

EFEITO DE TRÊS DIFERENTES PRINCÍPIOS ATIVOS ANÁLOGOS AO GnRH NA RESPOSTA REPRODUTIVA DE VACAS LEITEIRAS SUBMETIDAS A IATF

OLIVEIRA, Valdinei Caetano¹
FERREIRA, Emanuel Binotto²
BONATO, Francieli Gesleine Capote³
BONATO, Denis Vinicius⁴

RESUMO

O estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes análogos sintéticos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) sobre o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras. Um total de 429 vacas da raça Holandesa, com produção acima 40 kg/dia, foram pré-sincronizadas e submetidas a um protocolo de sincronização de ovulação para inseminação artificial em tempo fixo (IATF). No dia inicial do protocolo (D0) as vacas foram divididas em três grupos experimentais para avaliar diferentes análogos ao GnRH. As fêmeas do primeiro grupo (G1, n=145) foram submetidas a um protocolo de sincronização utilizando o análogo lecirelina, o segundo (G2, n=141) a gonadorelina e o terceiro (G3= 143) a buserelina. Em todas as vacas do experimento, no dia inicial (D0) e no sétimo dia do protocolo (D7) foi realizada a avaliação ultrassonográfica ovariana para contagem de corpos lúteos (CLs) presentes nos ovários. Variáveis numéricas foram comparadas entre os grupos pelo teste Kruskall-Wallis e categóricas pelo teste Qui-Quadrado. A taxa de concepção foi comparada utilizando o teste Exato de Fisher. A taxa de concepção aos 30 dias após a IATF do G1 foi de 43,4% (63/145), do G2 32,6% (46/141) e do G3 de 40,55% (58/143), não havendo diferença entre os grupos. Todos os fármacos foram eficientes para aumentar o número de CLs do D0 para o D7, contudo a média de CLs quantificados no D7 foi menor para os animais do G2. A gonadorelina resultou em menor taxa de ovulação avaliada pelo número de corpos lúteos comparados no D7.

PALAVRAS-CHAVE: bovinocultura de leite. buserelina. gonadorelina. inseminação artificial em tempo fixo. lecirelina.

EFFECT OF THREE DIFFERENT GnRH-ANALOGOUS ACTIVE INGREDIENTS ON THE REPRODUCTIVE RESPONSE OF DAIRY COWS SUBJECTED TO TIMED ARTIFICIAL INSEMINATION (TAI)

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of different synthetic analogues of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) on the reproductive performance of dairy cows. A total of 429 Holstein cows, producing more than 40 kg/day, were pre-synchronized and subjected to an ovulation synchronization protocol for timed artificial insemination (TAI). On the first day of the protocol (D0), cows were allocated into three experimental groups to evaluate different GnRH analogues. Females in the first group (G1, n = 145) were submitted to a synchronization protocol using the analogue lecirelin; the second group (G2, n = 141) received gonadorelin; and the third group (G3, n = 143) received buserelin. In all cows, ovarian ultrasonographic evaluations were performed on the initial day (D0) and on the seventh day of the protocol (D7) to count the number of corpora lutea (CLs) present in the ovaries. Numerical variables were compared among groups using the Kruskal-Wallis test, and categorical variables using the chi-square test. Conception rate was compared using Fisher's exact test. Conception rates at 30 days after TAI were 43.4% (63/145) for G1, 32.6% (46/141) for G2, and 40.55% (58/143) for G3, with no significant differences among groups. All drugs were effective in increasing the number of CLs from D0 to D7; however, the mean number of CLs quantified on D7 was lower in animals from G2. Gonadorelin resulted in a lower ovulation rate, as assessed by the number of corpora lutea observed on D7.

KEYWORDS: dairy cattle. buserelin. gonadorelin. timed artificial insemination. lecirelin.

¹ Médico Veterinário, Mestre em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos. E-mail: valdinei.oliveira.96@edu.unipar.br

² Médico Veterinário, Mestre em Ciência Animal. E-mail: emanuel_binotto@hotmail.com

³ Licenciada em Ciências Biológicas, Mestre em Bioenergia e Doutora em Ciências da Saúde. E-mail: francieli.bonato@edu.unipar.br

⁴ Médico Veterinário, Mestre e Doutor em Ciência Animal, Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos da Universidade Paranaense - UNIPAR. E-mail: denisbonato@prof.unipar.br

1. INTRODUÇÃO

Alcançar um bom desempenho reprodutivo das vacas é um dos maiores desafios encontrados na bovinocultura de leite (BRZOZOWSKI *et al.*, 2018). Diversos estudos foram realizados para entender o motivo de que vacas de alta produção leiteira tem baixo desempenho reprodutivo e, um dos principais motivos descritos, é que a alta taxa metabólica resulta em depuração dos hormônios estrógeno e progesterona (SARTORI *et al.*, 2002; WILTBANK *et al.*, 2012). Neste contexto, Consentini, Wiltbank e Sartori (2021) descrevem que o uso de um protocolo de sincronização de ovulação, em que previamente é realizada uma pré-sincronização, é uma alternativa para melhorar os índices reprodutivos de vacas leiteiras, pois aumenta a produção de progesterona, compensando a fração que é depurada pelo fígado.

