSVEEN, D. J.; SOUZA, A. H.; WILTBANK M. C. Effects of additional prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  and estradiol-17 $\beta$  during Ovsynch in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 4, p. 1412-1422, 2009.

BODENSTEINER, K. J.; KOT, K.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v. 45, n. 6, p. 1115-1128, 1996.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; TRIBULO, H. E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R. J. Follicular wave dynamics after estradiol-17 $\beta$  treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v. 41, n. 8, p. 1555-1569, 1994.

BÓ, G. A.; BROGLIATTI, G. M.; PIERSON, R. A.; ADAMS, G. P.; MAPLETOFT, R. J. Local versus systemic effect of exogenous estradiol-17 $\beta$  on ovarian

follicular dynamics in heifers with progestogen implants. **Animal Reproduction Science**, v. 59, p. 141-157, 2000.

BUTLER, W.R. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 449-457, 2000.

CARLSON, J.C.; BARCIKOWSKI, B.; MCCRACKEN, J.A. PGF<sub>2</sub> $\alpha$  and the release of LH in 1190 sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 34, p. 357-361, 1973.

CARVALHO, P.D.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M. Manipulation of progesterone to increase ovulatory response to the first GnRH treatment of an Ovsynch protocol in lactating dairy cows receiving first timed artificial insemination. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 8800–8813, 2015

CHENAULT, J.R.; KRATZER, D.D.; RZEPKOWSKI, R.A.; GOODWIN, M.C. LH and FSH response of Holstein heifers to fertirelin acetate, gonadorelin and buserelin. **Theriogenology**, n. 1, v. 34, p. 81-98, 1990.

CHRISP, P.; GOA, K.L. Nafarelin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and clinical potential in sex hormone-related conditions. **Drugs**, v. 39, p. 523–551, 1990.

CIPRIANO, R. S.; CARVALHO, B. A.; MARANGONI, N. R.; NOGUEIRA, G. P. LH and FSH concentration and follicular development in Nelore heifers submitted to fixed-time artificial insemination protocols with different progesterone concentrations. **Animal Reproduction Science**, v. 127, n. 1, p. 16-22, 2011.

COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; DAVIS, H.; RUTLEDGE, M. D.; MARTINEZ, M. F.; SMALL, J. A.; MAPLETOFT, R. J. Effects of plasma progesterone

concentrations on LH release and ovulation in beef cattle given GnRH. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 34, n. 1, p. 109-117, 2008.

CONN, P.M.; STALEY, D.; HARRIS, C.; ANDREWS, W.W.; GOROSPE, W.C.; MCARDLE, C.A.; HUCKLE, W.R.; HANSEN, J. Mechanism of action of gonadotropin releasing hormone. **Annual Review of Physiology**, v. 48, p. 495-513, 1986.

CROWE, M.A.; WILLIAMS, E.J. Triennial Lactation Symposium: Effects of stress on postpartum reproduction in dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 5, p. 1722-1727, 2012.

CUERVO-ARANGO, J.; GARCÍA-ROSELLÓ, G.; GARCÍA-MUÑOZ, A.; VALLDECABRES-TORRES, X.; MARTÍNEZ-ROS, P.; GONZÁLES-BULNES, A. The effect of a single high dose of PGF<sub>2</sub>α administered to dairy cattle 3.5 days after ovulation on luteal function, morphology, and follicular dynamics. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1736-1743, 2011.

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de Fisiología Veterinária** (3ªEd.). Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.

CUTULLIC, E.; DELABY, L.; CAUSEUR, D.; MICHEL, G.; DISENHAUS, C. Hierarchy of factors affecting behavioural signs used for oestrus detection of Holstein and Normande dairy cows in a seasonal calving system. **Animal Reproduction Science**, v. 113, n 1-4, p. 22-37, 2009.

CUTULLIC, E.; DELABY, L.; GALLARD, Y. DISENHAUS, C.; Towards a better understanding of the respective effects of milk yield and body condition dynamics on reproduction in Holstein dairy cows. **Animal**, v. 6, n. 3, p. 476-487, 2012.

DEJARNETTE, J.M; SALVERSON, R.R; MARSHALL, C.E. Incidence of premature estrus in lactating dairy cows and conception rates to standing estrus

or fixed-time inseminations after synchronization using GnRH and PGF<sub>2α</sub>. **Animal Reproduction Science**, v. 67, n. 1-2, p. 27-35, 2001.

DE VRIES, A.; CRANE, M.B.; BARTOLOME, J.A.; MELENDEZ, P.; RISCO, C.A.; ARCHBALD, L.F. Economic comparison of timed artificial insemination and exogenous progesterone as treatments for ovarian cysts. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 3028-3037, 2006.

DIAS, F.C.F.; COLAZO, M.G.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R.J.; ADAMS, G.P.; SINGH, J. Progesterone concentration estradiol pretreatment, and dose of gonadotropin-releasing hormone affect gonadotropin-releasing hormone-mediated luteinizing hormone release in beef heifers. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 39, n. 3, p. 155-162, 2010.

DOBSON, H.; SMITH, R.F.; ROYAL, M.D.; KNIGHT, C.H.; SHELDON, I.M. The high producing dairy cow and its reproductive performance. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 2, p. 17-23, 2007.

D'OCCHIO, M. J.; AND ASPDEN, W. J. Endocrine and reproductive responses of male and female cattle to agonists of gonadotropin-releasing hormone. **J. Reprod. Fert.** (Suppl. 54), p.101–114, 1999.

DONNEZ, J., NISOLLE-POCHET, M., CLECKX-BRAUN, F., SANDOW, J., CASANAS-ROUX, F. Administration of nasal buserelin as compared with subcutaneous buserelin implant for endometriosis. **Fertility and Sterility**, v. 52, n. 1, p. 27-30, 1989.

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animal implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1211-1239, 2001.

FERNANDES, P.; TEIXEIRA, A. B.; CROCCI, A. J.; BARROS, C. M. Timed artificial insemination in beef cattle using GnRH agonist, PGF2 $\alpha$  and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 55, n. 7, p. 1521–1532, 2001.

FERREIRA, A. D. M. **Reprodução da fêmea bovina: fisiologia aplicada e problemas mais comuns (causas e tratamentos)**. 1.ed. Juiz de Fora/MG: Editar Editora Associada, p. 422, 2010.

FIELDS, M. J.; FIELDS, P. A. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. **Theriogenology**, v. 45, n. 7, p. 1295-1325, 1996.

FORDE, N.; BELTMAN, M. E.; LONERGAN, P.; DISKIN, M.; ROCHE, J. F.; CROWE, M. A. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3-4, p. 163-169, 2011.

FORTUNE, J.E.; WILLIS, E.L.; BRIDGES, P.J.; YANG, C.S. The periovulatory period in cattle: progesterone, prostaglandins, oxytocin and ADAMTS proteases. **Animal reproduction/ Colegio Brasileiro de Reproducao Animal**, v. 6, p. 60-71, 2009.

FUNSTON, R.N.; SEIDEL, G.E. Gonadotropin-releasing hormone increases cleavage rates of bovine oocytes fertilized in vitro. **Biology of Reproduction.**, v.53, p.541-5, 1995.

GALVÃO, K.N.; FREDERICO, P.; DE VRIES, A.; SCHUENEMANN, G.M. Economic comparison of reproductive programs for dairy herds using estrus detection, timed artificial insemination, or a combination. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 2681-2693, 2013.

GEARY, T. W.; DOWNING, E. R.; BRUEMMER, J. E.; WHITTIER, J. C. Ovarian and estrous response of suckled beef cows to the select synch estrous



synchronization protocol. **Professional Animal Scientist**, v. 16, n. 1, p. 1-5, 2000.

GEROSA, S.; SKOET, J. Milk availability. Trends in production and demand and mediumterm outlook. **Food and Agricultural Organization (FAO)**, Rome, ESA Working Paper, n. 12-01, 2012.

GIAMMARINO, A.; MANERA, M.; ROBBE, D.; PERUGINI, M.; AMORENA M. The effect of GnRH on in vitro bovine myometrial activity. **Animal Reproduction Science**, v. 112, p. 325-333, 2009.

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of reproduction and fertility**, v. 87, n. 1, p. 223-230, 1989.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; KOT, K. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 124, n. 4, p. 475-482, 2002.

GIORDANO, J.O.; FRICKE, P.M.; GUENTHER, J.N.; LOPES, G.; HERLIHY, M.M.; NASCIMENTO, A.B.; WILTBANK, M.C. Effect of progesterone on magnitude of the luteinizing hormone surge induced by two different doses of gonadotropin-releasing hormone in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 7, 3781-3793, 2012a.

GIOSO, M.M.; COSTA, E.P.; FERNANDES, C.A.C; PAULA, T.A.R.; GUIMARÃES, J.D. Angioarquitetura venosa do órgão genital da fêmea bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.** v. 57, p. 715–719, 2005.

GONG, J. G.; CAMPBELL, B. K.; BRAMLEY, T. A.; GUTIERREZ, C. G.; PETERS, A. R.; WEBB, R. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers

continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. **Biology of reproduction**, v. 55, n. 1, p. 68-74, 1996.

GONZÁLEZ, F. H. D. **Introdução à endocrinologia reprodutiva veterinária**. 1.ed., Porto Alegre: UFRGS, p. 1-53, 2002.

GÜMEN, A.; GUENTHER, J. N.; WILTBANK, M. C. Follicular size and response to *Ovsynch* versus detection of estrus in anovular and ovular lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.10, p.3184-3194, 2003.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ. B. **Reprodução Animal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Manole, p. 513, 2004.

HENRICKS, D. M.; LONG, J. T.; HILL, J. R.; DICKEY, J. F. The effect of prostaglandin F2 alpha during various stages of the oestrous cycle of beef heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 41, n. 1, p. 113-120, 1974.

HERBERT, C.A.; TRIGG, T.E. Applications of GnRH in the control and management of fertility in female animals. **Animal Reproduction Science.**, v.88, p.141-53, 2005.

HUNTER, R.H.F.; WILMUT, I. Sperm transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reprod. Nutr. Develop.*, v.24, p.597-608, 1982.

IBGE. **Produção da pecuária municipal 2014**. Rio de Janeiro, v. 42. p. 36, 2014. Disponível em:

<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2014/default.shtm>>.

Acesso em: 2 jun. 2018.

IRELAND, J. J.; MIHM, M.; AUSTIN, E.; DISKIN, M. G.; ROCHE, J. F. Historical Perspective of Turnover of Dominant Follicles During the Bovine Estrous Cycle:

Key Concepts, Studies, Advancements, and Terms. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 7, p. 1648-1658, 2001.

KASIMANICKAM, R.; DAY, M. L.; RUDOLPH, J. S.; HALL, J. B.; WHITTIER, W.D. Two doses of prostaglandin improve pregnancy rates to timed-AI in a 5-day progesterone-based synchronization protocol in beef cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 762–767, 2009.

KAWASHIMA, C.; MATSUI, M.; SHIMIZU, T.; KIDA, K.; MIYAMOTO, A. Nutritional factors that regulate ovulation of the dominant follicle during the first follicular wave postpartum in high-producing dairy cows. **Journal of Reproduction and Development**, v. 58, n. 1, p. 10-16, 2012.

LÓPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; YÁNIZ, J.L.; GARBAYO, J.M.; HUNTER, R.H.F. Timing of early foetal loss for single and twin pregnancies in dairy cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, n. 6, p. 429-433, 2004.

LUCY, M.C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end?. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 6, p. 1277-1293, 2001.

MACMILLAN, K.L.; THATCHER, W.W. Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 45, n. 6, p. 883-889, 1991.

MACMILLAN, K. L.; SEGWAGWE, B. V. E.; PINO, C. S. Associations between the manipulation of patterns of follicular development and fertility in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 327-344, 2003.

MENESES, M.; PASQUALINO J.; CASTELLS F. Environmental assessment of the milk life cycle: the effect of packaging selection and the variability of milk-production data. **Journal of Environmental Management**, v. 107, p. 76–83, 2012.

MIHM, M.; CROWE, M. A.; KNIGHT, P. G.; AUSTIN, E. J. Follicle wave growth in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, n. 4, p. 191-200, 2002.

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

MOREIRA, F.; DE LA SOTA, R. L.; DIAZ, T.; THATCHER, W. W. Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 6, p. 1568-1576, 2000.

MOREIRA, F.; ORLANDI, C.; RISCO, C.A.; MATTOS, R.; LOPES, F.; THATCHER, W.W. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 7, p. 1646-1659, 2001.

MURDOCH, W. J.; HANSEN, T. R.; MCPHERSON, L. A. A review – role of eicosanoids in vertebrate ovulation. **Prostaglandins**, v. 46, p. 85–115, 1993.

NAWITO M, SCHALLENBERGER E, SCHAMS D. Release of lutropin (LH) and follitropin (FSH) in cattle after administration of a new gonadoliberin (GnRH) analog in comparison with the gonadoliberin decapeptide. **Theriogenology**., v.7, p.277-91, 1977.

NEBEL, R. L.; DRANSFIELD, B. G.; DALTON, J. C.; BAME, J. H.; SAACKE, R. G. Timing Of AI – Have We Been Wrong All These Years ? **Advances in Dairy Technology**, v. 12, p. 195-209, 2000.

ODDE, K.G. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 817-830, 1990.

OKADA, M. H.; YAMAZAKIM, I.; OGAWAM, Y.; HIRAIM, S.; YASHIKI, M.T.; MIMA, H. Vaginal absorption of a potent luteinizing hormone releasing hormone analag (leuprolide) in rats. I. Absorption by various routes and absorption enhancement. **J. Pharm. Sci.** v. 71, p.1367–1371, 1982.

OKADA, H.; YAMAZAKI, I.; YASHIKI, T.; MIMA, H. Vaginal absorption of a potent luteinizing hormone releasing hormone analog (leuprolide) in rats. ii. mechanism of absorption enhancement with organic acids. **J. Pharm. Sci.** v.72, p.75–78, 1983.

PETERS AR. Veterinary clinical application of GnRH questions of efficacy. **Anim Reprod Sci.**, v.88, p.155-67, 2005.

PFEIFER, L.F.; SIQUIRA, L.G.; MAPLETOFT, R.J.; KASTELIC, J.P.; ADAMS, G.P.; COLAZO, M.G. Effects of exogenous progesterone and cloprostenol on ovarian follicular development and first ovulation in prepubertal heifers. **Theriogenology**, v. 72, p. 1054–64, 2009.

PHARRISS, B.B.; WYNGARDEN, L.J. The Effect of Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  on the Progesterone Content of Ovaries from Pseudopregnant Rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.** v. 130, n. 1, p. 92-94, 1969.

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.

PURSLEY, J.R.; KOSOROK, M.R.; WILTBANK, M.C. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 2, p.301–306, 1997a.

PURSLEY, J.R.; WILTBANK, M.C.; STEVENSON, J.S.; OTTOBRE, J.S.; GARVERICK, H.A.; ANDERSON, L.L. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 2, p. 295–300, 1997b.

RABIEE, A.R.; MACMILLAN, K.L.;SCHWARZENBERGER, F. The effect of level of feed intake on progesterone clearance rate by measuring faecal progesterone metabolites in grazing dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 67, n. 3-4, p. 205-214, 2001.

RABIEE, A.R.; MACMILLAN, K.L.; SCHWARZENBERGER, F. AND WRIGHT, P.J. Effects of level of feeding and progesterone dose on plasma and faecal progesterone in ovariectomised cows. **Animal Reproduction Science**, v. 73, n. 3-4, p. 185-195, 2002.

RABIEE, A.R.; LEAN, I.J.; STEVENSON, M.A. Efficacy of ovsynch program on reproductive performance in dairy cattle: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 8, p.2754–2770, 2005.

RAEHS, S.C.; SANDOW, J., WIRTH, K., MERKLE, H.P. The adjuvant effect of bacitracin on nasal absorption of gonadorelin and buserelin in rats. **Pharm Research**, v. 5, n. 11, p. 689-693, 1988.

RAMAKRISHNAPPA, N.; GIRITHARAN, G.; AALLI, M.; MADAN, P.; RAJAMAHENDRAN, R. GnRH receptor messenger ribonucleic acid expression in bovine ovary. **Can. J. Anim. Sci.** v. 83, p. 823–826, 2003.

RANDEL, R.D.; LAMMONGLIA, M.A.; LEWIS, A.W.; NEUENDORFF, D.A.; GUTHRIE, M.J. Exogenous PGF(2)alpha enhanced GnRH-induced LH release in postpartum cows. **Theriogenology**, v.45, p. 643–54, 1996.

RATNER A, WILSON MC, STRIVASTAVA L, PEAKE GR. Stimulatory effect of PGE, on rat anterior pituitary cyclic AMP and luteinizing hormone release. **Prostaglandins**, v. 5, p. 165-171, 1974.

RATHBONE, M. J.; KINDER, J. E.; FIKE, K.; KOJIMA, F.; CLOPTON, D.; OGLE, C. R.; BUNT, C. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, n. 3, p. 277-320, 2001.

REECE, O.W. **Fisiologia de Animais Domésticos**. São Paulo: p. 289, ROCA,1996.

RHINEHART, J.D.; ARNETT, A.M.; HIGHTSHOE, R.B.; ANDERSON, L.H. Comparison of the efficiency of estradiol 17  $\beta$ , estradiol benzoate, and estradiol cypionate in stimulating atresia of dominant follicles in beef heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 1, p. 135, 2002.

RIBEIRO, E.S.; GALVÃO, K.N.; THATCHER, W.W.; SANTOS, J.E.P. Economic aspects of applying reproductive technologies to dairy herds. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 370-387, 2012.

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. **Biology of Reproduction**, v.66, p. 603-609, 2002.

ROWLANDS, I.W.; SHORT, R.V. The progesterone content of the guinea-pig corpus luteum during the reproductive cycle and after hysterectomy. **Journal of Endocrinology**, v. 19, n. 1, p. 81-86, 1959.

ROWSON, L. E.; TERVIT, R.; BRAND, A. The use of prostaglandins for synchronization of oestrus in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 29, n. 1, p. 145, 1972.

SALES, J. N. S.; CARVALHO, J. B. P.; CREPALDI, G. A.; CIPRIANO, R. S.; JACOMINI, J. O. MAIO, J. R. G.; SOUZA, J. C.; NOGUEIRA, G. P.;

BARUSELLI, P.S. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 510-516, 2012.

SANTOS, J.E.P.; BISINOTTO, R.S.; RIBEIRO, E.S.; LIMA, F.S.; GRECO, L.F.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Applying nutrition and physiology to improve reproduction in dairy cattle. **Society for Reproduction and Fertility**, v. 67, p. 387-403, 2010.

SANTOS, V.G.; CARVALHO, P.D.; MAIA, C.; CARNEIRO, B.; VALENZA, A.; CRUMP, P.M.; FRICKE, P.M. Adding a second prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  treatment to but not reducing the duration of a PRID-Synch protocol increases fertility after resynchronization of ovulation in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 5, p. 1-11, 2016.

SARTORI, R.; BASTOS, M. R.; BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; ERENO, R. L.; BARROS, C. M. 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.

SENGER, P. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2.ed. Washington: Current Conceptions, v. 368, p. 268, 2003.

SIROIS, J.; FORTUNE<sup>2</sup>, J. E. Ovarian Follicular Dynamics during the Estrous Cycle in Heifers Monitored by Real-Time Ultrasonography. **Biology of Reproduction**, v. 39, n. 2, p. 308-17, 1988.

SOUZA, A.H.; CUNHA, A.P.; CARAVIELLO, D.Z.; WILTBANK, M.C. Profiles of circulating estradiol-17 $\beta$  after different estrogen treatments in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 2, n. 4, p. 224-232, 2005.



SOUZA, A.H.; CUNHA, A.P.; SILVA, E.P.B.; GÜMEN, A.; AYRES, H.; GUENTHER, J.N.; WILTBANK, M.C. Comparison of gonadorelin products in lactating dairy cows: efficacy based on induction of ovulation of an accessory follicle and circulating luteinizing hormone profiles. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 271-279, 2009.

THATCHER, W. W.; MACMILLAN, K. L.; HANSEN, P. J.; DROST, M. Concepts for the regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. **Theriogenology**, v. 31, n. 1, p. 149-164, 1989.

THATCHER WW, DROST M, SAVIO JD, MACMILLAN KL, ENTWISTLE KW, SCHMITT EJ, ET AL. New clinical uses of GnRH and its analogs in cattle. **Animal Reproduction Science.**, v.33 ,p. 27-49, 1993.

THATCHER, W.W.; MOREIRA, F.; PANCARCIA, S.M.; BARTOLOME, J. A.; SANTOIA, J.E. Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.243-254, 2002.

THUNDATHIL, J.; KASTELIC, J.; MAPLETOFT, R. The effect of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular development and ovulation in dairy cattle. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 4, p. 314, 1998.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Dairy**: world markets and trade. USDA, p. 21, 2015. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/dairy.pdf>> . Acesso em: 20 abril. 2018.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Cattle selected countries summary**. USDA, p. 1, 2016. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Cattle+Selected+Countries+Summary&hidReportRetrievalID=2615&hidReportRetrievalTemplateID=7>>. Acesso em: 25 abril. 2018.

USDA. DAIRY, PART IV: **Reference of Dairy Cattle Health and Management Practices in the United States**, 2007 USDA: APHIS:VS, CEAH. #N494.0209, 2009.

VALLDECABRES-TORRES, X.; GARCÍA-ROSELLÓ, E.; GARCÍA-MUÑOZ, A.; CUERVO-ARANGO, J. Effects of d-cloprostenol dose and corpus luteum age on ovulation, luteal function, and morphology in nonlactating dairy cows with early corpora lutea. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 8, p. 4389-4395, 2012.