No protocolo descrito por Consentini, Wiltbank e Sartori (2021) o uso da pré-sincronização tem como objetivo fazer com que no início do protocolo de sincronização a vaca tenha um corpo lúteo produzindo progesterona, além de ter um folículo com condições de ovular se for administrado GnRH na vaca. Com isso, forma-se um novo corpo lúteo e além do corpo lúteo formado na pré-sincronização, a vaca terá o novo corpo lúteo, que auxiliará na produção de progesterona no momento do desenvolvimento folicular, algo que de acordo com Carvalho *et al.* (2019) melhora a qualidade oocitária.

Contudo, no trabalho de Consentini, Wiltbank e Sartori (2021), os autores não descrevem qual é o melhor análogo sintético de GnRH para ser utilizado em vacas pré-sincronizadas, tendo em vista que, de acordo com Giordano *et al.* (2012), pelo fato de já ter um corpo lúteo produzindo progesterona, isso pode bloquear o pico ovulatório de LH. No mercado atual existem como análogos sintéticos ao GnRH a lecirelina, a gonadorelina e a buserelina para uso em bovinos (ARMENGOL-GELONCH *et al.*, 2017; DE CARVALHO FERNANDES *et al.*, 2021; LEÃO *et al.*, 2024).

Os três análogos de GnRH já foram confrontados no estudo de Picard-Hagen *et al.* (2015), para saber qual induzia o melhor pico ovulatório de LH em animais em estro, sendo identificado que a gonadorelina promovia um pico mais baixo de LH em comparação com os outros análogos. Contudo, o trabalho de Picard-Hagen *et al.* (2015) não foi avaliado em animais na fase progesterônica do ciclo, além disso, outros trabalhos sugerem doses mais altas do que as testadas no referido estudo (KIM *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2024). Neste contexto, a presente pesquisa teve por objetivo comparar o efeito dos três diferentes análogos de GnRH em vacas leiteiras pré-sincronizadas, utilizando as doses mais altas encontradas na literatura para induzir uma ovulação.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PARTICULARIDADES REPRODUTIVAS DE VACAS COM ELEVADA PRODUÇÃO LEITEIRA

Em comparação com vacas de corte, as vacas de aptidão leiteira, apresentam desempenho reprodutivo inferior, tendo maior incidência de problemas reprodutivos como infecções uterinas, cistos ovarianos, falhas de concepção e perdas gestacionais (PETER *et al.*, 2018).

Um aspecto que muda muito entre uma vaca leiteira e uma vaca de corte é o metabolismo, tendo em vista que, na realidade brasileira uma vaca de corte tem apenas o pasto como base da alimentação e sua produção de leite é apenas para alimentação de seu bezerro (BERÇA *et al.*, 2021). Já as vacas de aptidão leiteira, principalmente as criadas em sistema confinado, consomem ração balanceada, com grande proporção de alimentos concentrados e a quantidade de alimento fornecido é ajustada de acordo com o volume de leite produzido (HILLS *et al.*, 2015).

Nesse sentido, as vacas leiteiras possuem alta taxa metabólica e isso leva à maior incidência de doenças metabólicas que afetam o desempenho reprodutivo da vaca (FERGUSON *et al.*, 1994; SANTOS *et al.*, 2022). Além disso, mesmo que a vaca esteja saudável, a alta taxa metabólica acaba catabolizando hormônios reprodutivos esteroides que são produzidos pelo ovário, no caso, o estrógeno (E2) e a progesterona (P4) (CONSENTINI; WILTBANK; SARTORI, 2021). Esse catabolismo faz com que o nível sérico de E2 e P4 seja mais baixo em vacas com alta produção leiteira do que em outras categorias de fêmeas bovinas (SANGSRITAVONG *et al.*, 2002).

Sartori *et al.* (2002) realizaram estudos comparando vacas com alta produção leiteira e novilhas. Nesse estudo, observaram que as vacas possuem folículos maiores que as novilhas, mas com menor concentração sérica de E2. Da mesma forma, os autores identificaram que as vacas possuem CLs maiores, porém o nível sérico de P4 é significativamente inferior. Esse menor nível de E2 comumente faz com que as vacas com elevada produção de leite não demonstrem estro, tenham estros curtos ou com quantidade de E2 insuficiente para induzir uma ovulação, algo que leva a formação de cistos (NORA *et al.*, 2018). Com relação a P4, o menor nível sérico diminui a qualidade do óocito ovulado, aumentando as falhas de concepção, além de aumentar a quantidade de perdas gestacionais (LONERGAN, 2011).

Para reduzir as falhas de concepção, Consentini, Wiltbank e Sartori (2021) indicam o uso do controle farmacológico do ciclo estral, empregando o protocolo denominado de *ESALQ's Fertility Program*, em que antes do protocolo para sincronização da ovulação, é realizado um protocolo de pré-sincronização. De acordo com os autores, a pré-sincronização tem como objetivo induzir uma

ovulação e a emergência de uma nova onda folicular, para que oito ou dez dias depois, inicie-se o protocolo de sincronização de ovulação para a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). No D0, caso a vaca tenha respondido adequadamente ao protocolo de pré-sincronização, apresentará um corpo lúteo (CL) ativo, produzindo progesterona e terá também um folículo dominante que já possui receptores para o hormônio luteinizante (LH).

Desta forma, Consentini, Wiltbank e Sartori (2021) recomendam que no D0 o animal receba uma dose de um análogo de GnRH, com intuito de induzir a ovulação do folículo dominante, formando assim, um novo CL. Além disso, no D0, é inserido por via intravaginal um dispositivo impregnado com P4. Desta forma, com três fontes de P4, ou seja, o CL da pré-sincronização, o CL da sincronização e o dispositivo impregnado com P4, a liberação de P4 aumenta para tentar compensar a quantidade que será catabolizada pelo fígado, possibilitando níveis adequados de P4 na fase de desenvolvimento inicial do folículo para garantir qualidade oocitária (CARVALHO *et al.*, 2019).

2.2 GNRH E SEUS ANÁLOGOS

O hormônio liberador de gonadotrofinas tipo I (GnRH-I), é um decapeptídeo hipotalâmico essencial para o controle reprodutivo (CASTEEL; SINGH, 2023). Esse hormônio é sintetizado por neurônios hipotalâmicos e liberado de forma pulsátil na circulação porta-hipofisária (SCHNEIDER; TOMEK; GRUNDKER, 2006; COLAZO; MAPLETOFT, 2022). Ao se ligar aos seus receptores presentes nos gonadotrofos da adenohipófise, ativa uma série de eventos que culminam na síntese e secreção de gonadotrofinas que modulam a gametogênese e a esteroidogênese (BLISS *et al.*, 2010; PERRETT; MCARDLE, 2013).

Contudo, o GnRH-I possui uma meia-vida curta, de aproximadamente 2 a 4 minutos, devido a sua rápida degradação pela ação das peptidases (ORTMANN; WEISS; DIEDRICH, 2002). Portanto, com o intuito de aumentar a potência e prolongar a sua duração, foram desenvolvidos análogos sintéticos e alguns com alterações na morfologia molecular em comparação ao GnRH endógeno (KUMAR; SHARMA, 2014).

O GnRH e seus análogos são amplamente utilizados na reprodução bovina, com intuito de aumentar a eficiência reprodutiva das fêmeas (COLAZO; MAPLETOFT, 2022). Comercialmente existem três análogos sintéticos ao GnRH aprovados para o uso em bovinos: a gonadorelina, a buserelina e a lecirelina (PICARD-HAGEN *et al.*, 2015). A gonadorelina é a forma sintética semelhante à molécula endógena de GnRH-I, também formada por uma cadeia de 10 aminoácidos (CHENAULTL *et al.*, 1990). Enquanto a buserelina e a lecirelina, são análogos agonistas sintéticos

formados por pequenas modificações em sua morfologia molecular que as tornaram nonapeptídeos (ZAPLETAL; PAVLIK, 2008).

Em comparação a molécula endógena do GnRH, a lecirelina possui a glicina da posição seis de sua cadeia substituída por uma d-terciaria leucina e a da posição dez por uma etilamida (KAYA *et al.*, 2008). Enquanto a buserelina possui uma d-serina na sexta posição e uma etilamida na décima posição da cadeia (PICARD-HAGEN *et al.*, 2015). As substituições das glicinas por d-aminoácidos (isômeros dextrógiros) na posição seis de ambas, permitiram a estabilização da conformação em dobradiça da molécula, tornando-as mais resistentes as peptidases e aumentando a afinidade da molécula ao seu receptor, o que resultou no prolongamento da meia-vida na circulação (PADULA, 2005; HERBERT; TRIGG, 2005). Além disso, as substituições das glicinas da décima posição por alquilaminas, resultaram em análogos nonapeptídicos com maior potência de indução da ovulação (ROMAGNOLI *et al.*, 2009).

2.3 USO DOS ANÁLOGOS DE GNRH NO CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL

Os análogos a prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) foram utilizados inicialmente para induzir a fêmea a entrar em estro, possibilitando a inseminação (LANDAETA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2004). Para que a indução utilizando apenas um fármaco funcione, a vaca deve ter um corpo lúteo (CL) responsável à PGF_{2α}, condição que nem todas as vacas demonstram quando o fármaco é aplicado, sendo ineficiente em muitos casos (GUGSSA; ASHEBIR; YAYNESHET, 2016).

Com o avanço das técnicas de ultrassonografia para avaliação ovariana foi possível compreender melhor a dinâmica ovariana e começaram a ser desenvolvidos protocolos um pouco mais elaborados, em que associado à PGF_{2α} foi introduzido os análogos ao GnRH, no caso a buserelina, gonadorelina e a lecirelina (MIALOT *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2009; ATAMAN *et al.*, 2011; PICARD-HAGEN *et al.*, 2015; BONATO *et al.*, 2022). Esses análogos ao GnRH agem na hipófise anterior fazendo com que ela libere grande quantidade de LH, promovendo o chamado pico ovulatório, responsável por fazer com que folículos com mais de 8,5 mm de diâmetro ovulem e luteinizem, formando assim um CL (PICARD-HAGEN *et al.*, 2015).