VASCONCELOS, J. L. M.; SILCOX, R. W.; ROSA, G. J.; PURSLEY, J. R. WILTBANK, M. C. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 52, n. 6, p. 1067-1078, 1999.

VASCONCELOS, J. L. M.; VILELA, E. R.; SÁ FILHO, O. G. Temporary weaning at two different times of the GnRH-PGF2 $\alpha$ -EB synchronization of ovulation protocol in post-partum Nellore cows. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 61, n. 1, p. 95–103, 2009.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 2501-2509, 2000.

VYNCKIER, L.; DEBACKERE, M.; DE KRUIF, A.; CORYN, M. Plasma estradiol-17 $\beta$  concentrations in the cow during induced estrus and after injection of estradiol-17 $\beta$  benzoate and estradiol-17 $\beta$  cypionate - a preliminary study. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 13, n. 1, p. 36-42, 1990.

WEEMS, C.W.; WEEMS, Y.S.; RANDEL, R.D. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 206-228, 2006.

WHITTIER, W. D.; KASIMANICKAMB, R. K.; CURRINA, J. F.; SCHRAMMA, H. H.; VLCEK, M. Effect of timing of second prostaglandin F2 $\alpha$  administration in a 5-day, progesterone-based CO-Synch protocol on AI pregnancy rates in beef cows. **Theriogenology**, v. 74, n. 6, p. 1002–1009, 2010.

WIJMA, R.; STANGAFERRO, M.L.; MASELLO, M.; ELMETWALLY, M.A.; GRANADOS, G.E.; AMOVILLI, F.; GIORDANO, J.O. Intravaginal instillation of gonadotropin-releasing hormone analogues with an absorption enhancer induced a surge of luteinizing hormone in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.** v. 100, p. 7626–7637, 2017.

WILTBANK, M.C. How information on hormonal regulation of the ovary has improved understanding of timed breeding programs. **Proceedings Annual Meeting Society For Theriogenology**, p.83-97, 1975.

WILTBANK, M. C.; GÜMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 21-52, 2002.

WILTBANK, M. Uso eficaz de hormônios de reprodução: II. Programas de reprodução. In: NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, IV. 2000, Passos. **Anais...** Passos: CONAPEC Jr. & CBRA, p. 71-85, 2000.

WILTBANK, M.C; SOUZA, A.H.; CARVALHO, P.D.; BENDER, R.W.; NASCIMENTO, A.B. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 1, p. 238-243, 2011.

WOLFENSON, D.; INBARA, G.; ROTH, Z.; KAIMB, M.; BLOCHA, A.; BRAW-TAL, R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology**, v. 62, p. 1042-1055, 2004.

ZOCCAL, R. A Região Sul se fortalece no leite. **Panorama do Leite**, Juiz de Fora, v. 7, n. 75, p. 4-6, 2015.

ZOR, A.; KANEKO, T.; SCHNEIDER, H.P.G.; MCCANN, S.M.; FIELD, J.B. Further studies on stimulation of anterior pituitary cyclic adenosine-3,5'-monophosphate formation by the hypothalamic extract and prostaglandins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 245, p. 2883-2885, 1970

**CAPÍTULO 2 - ARTIGO CIENTÍFICO: EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE DOSE REDUZIDA DE GnRH NA SUBMUCOSA DA VULVA SOBRE OS NÍVEIS DE LH, PROGESTERONA, DINÂMICA OVARIANA E TAXA DE CONCEPÇÃO EM REBANHO LEITEIRO**

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE DOSE REDUZIDA DE GnRH NA SUBMUCOSA DA VULVA SOBRE OS NÍVEIS DE LH, PROGESTERONA, DINÂMICA OVARIANA E TAXA DE CONCEPÇÃO EM REBANHO LEITEIRO**

Fernando Franco Polizel<sup>a</sup>, Fernanda Nunes Marqui<sup>b</sup>, Tairini Erica da Cruz<sup>b</sup>,  
Alício Martins Júnior<sup>c</sup>, Tereza Cristina Cardoso da Silva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba. Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal. Rua Clóvis Pestana, 793, 16050-680, SP, Brasil

<sup>b</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. Rua Prof. Doutor Walter Mauricio Correa, s/n, 18618-681, SP, Brasil

<sup>c</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba. Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal. Rua Clóvis Pestana, 793, 16050-680, SP, Brasil

Artigo redigido segundo as normas da revista Animal Reproduction Science  
<https://www.elsevier.com/journals/animal-reproduction-science/0378-4320/guide-for-authors> ranqueada qualis A2

**RESUMO** - O objetivo do presente trabalho foi verificar os efeitos da administração de meia dose de GnRH na submucosa da vulva sobre os níveis de LH, progesterona, dinâmica folicular ovariana e taxa de concepção em rebanho leiteiro, utilizando o protocolo “Ovsynch”, modificado. As vacas ( $n = 13$ ) e novilhas ( $n = 11$ ) foram pré-sincronizadas com duas injeções de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , com intervalo de 14 dias e 12 dias. Após a última prostaglandina, foi iniciado o protocolo “Ovsynch”, modificado pela inclusão de duas injeções de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . No momento da aplicação da segunda dose de GnRH (GnRH-2) os animais foram distribuídos de maneira homogênea para os grupos: controle (CN;  $n = 8$ ), animais recebendo 2,5 mL de cloreto de sódio 0,9% por via im, intramuscular (IM;  $n = 8$ ), injetado 10,5  $\mu\text{g}$  de GnRH por via intramuscular e submucosa da vulva (SV;  $n = 8$ ), recebendo 5,25  $\mu\text{g}$  de GnRH. As amostras de sangue foram colhidas no D0, D7, D9 e D17 para determinação da concentração sérica de progesterona, e para o LH, foram colhidas em cinco momentos no D9 (M-40, M0, M40, M80 e M120 min). Quanto ao LH, não houve diferença significativa entre os grupos IM e SV em todos os momentos, os quais foram significativamente maiores do que o CN, enquanto no SV, maiores valores de média foram obtidos para a área sob a curva de LH (ASC-LH) em comparação com os grupos IM e CN. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto à concentração de progesterona, independente do dia avaliado. Todos os grupos apresentaram o mesmo número de ovulação (6/8), porém, com menor média de tempo para IM e VS em comparação ao grupo controle. A taxa de concepção superior no grupo IM seguida por CN e VS. Concluindo, a administração de meia dose de GnRH na submucosa da vulva pode ser uma alternativa eficiente para a sincronização da ovulação em rebanho de leite.

**Palavras-chave:** Buserelina; Meia dose; Hormônio Luteinizante; Ovulação; “Ovsynch”

**EFFECTS OF LOW DOSE OF GnRH ADMINISTERED IN THE VULVA  
SUBMUCOSA ON LH AND PROGESTERONE LEVELS, OVARIAN DYNAMIC  
AND CONCEPTION RATE IN DAIRY CATTLE**

**ABSTRACT** - The aim of this study was to verify the effects of low dose of GnRH administered in the vulva submucosa on LH and progesterone levels, ovarian dynamics and conception rate in dairy cattle using a modified Ovsynch protocol. Cows ( $n = 13$ ) and heifers ( $n = 11$ ) were pre-synchronized with two injections of PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  administered with a 14-days interval. Twelve days after the last prostaglandin dose a modified Ovsynch protocol was initiated and at the time of the second dose of GnRH (GnRH-2) the animals were homogeneously distributed to groups: control (CN;  $n = 8$ ), receiving 2.5 mL of 0.9% sodium chloride, im, intramuscular (IM;  $n = 8$ ), receiving 10.5  $\mu$ g of GnRH intramuscular; and vulva submucosa (VS;  $n = 8$ ) with administration of 5.25  $\mu$ g of GnRH. Blood samples were collected to determine serum progesterone concentration on D0, D7, D9 and D17, and the level of LH at five moments on D9 (M-40, M0, M40, M80 and M120 min). Higher levels of LH were observed in IM and VS groups in comparison with CN, however no significant difference was found between IM and VS for any time of evaluation. The higher mean value for the area under LH curve (AUC-LH) was found in VS than for IM and CN. There was no difference among groups for progesterone levels measured on in the different days of the protocol. The number of ovulated animals was similar among groups, but the time elapsed to ovulation was lower in IM and VS than in control group. The conception rate was higher in IM group, followed by CN and then VS. In conclusion, half dose of buserelin acetate in the vulva submucosa can be an effective alternative for ovulation synchronization in dairy cattle.

**Keywords:** Buserelin; Half dose; Luteinizing Hormone; Ovulation; Ovsynch

## 1 Introdução

A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) é mundialmente utilizada na reprodução de bovinos (Lamb et al., 2010; Wiltbank e Pursley, 2014), tendo como objetivo principal aumentar o desempenho reprodutivo do rebanho. A sincronização do estro e da ovulação, por meio da implementação de protocolos hormonais, propicia a inseminação dos animais em um momento mais oportuno e, conseqüentemente, a obtenção de melhores taxas de fertilidade, notadamente, em rebanhos leiteiros (Moreira et al., 2001; Souza et al., 2008; Giordano et al., 2012a). No gado de leite, a utilização de hormônios à base GnRH tem se destacado na indução da ovulação, uma vez que proporciona a liberação de FSH e LH (Fink, 1979; Page, 2006).

A combinação de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e GnRH tem sido utilizada com frequência em programas de sincronização de estro e ovulação para provocar a luteólise e estimular o desenvolvimento do folículo, respectivamente (Peters, 2005; Pursley et al., 1995). Quanto à progesterona, é desejável que sua liberação seja lenta, ao contrário do GnRH e da  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , os quais somente exercerão suas respectivas funções caso ocorra uma rápida absorção para indução do pico de LH e lise do corpo lúteo (Wijma et al., 2017).

O GnRH é um neuropeptídeo sintetizado por neurônios hipotalâmicos e possui papel central na reprodução de mamíferos (Page, 2006). Embora, em bovinos, a principal via de aplicação desse hormônio seja a intramuscular, devido ao fato de possuir baixo peso molecular, o GnRH pode, também, ser absorvido por via subcutânea ou através de mucosas (Raehs et al., 1988; Donnez et al., 1989). Entretanto, quando é administrado por via subcutânea produz uma liberação mais tardia de LH e, assim, doses mais elevadas são necessárias para se obter efeitos semelhantes à via intramuscular (Conn et al., 1986).

Além da administração intramuscular e subcutânea, a via intravaginal é rotineiramente utilizada para inserção de dispositivos impregnados com progesterona de liberação lenta, em protocolos de sincronização (Macmillan et



al., 1991; Macmillan e Peterson, 1993; Chebel et al., 2006). No entanto, embora a absorção de GnRH possa ocorrer através da parede epitelial, mediante difusão transmembrana ou paracelular (Richardson e Illum, 1992), o transporte através do epitélio vaginal parece ser limitado devido a sua natureza hidrofílica, bem como pela improvável presença de receptores capazes de mediar a passagem transmembrana (Wijma et al., 2017). Da mesma forma, a difusão paracelular pode ser dificultada pelas junções intercelulares apicais (Hussain e Ahsan, 2005), que são formadas por ligações estreitas e aderentes (Ivanov et al., 2005).