Alguns dias após a formação do CL no ovário é possível administrar a PGF_{2α}, promovendo a luteólise e conseguindo induzir o estro para IA (MIALOT *et al.*, 2003). Contudo, o protocolo usando somente GnRH e PGF_{2α} também não é eficiente em todas as vacas, tendo em vista que alguns animais podem estar em anestro e nestes casos, não apresentam folículos com no mínimo 8,5 mm para responderem ao pico de LH, induzido pelo GnRH (EL-TAHAWY; FAHMY, 2011).

Sem folículos com tamanho adequado para responder ao pico de LH a vaca continuará em anestro, demorando mais para ficar gestante, comprometendo os índices reprodutivos e produtivos do rebanho (PETER; VOS; AMBROSE, 2009). Neste sentido, as pesquisas avançaram ao ponto de existirem atualmente protocolos que possibilitam induzir uma ovulação de forma sincronizada, em que é utilizado uma associação de estrógeno e progesterona no dia inicial do protocolo (MONTEIRO *et al.*, 2015).

O estrógeno e a progesterona juntos conseguem garantir a emergência de uma nova onda folicular sincronizada em mais de 70% das vacas, mesmo que estejam em anestro (MADUREIRA *et al.*, 2020). Com isso, e com a administração de outros fármacos no decorrer do protocolo, os animais tendem a ovular ao mesmo tempo, permitindo a inseminação em tempo fixo, dispensando a necessidade de identificação de estro (BÓ; BARUSELLI, 2014; MONTEIRO *et al.*, 2015). Apesar da associação entre E2 e P4 induzir muito bem a ovulação de forma sincronizar, a maior parte das vacas de aptidão leiteira que ovulavam e são inseminadas, não ficam prenhas, obtendo apenas 25 a 30% das vacas com gestação confirmada quando se usa protocolos que iniciam apenas com E2 e P4 (MONTEIRO *et al.*, 2015).

As pesquisas seguiram focadas para obter um protocolo farmacológico que conseguisse induzir a ovulação de forma sincronizada no maior número possível de vacas, mas que alcançasse melhores índices de prenhez para vacas de alta produção leiteira (BONATO *et al.*, 2022). Neste contexto, Consentini, Wiltbank e Sartori (2021) descrevem que o uso de um protocolo, que após uma pré-sincronização, inicia-se com o uso do GnRH é possível obter taxas de concepção acima de 40%.

No trabalho de Consentini, Wiltbank e Sartori (2021), os autores utilizaram como princípio ativo análogo ao GnRH a buserelina. Bonato *et al.* (2022) avaliaram, também em vacas da raça Holandesa e com alta produção de leite, um protocolo utilizando outro análogo do GnRH, no caso a lecirelina e identificaram que 100% das vacas tiveram emergência de onda e ovularam de forma sincronizada. Contudo, o experimento de Bonato *et al.* (2022) foi realizado em um número pequeno de animais e não teve a taxa de concepção como variável avaliada. Além da lecirelina e da buserelina, a gonadorelina também é utilizada na espécie bovina (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Os diferentes análogos de GnRH, ou seja, a lecirelina, a buserelina e a gonadorelina tiveram a eficiência para induzir o pico ovulatório de LH testado no estudo de Picard-Hagen *et al.* (2015), em que os autores aplicaram os três diferentes análogos em novilhas da raça Holandesa que possuíam folículo dominante e dosaram os níveis séricos de LH coletando amostras de sangue a cada uma hora, até totalizar seis horas após a aplicação do GnRH. No estudo de Picard-Hagen *et al.* (2015), os autores identificaram que a lecirelina e a buserelina induziram um pico mais alto de LH em comparação com

a gonadorelina, no entanto, não houve diferença com relação a taxa de ovulações induzidas pelos três diferentes fármacos.

Entretanto, o estudo de Picard-Hagen *et al.* (2015) foi realizado em novilhas não lactantes, sendo importante no atual contexto, a comparação dos diferentes análogos de GnRH em vacas com elevada produção leiteira e que tenham passado por uma pré-sincronização, ou seja, que já tenham um CL ativo e que já estejam na fase progesterônica do ciclo. Neste sentido, é importante a realização de experimentos que comparem, além da taxa de ovulação, a taxa de concepção das vacas com alta produção leiteira quando recebem diferentes princípios ativos de análogos ao GnRH.

3. METODOLOGIA

3.1 AVALIAÇÃO ÉTICA DO USO DOS ANIMAIS EM PESQUISA

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal (CEPEEA) da Universidade Paranaense – UNIPAR, de acordo com o protocolo 40195/2023.