No entanto, a submucosa da vulva parece ser uma via eficiente para a aplicação de hormônios reprodutivos, pois existem diversas anastomoses entre os vasos sanguíneos da vulva, útero e ovários (Gioso et al., 2005). De fato, as trocas sanguíneas entre a veia vaginal e a veia útero-ovariana permitem a redução da dose de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , sem comprometimento de sua eficiência, pois evita o metabolismo sistêmico (Rovani et al., 2012). Embora tenha sido relatada a presença de receptores de GnRH em tecidos foliculares e luteais ovarianos (Ramakrishnappa et al., 2003), bem como no útero e ovidutos, em bovinos (Schneider et al., 2006), o papel desempenhado pelos mesmos ainda não está bem esclarecido. Não há relatos na literatura, do uso de GnRH na submucosa da vulva.

Para compensar a menor absorção do GnRH, em determinadas vias de administração, o uso de análogos mais potentes se faz necessário para causar liberação de LH, e obter, assim, uma resposta fisiológica satisfatória (Wijma et al., 2017). Nesse contexto, o acetato de buserelina demonstrou ser até 50 vezes mais potente do que a gonadorelina (Chenault et al., 1990; Picard-hagen et al., 2015). Em bovinos, os estudos com GnRH têm sido direcionados, principalmente para a comparação dos efeitos de diferentes doses e tipos de análogos (Nawito et al., 1977; Souza et al., 2009). Mais recentemente, outras vias destinadas à administração de GnRH, como a intrauterina (Bas et al., 2012, 2014) e a intravaginal (Wijma et al., 2017), têm sido investigadas. No

entanto, nenhum relato sobre a administração de GnRH na submucosa da vulva foi encontrado na literatura, em nenhuma espécie.

A partir disso, nossa hipótese é a de que a administração de GnRH na submucosa da vulva aumentará os níveis circulantes de LH, influenciando benéficamente o tamanho do folículo, do corpo lúteo e as taxas de ovulação e prenhez. Desta forma, este estudo teve como objetivo verificar os efeitos de meia dose de acetato de buserelina administrado na submucosa da vulva, no momento da segunda dose de GnRH do protocolo “Ovsynch”, sobre as concentrações séricas de LH e progesterona, bem como sobre a dinâmica funcional ovariana e taxa de concepção, em rebanho leiteiro.

## **2 Material e Métodos**

### *2.1. Local, animais e nutrição*

Vinte e quatro animais da raça Holandês Preto e Branco, sendo 13 vacas em lactação e 11 novilhas em idade reprodutiva, lotados na Estância Franco (21°05'37.1"S 50°14'05.2"W), município de Buritama, SP, Brasil, foram utilizados no experimento. Os animais foram mantidos em piquetes de *Cynodon dactylon*, recebendo água *ad libitum* e dieta alimentar à base de silagem de sorgo, sal mineral, além de concentrado balanceado para as vacas e novilhas. As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia, com intervalo médio de 12 horas. Inicialmente, os animais foram distribuídos de maneira homogênea entre os grupos de tratamento, segundo a categoria (vaca/novilha), idade, nº de partos, peso corporal, escore de condição corporal (Ferguson et al., 1994) e dias em lactação (DEL) (Tabela 1). Todos os procedimentos realizados nesse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - FOA / UNESP).

### *2.2 Delineamento experimental*

Os animais foram avaliados por meio de palpação por via retal e ultrassom (US) equipado com um transdutor linear de 7,5 MHz (Mindray, DP-10 VET, China). Somente as vacas e novilhas que não apresentaram alteração patológica ao exame ginecológico, bem como possuindo corpo lúteo (CL)  $\geq 15$  mm de diâmetro e textura firme, além de tonicidade uterina característica da fase progesterônica, foram incluídas no experimento. Os animais foram submetidos ao protocolo de sincronização de estro e ovulação, conforme descrito na Figura 1. No D-28 e D-14 as fêmeas receberam, por via intramuscular, 150  $\mu\text{g}$  de D-Cloprostenol (Croniben, Biogénesis Bagó, Buenos Aires, Argentina), período este referido como “Presynch”. Após um intervalo de 12 dias os animais foram reexaminados por meio de US para mensuração do diâmetro do folículo e do CL e, somente animais apresentando folículo e CL  $\geq 10$  e 15 mm de diâmetro, respectivamente, foram mantidos no programa. Esses valores foram definidos com base no relato de Bas et al. (2012). Logo após o exame (D0) os animais receberam a primeira dose de GnRH (GnRH-1; 10,5  $\mu\text{g}$ ; Gonaxal, Acetato de Buserelina, Biogénesis Bagó), iniciando o protocolo “Ovsynch”. No sétimo dia (D7) foi administrado 150  $\mu\text{g}$  de D-Cloprostenol, o qual foi repetido após 24 horas (D8), modificando o protocolo original de Pursley et al. (1995), visando assegurar uma luteólise completa.

A segunda dose de GnRH (GnRH-2) foi administrada nove dias após o início do “Ovsynch” (D9), momento no qual os animais foram distribuídos igualmente em três grupos: controle (CN;  $n = 8$ ), os quais receberam 2,5 mL de cloreto de sódio 0,9%, por via intramuscular (JP Indústria Farmacêutica, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil); Intramuscular (IM;  $n = 8$ ), com administração de 10,5  $\mu\text{g}$  de buserelina por via intramuscular; Submucosa da vulva (SV;  $n = 8$ ), administração de 5,25  $\mu\text{g}$  de buserelina na submucosa da vulva. A aplicação do GnRH foi feita de maneira aleatória, respeitando o número de animais alocados dentro de cada grupo de tratamento. O protocolo de sincronização de estro foi realizado nos meses de novembro e dezembro de 2016, assim como as colheitas de sangue e inseminações.

### *2.3. Colheita de sangue e dosagem hormonal*

As amostras de sangue para determinação da concentração sérica de progesterona foram colhidas no D0 (GnRH-1), D7 (PGF<sub>2α</sub>-1), D9 (GnRH-2) e D17, imediatamente antes da administração dos hormônios do protocolo “Ovsynch”. As amostras de sangue para mensuração da concentração de LH foram colhidas em cinco momentos (M-40, M0, M40, M80 e M120 min), no D9, sendo que o M0 correspondeu, também, ao momento da administração do GnRH-2. Todas as colheitas foram feitas por meio de punção da veia jugular externa, utilizando tubos de 10 mL, à vácuo (BD Vacutainer, Curitiba, Paraná, Brasil), seguidas de refrigeração por 30 min e centrifugação a 2.100 x g por 15 minutos. O soro foi então dividido em dois microtubos de centrifugação de 1,5 mL e armazenado em freezer até o momento da análise. As concentrações séricas de progesterona foram determinadas em duplicatas, utilizando uma única versão comercial modificada do kit de Radioimunoensaio (RIA) (ImmunoChem™ Double Antibody, Biomedicals, Inc. Diagnostics Division, 3300 Hyland Avenue, Costa Mesa, CA, California, USA), conforme indicação do fabricante. Os coeficientes de variação alto e baixo do ensaio foram de 18,89% e 1,59%, respectivamente, e sensibilidade de 0,61 ng/mL. Os ensaios para determinação do LH foram adaptados daqueles descritos por Bolt e Rollins, (1983) e Bolt et al. (1990), utilizando um RIA validado para o uso em bovinos, com coeficiente de variação intra e inter-ensaio de 8,03% e 13,68%, respectivamente, com sensibilidade de 0,41 ng/mL.

### *2.4. Avaliação das estruturas ovarianas, inseminação artificial e diagnóstico de gestação*

As estruturas ovarianas (folículos e CL) foram monitoradas por meio de US nos dias D0, D7 e D9. O diâmetro dos mesmos foi calculado pela média das medidas tomadas na horizontal e vertical (altura + largura/2). Em caso de CL cístico, a área cística foi calculada e subtraída da área total, conforme

reportado por Martins et al. (2011) e Bas et al. (2012). Após 12 horas da aplicação do GnRH-2 (D9), exames ultrassonográficos foram realizados de 12/12 horas, por até 60 horas, visando determinar em qual intervalo de tempo a ovulação ocorreu, sendo esta, definida com o desaparecimento do folículo ovulatório (maior diâmetro), previamente identificado, e pelo aparecimento do correspondente CL. A IA foi efetuada por um único inseminador no D10, 16 horas após a aplicação do GnRH-2, empregando-se a partida de sêmen congelado de um mesmo touro, disponível comercialmente. O diagnóstico de gestação foi realizado no D43, 33 dias após a inseminação.

### *2.5. Análise estatística*

A área sob a curva (ASC) foi calculada para o LH (ASC-LH), empregando-se o método trapezoide. O efeito de tratamento do tempo de ovulação, ASC-LH, e diâmetro do folículo foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA). Teste de Tukey HSD (diferença significativa honesta) foi usado para avaliar as diferenças dentro e entre os grupos de tratamento. A transformação  $\log_{10}$  foi aplicada à ASC-LH, de modo a satisfazer os pressupostos de normalidade do teste ANOVA. A fim de contabilizar os efeitos não lineares, os dias em lactação foram convertidos em uma variável categórica, incluindo as seguintes classes: novilha, vaca lactante com DEL <120 dias e vaca lactante com DEL  $\geq$ 120 dias. Finalmente, a taxa de concepção foi avaliada pelo teste exato de Fisher aplicado aos dados binários de prenhez. Todos os resultados foram expressos em média e erro padrão da média (média  $\pm$  EPM). Todas as análises foram realizadas, empregando-se o software R v 3.4.3 (R Core Team. R, 2018) e as evidências estatísticas classificadas como altamente significativa ( $P < 0,01$ ), significativa ( $0,01 \leq P < 0,05$ ) ou sugestiva ( $0,05 \leq P < 0,10$ ).

## **3 Resultados**

Vinte e quatro animais, entre vacas e novilhas, foram selecionados para o estudo, com base nos critérios de diâmetro mínimo do CL ( $\geq 15$  mm) e folículo ( $\geq 10$  mm), bem como a idade, número de partos, peso, ECC, DEL e grupo de tratamento. Tais características foram consideradas para assegurar uma distribuição homogênea dos animais dentro dos grupos experimentais. Além disso, uma vez que as mesmas foram altamente correlacionadas, apenas o efeito da DEL foi considerado como efeito fixo, isto é, como possível fator de confusão no modelo ANOVA. Os dados referentes a essas características são apresentados na Tabela 1, sendo que nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos de tratamento ( $P > 0,05$ ).

### *3.1. Concentrações séricas de LH e progesterona*

#### *3.1.1 Hormônio luteinizante*

As concentrações séricas de LH ao longo do tempo (de M-40 a M120) são mostradas na Figura 2 e Tabela Suplementar S1. Maiores valores da média ( $P < 0,05$ ) foram observados dentro de cada grupo, a partir do M40. Porém, nenhuma diferença significativa foi constatada entre os grupos no M-40 e M0, assim como os valores médios não diferiram no M40, M80 e M120. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos intramuscular e submucosa da vulva para todos os momentos, os quais apresentaram maiores níveis de LH ( $P < 0,05$ ) em comparação com o controle.

#### *3.1.2 Progesterona*

As concentrações séricas de progesterona nos dias D0, D7 e D9 do protocolo, bem como após a ovulação (D17), são mostrados na Figura 3 e Tabela Suplementar S2. Considerando as médias dentro de cada grupo, níveis mais elevados de progesterona ( $P < 0,05$ ) foram encontrados no D7, seguido do D17, com menores valores no D9. Porém, as médias observadas no D7

não diferiram daquelas obtidas no D0. Por outro lado, resultados similares de progesterona foram obtidos entre os grupos em todos os dias de colheita de sangue para mensuração da mesma.

### *3.2 Dinâmica funcional ovariana e diagnóstico de prenhez*

Como descrito na Tabela 2, nenhum efeito de tratamento foi observado para o diâmetro folicular no D0 e D7. Entretanto, o diâmetro do folículo foi maior ( $P < 0,05$ ) no D9, quando os animais receberam a segunda dose de GnRH na submucosa da vulva em comparação com a solução salina administrada por via intramuscular ( $13,8 \text{ mm} \pm 0,0,5$  vs.  $12,1 \text{ mm} \pm 0,5$ , respectivamente). Em relação ao diâmetro do corpo lúteo no D0 e D7, os valores médios foram similares entre os grupos, com valores variando de  $19,7 \text{ mm} \pm 0,2$  a  $23,7 \text{ mm} \pm 1,3$  (Tabela 2).

No entanto, o grupo controle apresentou maior tempo para a ovulação do que os demais grupos de tratamento ( $P < 0,05$ ), sem diferença significativa entre as médias obtidas nos grupos IM e SV (Tabela 3). A área sob a curva de LH (ASC-LH) foi maior ( $P < 0,05$ ) no grupo submucosa da vulva em comparação com os grupos que receberam GnRH ou solução salina por via intramuscular (Tabela 3). Contudo, considerando os grupos categorizados como novilha, vacas com  $<120$  dias e  $\geq 120$  dias em lactação, os resultados não diferiram entre si para o tempo decorrido até a ovulação nem para a área sob a curva de LH (Tabela 3).

O número de animais que se tornaram prenhes, a partir do número de animais inseminados, dentro de cada grupo estão sumarizados na Tabela 3. A taxa de concepção foi maior no grupo que recebeu o GnRH por via intramuscular (83,34%), seguido pelo grupo controle (50%), sendo que no grupo submucosa da vulva a porcentagem foi de 16,67%.

## **4 Discussão**

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar a viabilidade da aplicação de meia dose de acetato de buserelina, administrado na submucosa da vulva, para indução de ovulação em rebanho leiteiro, utilizando como base o protocolo “Ovsynch” modificado. De nosso conhecimento, este é o primeiro estudo utilizando a via vulvar e uma dose reduzida de GnRH em protocolo de sincronização de cio em bovinos, bem como a comprovação de sua eficácia na liberação de LH endógeno, indução de ovulação e tempo à ovulação, comparáveis com os resultados obtidos, quando se administrou o produto, conforme indicado pelo fabricante. Contudo, a hipótese inicial de que a referida via e dose aumentaria os níveis de LH circulantes, refletindo em maior diâmetro folicular e do corpo lúteo, bem como elevaria as taxas de ovulação e de prenhez não se confirmou. Porém, não influenciou negativamente nenhum desses parâmetros analisados, exceção para a taxa de concepção, a qual foi superior no grupo de animais que receberam o GnRH por via sistêmica e, foi inesperada.

Assim, nem a via SV ou a metade da dose de GnRH alteraram de forma significativa a concentração de LH sérico, em todos os momentos avaliados, comparativamente à via intramuscular, enfatizando que o pico da concentração de LH pode ter ocorrido além do M120 no grupo SV. Interessante que, a concentração total de LH, ao longo do tempo estabelecido, foi maior no grupo SV do que no IM, com reflexo na área sob a curva de LH. Entretanto, parece improvável que o GnRH administrado na SV seja absorvido de modo diferente da via subcutânea (SC), apesar de nossos resultados estarem em desacordo com o relato de Conn et al. (1986), os quais afirmaram que através da via SC a liberação de LH é mais lenta e que, ainda, doses mais elevadas são necessárias para a obtenção de efeitos comparáveis com a via intramuscular. Os dados referentes à concentração de LH no grupo SV sugerem que, talvez, o fundamental para que ocorra a ovulação seja o LH produzido ao longo do tempo (até M120) do que o pico do mesmo, mas, a razão de uma maior concentração de LH total obtida no grupo SV, a princípio, não parece estar implicada com alguma ação localizada, embora receptores para o GnRH



tenham sido descritos no folículo ovariano (Ramakrishnappa et al., 2003). O papel dos mesmos ainda não foi elucidado, porém, seria altamente especulativo referir sua interação com o GnRH com finalidade de síntese de LH localmente.

Entretanto, estudos utilizando a via intrauterina como alternativa à intramuscular demonstraram que as concentrações de LH permaneceram em níveis basais e, portanto, foram significativamente menores nos animais que receberam a gonadorelina instilada no útero do que naqueles que receberam a mesma dose via intramuscular, o mesmo sendo observado para a área sob a curva de LH (Bas et al., 2012; Bas et al., 2014). Segundo os autores, a redução das concentrações circulantes de LH foram resultantes da baixa absorção do GnRH através da parede uterina (Bas et al., 2012) e, mesmo com a adição de glicerol (Bas et al., 2014), não foi possível aumentar a absorção do hormônio, sugerindo que esse possa ter refluído pela cérvix, ou apresentado instabilidade no lúmen uterino ou, ainda, ter sofrido degradação enzimática durante a passagem através da parede uterina.

Da mesma forma, quando a gonadorelina foi administrada por via intravaginal, menor concentração de LH e área sob a curva foi observada em comparação com a mesma dose de GnRH aplicada por via intramuscular. Adicionalmente, a via intravaginal não foi eficiente para induzir pico de LH, o qual só ocorreu, quando o ácido cítrico foi adicionado a gonaderelina ou a buserelina (Wijma et al., 2017). A passagem limitada dos análogos pelas junções intercelulares do epitélio presentes na mucosa vaginal, a degradação do fármaco pelas enzimas proteolíticas antes da absorção ou o refluxo pela vagina parecem ser os principais fatores que explicam a menor resposta da via intravaginal ao tratamento (Wijma et al., 2017). A adição do ácido cítrico pode ter facilitado o transporte do GnRH através do epitélio vaginal, uma vez que, ao quelar o  $\text{Ca}^+$  há um afrouxamento das junções entre as células e, ao reduzir o pH, pode resultar em alterações da membrana e da molécula do hormônio, facilitando a absorção destas moléculas hidrofílicas (Wijma et al., 2017).

Quanto à progesterona, não houve diferença entre os grupos de tratamento para os momentos de colheita. Após as duas administrações de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , houve regressão completa do CL em todos os animais, antes do momento da segunda dose de GnRH, provavelmente em decorrência da modificação incluída no protocolo “Ovsynch” (Wijma et al., 2017). As concentrações séricas foram inferiores a 1 ng/ml em todos os grupos. Bas et al. (2012, 2014) observaram a mesma queda dos níveis de progesterona antes da administração da segunda dose de GnRH. Está bem definido que o pico de LH somente ocorrerá se os níveis de progesterona, no momento da indução da ovulação, forem inferiores a 1 ng/mL (Giordano et al., 2012a; Lima et al., 2013, Pulley et al., 2015). Pesquisadores sugeriram que altas concentrações de progesterona em protocolos utilizando o GnRH poderiam prejudicar a liberação de LH, em vacas lactantes (Giordano et al., 2012a). O mesmo foi relatado em vacas e novilhas de corte com o uso de GnRH em protocolos hormonais (Colazo et al., 2009; Dias et al., 2010).

O diâmetro do folículo nos animais do grupo SV foi superior ao grupo controle, no momento da administração de GnRH-2, o que de fato resultou em ovulação mais precoce no grupo SV e IM. Além disso, todos os animais possuíam um folículo dominante (FD) no momento da administração do GnRH-2 o mesmo observado por Galvão et al. (2010). A presença de um folículo dominante que expresse receptores de LH nas células da granulosa no momento da segunda dose de GnRH é imprescindível para que ocorra ovulação quando houver pico de LH (Giordano et al., 2012b).

Em relação ao corpo lúteo, não foi observada diferença significativa entre os grupos no momento da primeira aplicação de GnRH e  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Ao realizar o exame ultrassonográfico no dia da aplicação de GnRH-2, não foi observado mais o CL funcional, confirmado pela baixa concentração sérica de progesterona em todos os grupos de tratamento. Tal queda nos níveis de progesterona era esperada, devido às duas aplicações de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  no D7 e D8. Para avaliar a eficácia do GnRH é necessário que ocorra um pico de LH, o desaparecimento do folículo dominante e a formação de um corpo lúteo

acessório (Giordano et al., 2012b). Além disso, o tamanho e o estado funcional do folículo dominante no momento da administração de GnRH e a fase do ciclo estral, podem ser determinantes na resposta ao tratamento (Atkins et al., 2008; Colazo et al., 2008), como constatado em nosso experimento.

Em nosso estudo o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório foi acompanhado até o seu desaparecimento durante o período de 60 horas, com início após a administração da segunda dose de GnRH. Segundo Pursley et al. (1995) e Galvão e Santos (2010), ao administrar GnRH exógeno, por via intramuscular, o pico de LH deve ocorrer em até duas horas, seguido pela ovulação de 24 a 32 horas, com a resposta ovulatória variando de 75% a 92%. Os animais do grupo submucosa da vulva apresentaram tempo à ovulação e taxa de ovulação semelhante ao grupo intramuscular, o mesmo ocorrendo no grupo controle para o número de animais que ovularam, apesar do LH circulante mais baixo, exceto para o tempo decorrido até a ovulação, o qual foi superior em comparação com os grupos SV e IM.