3.2 LOCAL, ANIMAIS E MANEJO

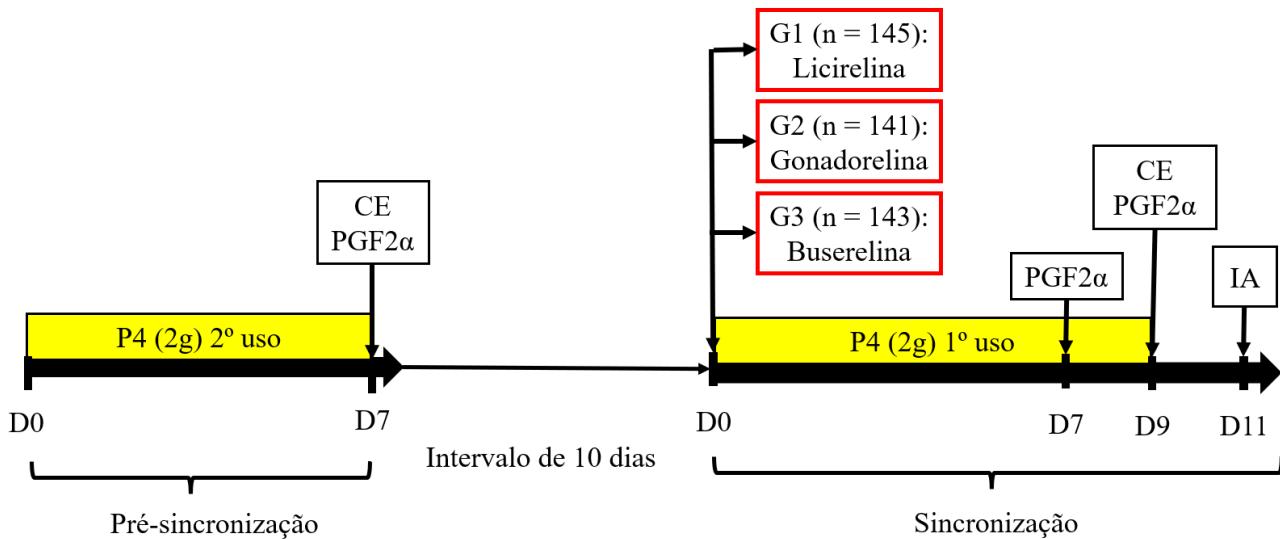
O estudo foi realizado em uma propriedade rural localizada no município de Arapoti, Paraná, Brasil (- 24.156302 de latitude sul, - 49.839884 de longitude oeste). A propriedade possui um rebanho vacas leiteiras criadas em sistema *free stall* que são ordenhadas três vezes por dia e possuem média diária de produção de 37 kg de leite. Um total de 429 vacas da raça Holandesa, multíparas, lactantes e com período pós-parto variando de 30 a 37 dias foram submetidas a um protocolo de pré-sincronização para ficarem na mesma condição ovariana para o protocolo experimental. Após a pré-sincronização as vacas foram divididas em três grupos experimentais de acordo com o análogo sintético de GnRH que iriam receber, como descrito na Figura 1. As fêmeas do primeiro grupo (G1, n=145) foram submetidas a um protocolo de sincronização utilizando a lecirelina no dia inicial (D0), o segundo grupo (G2, n=141) recebeu a gonadorelina e o terceiro grupo (G3= 143) a buserelina.

3.3 PROTOCOLO FARMACOLÓGICO UTILIZADO NO EXPERIMENTO

Seguindo a metodologia descrita por Consentini, Wiltbank e Sartori (2021), as 429 vacas do experimento foram submetidas ao mesmo protocolo de pré-sincronização descrito no Figura 1, que se iniciou com a inserção de um dispositivo intravaginal de segundo uso impregnado originalmente

com 2g de progesterona (CIDR®, Zoetis, São Paulo, Brasil). No sétimo dia do protocolo de pré-sincronização foi removido o implante intravaginal, aplicado por via intramuscular 1mg de cipionato de estradiol (E.C.P®, Zoetis, São Paulo, Brasil) e 0,526mg de cloprostenol sódico (análogo sintético a prostaglandina - PGF2 α , Ciclase®, Zoetis, São Paulo, Brasil).

Figura 1 – Representação esquemática do protocolo de sincronização da ovulação em tempo fixo, demonstrando o momento da divisão dos animais nos três grupos experimentais.



Legenda: D0 – dia inicial do protocolo, P4 – progesterona, D7 – sétimo dia do protocolo, CE –cipionato de estradiol, PGF2 α – prostaglandina F2 alfa, G1 – grupo 1, G2 – grupo 2, G3 – grupo 3, D9 – nono dia do protocolo, D11 – décimo primeiro dia do protocolo e IA – inseminação artificial.

Dez dias após a pré-sincronização, ou seja, no D0 da sincronização, as vacas foram submetidas ao protocolo farmacológico experimental para a IATF, que se iniciou com a inserção de um dispositivo intravaginal de primeiro uso, impregnado com 2g de progesterona e a aplicação por via intramuscular do respectivo análogo sintético ao GnRH. Os animais do grupo G1 receberam 50 μ g de lecirelina (TEC-relin®, União Química, São Paulo, Brasil), seguindo a dosagem descrita por Picard-Hagen *et al.* (2015). Para as fêmeas do G2, seguindo a metodologia descrita por Kim *et al.* (2007), foram aplicados 250 μ g de gonadorelina (Fertagyl®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil). Seguindo a metodologia descrita por Madureira *et al.* (2020) nos animais do G3 foi administrado 16,8 μ g de busrelina (Maxrelin®, GlobalGen, Jaboticabal, São Paulo, Brasil).

No sétimo dia (D7) do protocolo de IATF, as vacas dos três grupos receberam por via intramuscular uma dose de 0,526mg de cloprostenol sódico e no nono dia (D9) receberam novamente uma dose de 0,526mg de cloprostenol sódico, associado a administração de 1mg de cipionato de estradiol, além de terem o implante intravaginal removido. Após 48h da remoção do implante (D11), todas as vacas foram inseminadas utilizando sêmen comercial previamente avaliado.