Bas et al. (2012 e 2014) reportaram que alguns animais do grupo controle ovularam tardiamente, entretanto, a taxa e tempo de ovulação foram menores nos grupos tratados com GnRH intramuscular e intrauterino, considerando as mesmas 60 horas de monitoramento. Esses autores sugeriram que o momento do pico de LH no grupo controle, ocorreu 4 horas após o período de monitoramento, suspeitando que as ovulações tenham ocorrido de maneira espontânea. Como relatado por Martins et al. (2011) o intervalo entre a administração de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e a ovulação, sem a administração de GnRH, variou de 87 a 123 horas, em vacas holandesas. Esses autores hipotetizaram que a ovulação de vacas do grupo controle pode ter ocorrido em resposta a  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Outros estudos também indicaram a ação da  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , secretada pelo folículo pré-ovulatório, diretamente na ovulação (Murdoch et al., 1993), a qual atuaria por um mecanismo independente da luteólise, em vacas e novilhas (Pfeifer et al., 2009). Em nosso estudo, acreditamos que as ovulações no grupo controle ocorreram de forma espontânea, por isso, mais tardiamente, de maneira fisiológica, não descartando possível efeito da  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

Os animais foram inseminados e ao realizar o exame ultrassonográfico 34 dias após o GnRH-2, observamos maior número de animais prenhes no grupo IM, seguido pelo grupo CN e, por último, o grupo VS. Nesse estudo, a elevada porcentagem de animais prenhes no grupo IM não foi inesperada, contudo, a menor taxa no grupo submucosa, além de não ser esperada, foi intrigante, pois nenhuma diferença foi detectada entre tais grupos para todas as características analisadas. Porém, outro experimento utilizando o GnRH e com alterações metodológicas, incluindo número amostral mais elevado, em fase de conclusão, poderá trazer contribuições significativas para validar o presente protocolo de sincronização de cios em gado de leite.

Com base no exposto, concluímos que a administração de GnRH na submucosa da vulva foi tão efetiva quanto a via indicada pelo fabricante, evidenciada pelas concentrações de LH, ASC-LH, tempo de ovulação e taxa de ovulação. Da mesma forma, meia dose de GnRH pode ser considerada uma alternativa eficiente para induzir a ovulação em protocolos de sincronização de estro, no entanto, outras investigações são necessárias na tentativa de elucidar o modo de absorção do GnRH na submucosa da vulva, bem como para aumentar a taxa de concepção.

### **Agradecimentos**

Nossos agradecimentos a Estância Franco e sua equipe, que auxiliaram com o manejo dos animais durante o trabalho de campo do estudo. Agradecemos, também, ao Professor Adjunto Guilherme de Paula Nogueira e sua equipe pela assistência nas análises hormonais, ao Professor Dr. Yuri Tani Utsonomya pela ajuda com as análises estatísticas. Por fim, agradecemos ao Laboratório Biogénesis Bagó pela doação dos hormônios.

## Referências

- Atkins, J.A., Busch, D.C., Bader, J.F., Keisler, D.H., Patterson, D.J., Lucy, M.C., Atkins, J.A., Busch, D.C., Bader, J.F., Keisler, D.H., Patterson, D.J., Lucy, M.C., Smith, M.F., 2008. Gonadotropin-releasing hormone-induced ovulation and luteinizing hormone release in beef heifers : Effect of day of the cycle The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide Web at : Gonadotr 83–93. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0277>
- Bas, S., Maquivar, M.G., Coutinho, M.A., Day, M.L., Daglio, M.C., Harguindeguy, S., Titler, M., Schuenemann, G.M., 2014. Effect of intrauterine administration of gonadotropin releasing hormone with glycerol on serum LH concentrations in lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 145, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.12.017>
- Bas, S., Pinto, C.G., Day, M.L., Schuenemann, G.M., 2012. Effect of intrauterine administration of gonadotropin releasing hormone on serum LH concentrations in lactating dairy cows. *Theriogenology* 78, 1390–1397. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.020>
- Bolt, D. J., Scott V., Kiracofe, G.H., 1990. Plasma LH and FSH after estradiol , norgestomet and Gn-RH treatment in ovariectomized beef heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 23, 263–271. [https://doi.org/DOI: 10.1016/0378-4320\(90\)90040-M](https://doi.org/DOI: 10.1016/0378-4320(90)90040-M)
- Bolt, D.J., Rollins, R., 1983. Development and Application of Radioimmunoassay for Bovine Follicle-Stimulating Hormone. *J. Anim. Sci.* 56. <https://doi.org/https://doi.org/10.2527/jas1983.561146x>
- Chebel, R.C., Santos, J.E.P., Cerri, R.L.A., Rutigliano, H.M., Bruno, R.G.S., 2006. Reproduction in Dairy Cows Following Progesterone Insert Presynchronization and Resynchronization Protocols. *J. Dairy Sci.* 89, 4205–4219. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72466-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72466-3)
- Chenault J.R, kratzer D.D, RZEPKOWSKY R.A, G.M., 1990. LH and FSH Response of Holstein Heifers to Fetirelin Acetate, Gonadorelin and

- Buserelin. *Theriogenology* 84, 81–98.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0093-691X\(90\)90579-I](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0093-691X(90)90579-I)
- Colazo, M.G., Kastelic, J.P., Davis, H., Rutledge, M.D., Martinez, M.F., Small, J.A., Mapletoft, R.J., 2008. Effects of plasma progesterone concentrations on LH release and ovulation in beef cattle given GnRH & 34, 109–117.  
<https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2006.11.004>
- Colazo, M.G., Ree, T.O., Emmanuel, D.G. V, Ambrose, D.J., 2009. Plasma luteinizing hormone concentrations in cows given repeated treatments or three different doses of gonadotropin releasing hormone 71, 984–992.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.11.002>
- Conn, P.M., Staley, D., Harris, C., William, V., Gorospe, W.C., Mcardle, C.A., William, R., Hansen, J., 1986. Mechanism of action of gonadotropin releasing hormone. *Ann. Rev.Physiol* 48, 495–513.
- Dias, F.C.F., Colazo, M.G., Kastelic, J.P., Mapletoft, R.J., Adams, G.P., Singh, J., 2010. Progesterone concentration , estradiol pretreatment , and dose of gonadotropin-releasing hormone affect gonadotropin-releasing hormone-mediated luteinizing hormone release in beef heifers. *DAE* 39, 155–162.  
<https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2010.04.002>
- Donnez, J., Nisolle-Pochet, M., Clerckx-Braun, F., Sandow, J., Casanas-Roux, F., 1989. Administration of nasal Buserelin as compared with subcutaneous Buserelin implant for endometriosis. *Fertil. Steril.* 52, 27–30.  
[https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)60783-5](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)60783-5)
- Ferguson, J.O., Galligan, D.T., Thomsen, N., 1994. Principal Descriptors of Body Condition Score in Holstein Cows. *J. Dairy Sci.* 77, 2695–2703.  
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77212-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77212-X)
- Fink G, P.D., 1979. Neuroendocrine Control of Gonadotrophin Secretion. *Br. Med. Bull.* 35, 155–160. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1994.tb00816.x>
- Galvão K.N., Santos, J.E.P., 2010. Factors Affecting Synchronization and Conception Rate after the Ovsynch Protocol in Lactating Holstein Cows. *Reprod. Domest. Anim.* 446, 439–446. <https://doi.org/10.1111/j.1439->

0531.2008.01220.x

- Giordano, J.O., Fricke, P.M., Guenther, J.N., Jr, G.L., Herlihy, M.M., Nascimento, A.B., Wiltbank, M.C., 2012a. Effect of progesterone on magnitude of the luteinizing hormone surge induced by two different doses of gonadotropin-releasing hormone in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95, 3781–3793. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5155>
- Giordano, J.O., Wiltbank, M.C., Guenther, J.N., Pawlisch, R., Bas, S., Cunha, A.P., Fricke, P.M., 2012b. Increased fertility in lactating dairy cows resynchronized with Double-Ovsynch compared with Ovsynch initiated 32 d after timed artificial insemination. *J. Dairy Sci.* 95, 639–653. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4418>
- Gioso, M.M., Costa, E.P., Fernandes, C.A.C., Paula, T.A.R., Guimarães, J.D., 2005. Angioarquitetura venosa do órgão genital da fêmea bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 57, 715–719. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352005000600001>
- Hussain, A., Ahsan, F., 2005. The vagina as a route for systemic drug delivery 103, 301–313. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.11.034>
- Ivanov, A.I., Nusrat, A., Parkos, C.A., 2005. Endocytosis of the apical junctional complex : mechanisms and possible roles in regulation of epithelial barriers 356–365. <https://doi.org/10.1002/bies.20203>
- Lamb, G.C., Dahlen, C.R., Larson, J.E., Marquezini, G., Stevenson, J.S., Lamb, G.C., Dahlen, C.R., Larson, J.E., Marquezini, G., Stevenson, J.S., 2010. Control of the estrous cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle : A review 1. *J. Anim. Sci.* 88, 181–192. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2349>
- Lima, F.S., Ribeiro, E.S., Bisinotto R.S., Greco, L.F., Martínez, N., Amstalden, M., Thatcher, W.W., Santos, J.E.P., 2013. Hormonal manipulations in the 5-day timed artificial insemination protocol to optimize estrous cycle synchrony and fertility in dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 96, 7054–7065. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7093>
- Macmillan, K. L., Peterson, A.J., 1993. A new intravaginal progesterone

- releasing device for cattle ( CIDR-B ) for oestrous synchronisation ,  
increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anoestrus.  
*Anim. Reprod. Sci.* 33, 1–25. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-4320\(93\)90104-Y](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-4320(93)90104-Y)
- Macmillan, K.L., Taufan, V.K., Barnes, D.R., Day, A.M., 1991. Plasma progesterone concentrations in heifers and cows treated with a new intravaginal device. *Anim. Reprod. Sci.* 26, 25–40. <https://doi.org/https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378432091900636>
- Martins, J.P.N., Policelli, R.K., Pursley, J.R., 2011. Luteolytic effects of cloprostenol sodium in lactating dairy cows treated with G6G / Ovsynch. *J. Dairy Sci.* 94, 2806–2814. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3650>
- Moreira F., Orlandi, C., Risco A., Mattos, R., Lopes, F., Thatcher, W.W., 2001. Effects of Presynchronization and Bovine Somatotropin on Pregnancy Rates to a Timed Artificial Insemination Protocol in Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 84, 1646–1659. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74600-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74600-0)
- Murdoch, W.J., Hansen, L.A., M., 1993. A Review - Role of Eicosanoids in Vertebrate Ovulation. *Prostaglandins* 46, 85–115.
- Nawito M., E.S. and D.S., 1977. Release of lutropin (lh) and follitropin (fsh) in cattle after administration. *Theriogenology* 7, 277–284. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0093-691X\(77\)90256-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0093-691X(77)90256-4)
- Page, R.B., 2006. Anatomy of the hypothalamo-hypophysial complex. *Knobil Neill's Physiol. Reprod.* 1309–1413. <https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50032-4>
- Peters, A.R., 2005. Veterinary clinical application of GnRH — questions of efficacy & 88, 155–167. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.05.008>
- Pfeifer, L.F.M., Siqueira, L.G., Mapletoft, R.J., Kastelic, J.P., Adams, G.P., Colazo, M.G., Singh, J., 2009. Effects of exogenous progesterone and cloprostenol on ovarian follicular development and first ovulation in prepubertal heifers. *Theriogenology* 72, 1054–1064.



- <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.06.022>
- Picard-hagen, N., Lhermie, G., Florentin, S., Merle, D., Frein, P., Gayrard, V., 2015. Theriogenology Effect of gonadorelin , lecirelin , and buserelin on LH surge , ovulation , and progesterone in cattle. *Theriogenology* 84, 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.03.004>
- Pulley, S.L., Keisler, D.H., Stevenson, J.S., 2015. Concentrations of luteinizing hormone and ovulatory responses in dairy cows before timed artificial insemination 1. *Lancet* 1–14. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9473>
- Pursley, J. R., Mee, M.O., Wiltbank, M.C., 1995. Synchronization of Ovulation in Dairy Cows Using PGF2, and GnRH. *Theriogenology* 44, 915–923. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00279-H](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00279-H)
- R Core Team. R, 2018. R Core Team. R A Lang. *Environ. Stat. Comput.* <https://doi.org/10.1017/S0144686X1200058X>
- Raehs, S.C., Sandow, J., Wirth, K, M.H., 1988. The Adjuvant Effect of Bacitracin on Nasal Absorption of Gonadorelin and Buserelin in Rats.
- Ramakrishnappa, N., Giritharan, G., Aalli, M., Madan, P., Rajamahendran, R., 2003. GnRH receptor messenger ribonucleic acid expression in bovine ovary. *Can. J. Anim. Sci.* 83, 823–826. <https://doi.org/10.4141/A03-053>
- Richardson, J.L., Illum, L., 1992. ( D ) Routes of Delivery : Case Studies ( 8 ) The vaginal route of peptide and protein drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 8, 341–366. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1015892630637>
- Rovani, M.T., Barreta, M.H., Ferreira, R., Gasperin, B.G., Antoniazzi, A.Q., Festugatto, R., Oliveira, J.F.C., Gonçalves, P.B.D., 2012. Luteolysis after the intravulvosubmucosal injection of prostaglandin F2ain cattle: Systemic or local mechanism? *Livest. Sci.* 148, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2012.05.007>
- Schneider, F., Tomek, W., Gru, C., 2006. Gonadotropin-releasing hormone ( GnRH ) and its natural analogues : A review 66, 691–709. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.025>
- Souza A.H., Cunha A.P. , Silva E.P.B. , Gumen A., Ayres H., Guenther J.N., W.M.C., 2009. Comparison of gonadorelin products in lactating dairy cows :

- Efficacy based on induction of ovulation of an accessory follicle and circulating luteinizing hormone profiles. *Theriogenology* 72, 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.02.016>
- Souza, A.H., Ayres, H., Ferreira, R.M., Wiltbank, M.C., 2008. A new presynchronization system ( Double-Ovsynch ) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows 70, 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.03.014>
- Wijma, R., Stangaferro, M.L., Masello, M., Elmetwally, M.A., Granados, G.E., Amovilli, F., Giordano, J.O., 2017. Intravaginal instillation of gonadotropin-releasing hormone analogues with an absorption enhancer induced a surge of luteinizing hormone in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100, 7626–7637. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12513>
- Wiltbank, M.C., Pursley, J.R., 2014. The cow as an induced ovulator : Timed AI after synchronization of ovulation. *Theriogenology* 81, 170–185. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.017>

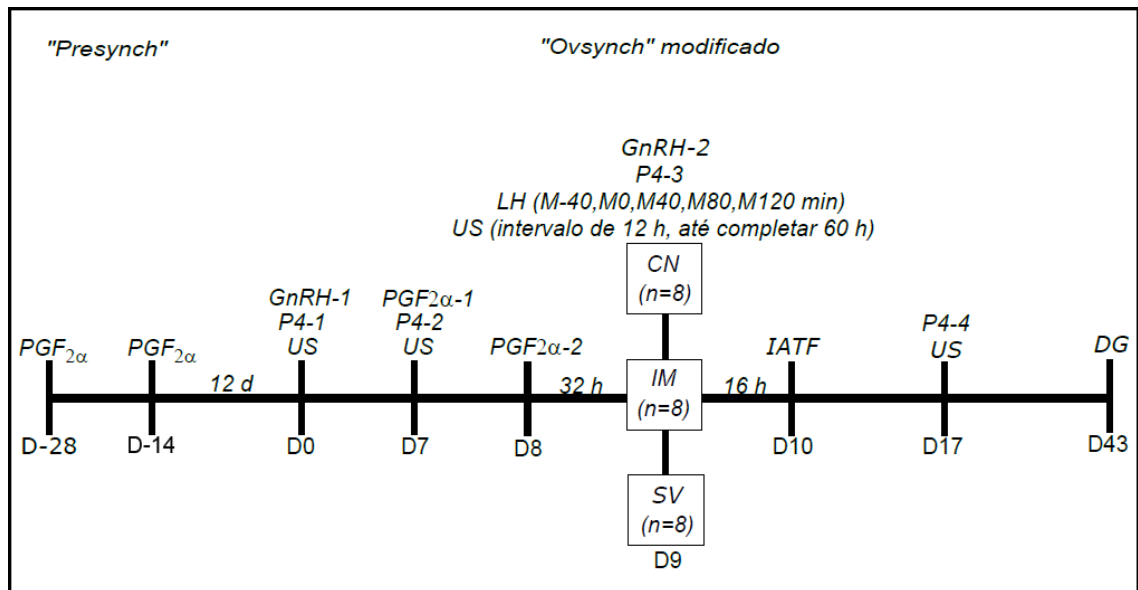


Figura 1. Diagrama do delineamento experimental. Os animais foram pré-sincronizados com duas injeções de D-cloprostenol ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) no D -28 e D -14 ("Presynch"). Após 12 dias, no D0 do "Ovsynch", os animais foram examinados por meio de ultrassom (US) e aqueles com FL  $\geq 10$  mm e CL  $\geq 15$  mm de diâmetro receberam a primeira dose de acetato de buserelina (GnRH-1), bem como tiveram a primeira amostra de sangue colhida (progesterona ;P4-1). No D7, após reavaliação pelo US foi colhida a segunda amostra de sangue (P4-2), seguida da administração de  $\text{PGF}_{2\alpha-1}$ . A segunda dose de  $\text{PGF}_{2\alpha-2}$  foi administrada no D8. No D9 (32 horas após a  $\text{PGF}_{2\alpha-2}$ ) os animais foram aleatoriamente subdivididos em três grupos: CN ( $n=8$ ), 2,5 ml de cloreto de sódio 0,9%, im; IM ( $n=8$ ) 2,5 ml (10,5  $\mu\text{g}$ ) de acetato de buserelina (GnRH-2); SV ( $n=8$ ) 1,25 ml (5,25  $\mu\text{g}$ ) de acetato de buserelina na submucosa da vulva (GnRH-2). As amostras de sangue para determinação da concentração sérica de LH foram colhidas em cinco momentos, expressos em minutos, (M-40, M0, M40, M80 e M120). No M0, foi feita outra colheita de sangue para dosagem de progesterona (P4-3), seguida de exame ultrassonográfico para acompanhamento da ovulação com intervalo de 12 horas, até completar 60 horas. No D10, 16 horas após a administração do GnRH-2 os animais foram inseminados, sendo que as ovulações foram confirmadas no D17, seguida da última colheita de progesterona (P4-4). No D43, o diagnóstico de gestação foi realizado por meio de US.

**Tabela 1.** Distribuição dos animais de acordo com o grupo de tratamento, categoria animal, idade, número de partos, peso, escore de condição corporal e dias em lactação, expressos como média  $\pm$  EPM.

|              | Grupos de Tratamento |               |                    |               |                         |               |
|--------------|----------------------|---------------|--------------------|---------------|-------------------------|---------------|
|              | Controle (CN)        |               | Intramuscular (IM) |               | Submucosa da Vulva (SV) |               |
|              | Vaca                 | Novilha       | Vaca               | Novilha       | Vaca                    | Novilha       |
| n            | 4                    | 4             | 4                  | 4             | 5                       | 3             |
| Idade        | 6,8 $\pm$ 1,7        | 2,8 $\pm$ 1,0 | 6,5 $\pm$ 2,4      | 2,3 $\pm$ 0,5 | 5,4 $\pm$ 1,8           | 2,0 $\pm$ 0,0 |
| Nº de partos | 3,3 $\pm$ 1,7        | 0,0 $\pm$ 0,0 | 3,0 $\pm$ 1,4      | 0,0 $\pm$ 0,0 | 2,8 $\pm$ 1,8           | 0 $\pm$ 0,0   |
| Peso         | 525 $\pm$ 29         | 475 $\pm$ 29  | 538 $\pm$ 25       | 365 $\pm$ 13  | 510 $\pm$ 22            | 350 $\pm$ 0   |
| ECC          | 3,0 $\pm$ 0,0        | 3,0 $\pm$ 0,0 | 3,3 $\pm$ 0,3      | 3,1 $\pm$ 0,3 | 2,7 $\pm$ 0,3           | 3,0 $\pm$ 0,0 |
| DEL          | 127,5 $\pm$ 66,5     | 0,0 $\pm$ 0,0 | 142,5 $\pm$ 75,0   | 0,0 $\pm$ 0,0 | 96 $\pm$ 71,6           | 0,0 $\pm$ 0,0 |

Categoria animal (vaca ou novilha), Idade (anos); Nº de partos (0-5); Peso (kg); ECC; escore de condição corporal (1-5); DEL; dias em lactação (dias).

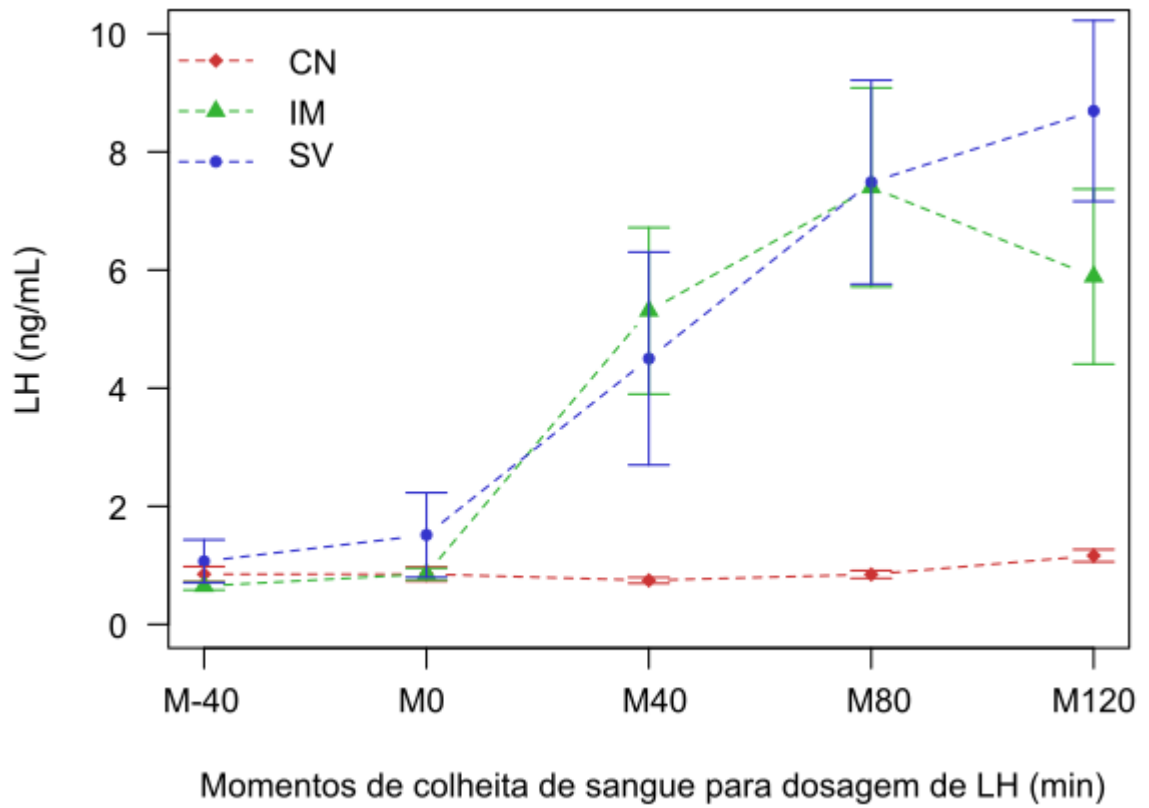


Figura 2. Concentração sérica de LH (média  $\pm$  EPM) relativa ao momento de colheita de sangue (M-40 a M120), no qual o M0 correspondeu à aplicação de GnRH-2. Os animais foram aleatoriamente subdivididos em três grupos: CN ( $n=8$ ), 2,5 ml de cloreto de sódio 0,9%, im; IM ( $n=8$ ) 2,5 ml (10,5  $\mu$ g) de acetato de buserelina; SV ( $n=8$ ) 1,25 ml (5,25  $\mu$ g) de acetato de buserelina na submucosa da vulva.