Trinta dias após a inseminação foi realizado o diagnóstico de gestação através de confirmação da presença de um concepto viável no útero por meio de exame ultrassonográfico transretal. Os exames obstétricos foram repetidos quando as vacas completaram 60 dias de gestação para avaliar se ocorreram perdas gestacionais entre os 30 e 60 dias de gestação.

3.4 INFORMAÇÕES DAS VACAS E AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRAFICAS PARA QUANTIFICAR O NÚMERO DE CORPOS LÚTEOS

Do controle zootécnico do rebanho foi levantado a informação do número de partos para saber quantas lactações completas cada vaca tinha. No D0 da sincronização, todas as vacas utilizadas no experimento tiveram a produção de leite das três ordenhas diárias pesada. No D0 e no D7 do protocolo, nas 429 vacas participantes do experimento foi realizado uma avaliação ultrassonográfica ovariana para quantificar o número de corpos lúteos presentes nos ovários, identificando se o análogo ao GnRH possibilitou aumentar o número de corpos lúteos entre o D0 e o D7. Nas avaliações ultrassonográficas utilizou-se um equipamento (SonoScapeTM, Modelo A5V, Domed, Valinhos, Brasil) com transdutor linear transretal de 5 a 10 MHz.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Entre os grupos, foram comparadas as variáveis produção diária de leite, número de lactações, número de CLs no D0, o número de CLs no D7 e a taxa de concepção. Com o objetivo de avaliar se a aplicação do análogo de GnRH resultou em ovulação e, consequentemente, na formação de um novo corpo lúteo, foi realizada, dentro de cada grupo a comparação entre o número de CLs no D0 e no D7.

As variáveis numéricas foram avaliadas quanto à normalidade de distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk e através da inspeção visual de gráficos de distribuição (histograma e gráfico Q-Q). A homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Levene. Como os dados não apresentaram distribuição normal, as comparações entre grupos foram realizadas com o teste de Kruskall-Wallis. Como a variável número de CLs D7 teve diferença entre os grupos, foi realizada a comparação par-a-par utilizando o teste Wilcoxon, com correção de Bonferroni aplicada às comparações múltiplas. Para comparar o número de CLs entre o D0 e o D7 dentro de cada grupo foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

A taxa de concepção com 30 e 60 dias de gestação foi comparada entre os grupos utilizando o teste Qui-Quadrado. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R (versão 4.4.1),

considerado-se como significativo o valor de $p \leq 0,05$. Mesmo se tratando de dados não paramétricos, como houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) na comparação de entre algumas variáveis, mas a mediana foi a mesma, para facilitar a visualização dos resultados, foi optado por apresentar na Tabela 1 os resultados em média e respectivo erro padrão.

4. ANÁLISES E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

De maneira inédita, a presente pesquisa comparou o efeito dos três análogos sintéticos de GnRH em vacas que passaram por pré-sincronização e que possuíam CLs. Os resultados obtidos na avaliação dos três diferentes análogos estão descritos na Tabela 1, em que é possível observar que todos os análogos induziram a formação de novos CLs. Contudo, na comparação entre os grupos no D7, os análogos lecirelina e buserelina foram mais eficientes ($p = 0,000005$) para aumentar a quantidade de CLs, tendo médias mais altas que o grupo que recebeu gonadorelina. Mesmo a lecirelina e a buserelina sendo mais eficientes que a gonadorelina para aumentar o número de corpos lúteos na comparação entre o D0 e o D7, não houve diferença na taxa de concepção na comparação entre os grupos.

Tabela 1 – Desempenho reprodutivo de vacas leiteiras pré-sincronizadas submetidas ao protocolo farmacológico utilizando diferentes análogos do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH). Legenda: CLs – Corpos lúteos, n – Número de animais, D0 – dia inicial do protocolo, D7 – sétimo dia do

| Variáveis | Grupo 1 (Lecirelina) | Grupo 2 (Gonadorelina) | Grupo 3 (Buserelina) |
|------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Animais (n) | 145 | 141 | 143 |
| Número de lactações | $2,32 \pm 0,1^a$ | $2,3 \pm 0,1^a$ | $2,22 \pm 0,09^a$ |
| Produção de leite (kg) | $42,85 \pm 0,7^a$ | $43,08 \pm 0,8^a$ | $42,5 \pm 0,9^a$ |
| Número de CLs no D0 | $0,94 \pm 0,04^{aA}$ | $0,94 \pm 0,05^{aA}$ | $0,94 \pm 0,05^{aA}$ |
| Número de CLs no D7 | $1,65 \pm 0,07^{bB}$ | $1,18 \pm 0,06^{aB}$ | $1,51 \pm 0,07^{bB}$ |
| Tx. concepção 30 dias | 43,4% (63/145) ^a | 32,6% (46/141) ^a | 40,55% (58/143) ^a |
| Tx. concepção 60 dias | 38,62% (56/145) ^a | 29,79% (42/141) ^a | 36,36% (52/143) ^a |

Legenda: CLs – Corpos lúteos, n – Número de animais, D0 – dia inicial do protocolo, D7 – sétimo dia do protocolo, Tx. concepção 30 dias – taxa de concepção no diagnóstico de gestação realizado aos 30 dias de gestação, Tx. concepção 60 dias – taxa de concepção no diagnóstico de gestação realizado aos 60 dias de gestação. Letras minúsculas iguais sobreescritas na mesma linha representam que não houve diferença na avaliação estatística ($p > 0,05$). Letras maiúsculas sobreescritas na mesma coluna indicam diferença entre as variáveis ($p < 0,05$).