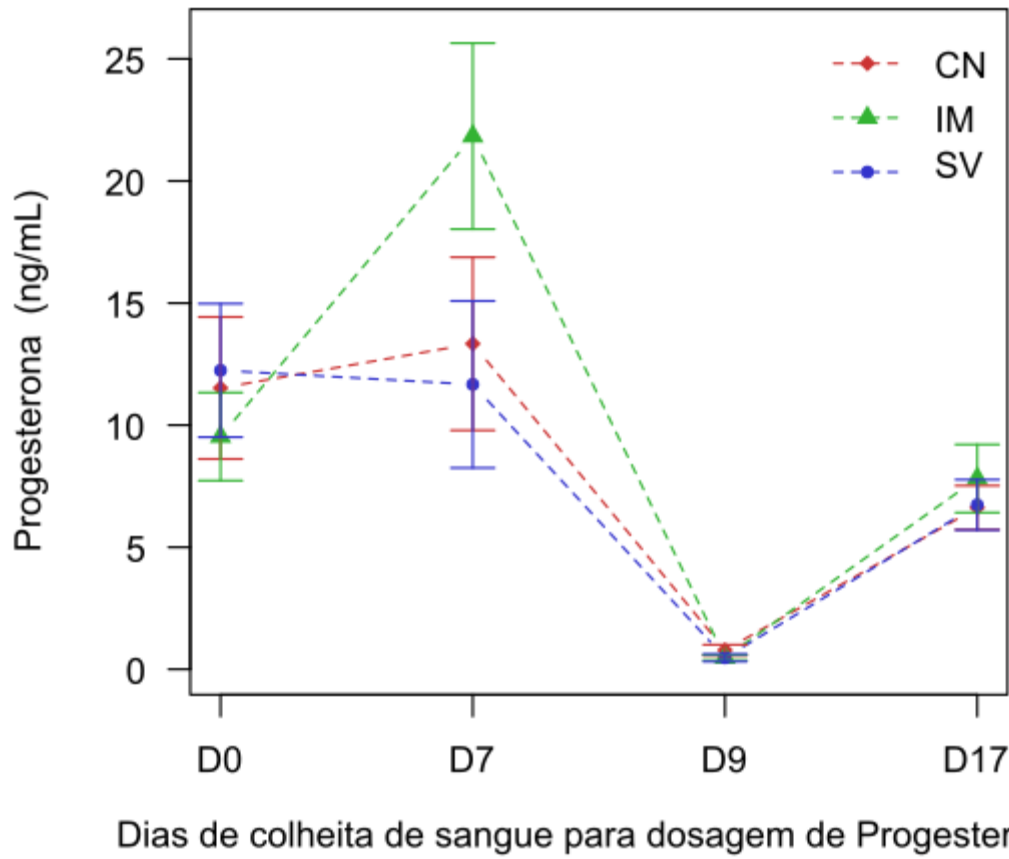


Figura 3. Concentração sérica de progesterona (média  $\pm$  EPM) relativa ao momento de colheita de sangue (D0, D7, D9 e D17). Os animais foram aleatoriamente subdivididos em três grupos: CN ( $n=8$ ), 2,5 ml de cloreto de sódio 0,9% im; IM ( $n=8$ ) 2,5 ml (10,5  $\mu\text{g}$ ) de acetato de buserelina; SV ( $n=8$ ) 1,25 ml (5,25  $\mu\text{g}$ ) de acetato de buserelina na submucosa da vulva.

**Tabela 2.** Diâmetro do folículo (mm) e do corpo lúteo (mm) dentro do protocolo “Ovsynch” segundo o grupo de tratamento (média ± EPM)

| Estrutura ovariana | Dia                       | CN                       | IM                       | SV                      |
|--------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Folículo           | D0 (GnRH-1)               | 13,2 ± 0,5 <sup>a</sup>  | 14,4 ± 1,1 <sup>a</sup>  | 12,3 ± 0,6 <sup>a</sup> |
|                    | D7 (PGF <sub>2α</sub> -1) | 13,5 ± 1,9 <sup>a</sup>  | 16,2 ± 3,9 <sup>a</sup>  | 13,4 ± 1,3 <sup>a</sup> |
|                    | D9 (GnRH-2)               | 12,1 ± 0,5 <sup>b</sup>  | 12,8 ± 0,3 <sup>ab</sup> | 13,8 ± 0,5 <sup>a</sup> |
| Corpo Lúteo        | D0 (GnRH-1)               | 2,11 ± 0,19 <sup>a</sup> | 19,7 ± 0,20 <sup>a</sup> | 20,1 ± 1,4 <sup>a</sup> |
|                    | D7 (PGF <sub>2α</sub> -1) | 2,07 ± 0,14 <sup>a</sup> | 23,7 ± 0,13 <sup>a</sup> | 20,4 ± 0,9 <sup>a</sup> |

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey,  $P < 0,05$ . CN: grupo controle; IM: grupo intramuscular; SV: submucosa da vulva. D0 (GnRH-1), D7(PGF<sub>2α</sub>) e D9(GnRH-2).

**Tabela 3.** Número de animais apresentando ovulação e prenhez, bem como o tempo decorrido até a ovulação e a área sob a curva de LH, conforme o grupo de tratamento e os dias em lactação (média  $\pm$  EPM)

| Variável   | Grupo           | Ovulação<br>(n/n) | Prenhez<br>(n/n) | Tempo de<br>Ovulação(h)     | ASC-LH<br>(log <sub>10</sub> ) |
|------------|-----------------|-------------------|------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| Tratamento | CN              | 6/8               | 3/6              | 46,0 $\pm$ 3,7 <sup>a</sup> | 0,53 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>   |
|            | IM              | 6/8               | 5/6              | 32,0 $\pm$ 4,0 <sup>b</sup> | 0,86 $\pm$ 0,30 <sup>b</sup>   |
|            | SV              | 6/8               | 1/6              | 36,0 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup> | 1,15 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>   |
| DEL        | Novilha         | -                 | -                | 40,5 $\pm$ 3,2              | 0,83 $\pm$ 0,12                |
|            | < 120 dias      | -                 | -                | 38,4 $\pm$ 2,4              | 0,88 $\pm$ 0,14                |
|            | $\geq$ 120 dias | -                 | -                | 33,6 $\pm$ 5,9              | 0,85 $\pm$ 0,13                |

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey,  $P < 0,05$ . Dias em lactação; DEL < 120 dias: Vacas com menos de 120 dias em lactação; DEL  $\geq$  120 dias: Vacas com 120 ou mais dias de lactação. ASC-LH: área sob a curva de LH.



**Tabela Suplementar S1.** Concentração sérica (média  $\pm$  EPM) de LH (ng/ml), conforme o momento de colheita de sangue dentro do protocolo “Ovsynch”

| Momentos | Grupos             |                    |                    |
|----------|--------------------|--------------------|--------------------|
|          | CN                 | IM                 | SV                 |
| M-40     | 0,85 $\pm$ 0,13 Bb | 0,65 $\pm$ 0,07 Ab | 1,07 $\pm$ 0,36 Ab |
| M0       | 0,85 $\pm$ 0,12 Bb | 0,85 $\pm$ 0,10 Ab | 1,52 $\pm$ 0,72 Ab |
| M40      | 0,75 $\pm$ 0,05 Ba | 5,31 $\pm$ 1,41 Aa | 4,50 $\pm$ 1,80 Aa |
| M80      | 0,85 $\pm$ 0,06 Ba | 7,40 $\pm$ 1,68 Aa | 7,49 $\pm$ 1,73 Aa |
| M120     | 1,16 $\pm$ 0,10 Ba | 5,89 $\pm$ 1,48 Aa | 8,69 $\pm$ 1,53 Aa |

<sup>AB</sup> Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey,  $P < 0,05$ .

<sup>ab</sup> Médias seguidas de letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey,  $P < 0,05$ . CN: grupo controle. IM: grupo intramuscular; SV: submucosa da vulva. M-40, M0, M40, M80, M120 correspondem aos momentos de colheita de sangue para dosagem de LH (ng/ml), em minutos, sendo M-40 antes e os demais momentos após a administração do GnRH-2.

**Tabela Suplementar S2.** Concentração sérica (média  $\pm$  EPM) de progesterona (ng/ml), conforme o dia de colheita de sangue dentro do protocolo “Ovsynch” e após sete dias da IA

| Dias  | Grupos              |                    |                     |
|---|---------------------|--------------------|---------------------|
|   | CN                  | IM                 | SV                  |
| D0 (GnRH-1)                                 | 11,52 $\pm$ 2,91 ab | 9,53 $\pm$ 1,80 ab | 12,24 $\pm$ 2,73 ab |
| D7 (PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> -1) | 13,33 $\pm$ 3,55 a  | 21,84 $\pm$ 3,81 a | 11,67 $\pm$ 3,42 a  |
| D9 (GnRH-2)                                 | 0,79 $\pm$ 0,22 c   | 0,48 $\pm$ 0,11 c  | 0,47 $\pm$ 0,15 c   |
| D17   | 6,62 $\pm$ 0,90 b   | 7,81 $\pm$ 1,40 b  | 6,74 $\pm$ 1,03 b   |

<sup>ab</sup> Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey,  $P < 0,05$ . CN: grupo controle; IM: grupo intramuscular; SV: submucosa da vulva. D0, D7, D9 e D17 correspondem aos dias de colheita de sangue de progesterona (ng/ml).