Como demonstrado na tabela 1, os grupos comparados no estudo eram homogêneos, sendo compostos por vacas multíparas, não havendo diferença na comparação do número de lactações entre os grupos. Outra variável que não houve diferença, que também demonstra homogeneidade nos grupos comparados, é a produção diária de leite no início do protocolo de sincronização, em que todos os grupos tinham produção diária acima de 40 kg de leite. Além disso, todos os grupos apresentavam valores médios de CLs no D0 próximos de 1, demonstrando que as vacas do estudo responderam ao protocolo de pré-sincronização.

Os resultados da comparação do número de CLs entre o D0 e o D7 entre os grupos corrobora com os achados de Picard-Hagen *et al.* (2015), que compararam os mesmos princípios ativos análogos ao GnRH e identificaram que a gonadorelina resulta em um pico ovulatório de LH mais baixo em comparação com a buserelina e lecirelina. Provavelmente esse pico mais baixo de GnRH induzido pela gonadorelina seja a causa de ter sido tão eficiente quanto a buserelina e a lecirelina. Isso, mesmo a gonadorelina conseguindo aumento na quantidade de CLs do D0 para o D7.

A gonadorelina é a forma sintética mais semelhante à molécula endógena de GnRH, sendo também formada por uma cadeia de 10 aminoácidos (CHENAULTL *et al.*, 1990). Em contrapartida, a lecirelina e a buserelina são nonapeptídeos (ZAPLETAL; PAVLIK, 2008) que possuem substituições de glicinas por d-aminoácidos (isômeros dextrogiros) na posição seis de ambas, algo que permite a estabilização da conformação em dobradiça da molécula, tornando-as mais resistentes as peptidases e aumentando a afinidade da molécula ao seu receptor, que resulta no prolongamento da meia-vida na circulação (PADULA, 2005; HERBERT; TRIGG, 2005).

Além disso, as substituições das glicinas da décima posição por alquilaminas na lecirelina e na buserelina, resultou em análogos nonapeptídicos com maior potência de indução da ovulação (ROMAGNOLI *et al.*, 2009). Desta forma, é compreensível que no presente estudo, a lecirelina e a buserelina tenham sido mais eficientes para induzir novas ovulações em animais pré-sincronizados, ou seja, em animais que já apresentavam corpos lúteos e que, consequentemente, estavam na fase progesterônica do ciclo. Mesmo com um corpo lúteo ativo, a lecirelina e a buserelina conseguiram induzir uma quantidade de ovulações suficientes para aumentar de forma significativa o número de CLs no D7.

No trabalho de que Picard-Hagen *et al.* (2015), em que a gonadorelina teve menor pico de LH, os autores testaram em novilhas a dose de dose de 100 µg de gonadorelina por animal, enquanto no presente estudo, seguindo a dose sugerida por Kim *et al.* (2007), foram aplicados 250µg, esperando que uma dose mais alta conseguiria ser mais eficiente em animais com CLs formados na pré-sincronização. Contudo, a gonadorelina acabou não sendo tão eficiente na realidade testada e desta forma, em vacas pré-sincronizadas talvez seja pertinente testar outras dosagens ou optar por análogos

que consigam induzir picos de LH mais altos, como a lecirelina e a buserelina (ROMAGNOLI *et al.*, 2009), principalmente se for nas respectivas doses de 50 μ g e 16,8 μ g, como foi feito no presente estudo.

Contudo, na realidade avaliada, não houve diferença significativa na taxa de concepção, mesmo tendo diferença entre os análogos na eficiência de formação de novos CLs. A taxa de concepção das vacas do presente estudo, aos 30 dias de gestação, ficou entre 32,6 e 43,4%, inferior aos dados apresentados por Consentini *et al.* (2025), que em vacas multíparas pré-sincronizadas e com produção leiteira semelhante, utilizaram como análogo de GnRH no D0 a buserelina na mesma dose administrada nos animais do presente estudo, além disso, usaram o mesmo indutor de ovulação, o cipionato de estradiol e obtiveram taxa de concepção de 48,7%.

A diferença entre o presente estudo e a pesquisa de Consentini *et al.* (2025), é que no presente estudo, no protocolo de sincronização, as vacas receberam a primeira dose de PGF2 α no D7 e a remoção do implante impregnado com progesterona, juntamente com a segunda dose de PGF2 α , aconteceu no D9, tendo a inseminação acontecido somente no D11. No estudo de Consentini *et al.* (2025), a primeira dose de PGF2 α foi aplicada também no D7, mas a segunda dose de PGF2 α , associado a remoção do implante foi feita no oitavo dia do protocolo (D8), acontecendo a inseminação no D10. Consentini, Wiltbank e Sartori (2021) citam que, folículos velhos em vacas leiteiras podem resultar em ovulações de oócitos já degenerados e talvez esse possa ser o motivo de que os dados da taxa de concepção do presente estudo tenham sido inferiores aos encontrados por Consentini *et al.* (2025). Nesse sentido, talvez se a comparação entre os análogos de GnRH fosse realizada utilizando um protocolo mais curtos, com inseminação acontecendo no D10, talvez fosse possível obter uma taxa de concepção significativa na comparação entre os grupos.

Contudo, mesmo não havendo diferença na taxa de concepção, os animais que receberam buserelina e lecirelina ficaram acima dos 40% de taxa de concepção, sendo mais próximos dos valores encontrados por Consentini *et al.* (2025) e isso pode ter ocorrido pela melhor eficiência para induzir uma nova ovulação após o D0 da sincronização.

Com relação a taxa de concepção avaliada aos 60 dias de gestação, todos os grupos demonstraram perdas gestacionais, da mesma forma que aconteceu no estudo de Consentini *et al.* (2025), em que os animais demonstraram uma redução de 8,1 pontos percentuais entre a taxa de concepção avaliada nos dias 30 e 60 de gestação. Segundo Consentini, Wiltbank e Sartori (2021) as perdas gestacionais em vacas de alta produção são efeitos comuns que muitas vezes estão associados ao desafio metabólico da lactogênese.

Nesse contexto, pensando em eficiência reprodutiva de vacas de alta produção leiteira, não somente a inclusão de uma pré-sincronização, que de acordo com Consentini, Wiltbank e Sartori

(2021), foi algo que trouxe melhorias significativas ao desempenho reprodutivo de vacas leiteiras, mas também outras pesquisas com ajustes no protocolo de sincronização devem ser realizadas com intuito de buscar melhores índices reprodutivos, algo que é o grande desafio da bovinocultura leiteira, principalmente pelo fato de que Middleton *et al.* (2019), descrevem que a vaca de alta produção deve ficar gestante até os 130 dias após o parto, evitando problemas de saúde na lactação seguinte e consequentemente tendo animais mais longevos e com maior produção de leite considerando toda a vida produtiva.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Vacas leiteiras, que passaram por pré-sincronização e que foram submetidas ao protocolo de IATF no primeiro serviço pós-parto usando 50 μ g de lecirelina, 250 μ g de gonadorelina ou 16,8 μ g de buserelina no D0 da sincronização, tiveram a mesma taxa de concepção, mas a gonadorelina resultou em menor taxa de ovulação avaliada pelo número de corpos lúteos comparados no D7.

REFERÊNCIAS

ARMENGOL-GELONCH, R. *et al.* Impact of phase of the estrous cycle and season on LH surge profile and fertility in dairy cows treated with different GnRH analogs (gonadorelin vs. buserelin). **Theriogenology**, v. 91, p. 121-126, 2017.

ATAMAN, M. B. *et al.* The effect of buserelin injection 12 days after insemination on selected reproductive characteristics in cows. **Acta Veterinaria Brno**, v. 80, n. 2, p. 171–177, 2011.

BERÇA, A. S. *et al.* Advances in pasture management and animal nutrition to optimize beef cattle production in grazing systems. In: **Animal feed science and nutrition-production, health and environment**. IntechOpen, 2021.

BLISS, S. P. *et al.* GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 31, n. 3, p. 322-340, 2010.

BRZOZOWSKI, M. *et al.* The impact of installation of automatic milking system on production and reproduction traits of dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v.53, n. 5, p. 1123-1129, 2018.

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

BONATO, D. V. *et al.* Follicular dynamics, luteal characteristics, and progesterone concentrations in synchronized lactating Holstein cows with high and low antral follicle counts. **Theriogenology**, v. 179, p.223-229, 2022.

CARVALHO, P. D. *et al.* Effect of manipulating progesterone before timed artificial insemination on reproductive and endocrine outcomes in high-producing multiparous Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 8, p. 7509-7521, 2019.

CHENAULT, J. R. *et al.* LH and FSH 211 response of Holstein heifers to fertirelin acetate, gonadorelin and buserelin. **Theriogenology**, v. 34, p. 81–98, 1990.

COLAZO, M. G.; MAPLETOFT, R. J. Factores asociados a la liberación de gonadotrofinas y ovulación después de la administración exógena de GnRH en el Bos Taurus. **Ciencia Veterinaria**, v. 24, n. 2, p. 9, 2022.

CONSENTINI, C. E. C. *et al.* Fertility programs for lactating dairy cows: A novel presynch + timed artificial insemination program (Double E-Synch) produces similar ovarian dynamics, synchronization, and fertility as Double-Ovsynch. **Journal of Dairy Science**, n. 108, v. 1, p. 4435-4447, 2025.

CONSENTINI, C. E.; WILTBANK, M. C.; SARTORI, R. Factors that optimize reproductive efficiency in dairy herds with an emphasis on timed artificial insemination programs. **Animals**, v. 11, n. 2, p. 1–30, 2021.

DE CARVALHO FERNANDES, C. A. *et al.* Timing of early resynchronization protocols affects subsequent pregnancy outcome in dairy cows. **Theriogenology**, v. 167, p. 61-66, 2021.

EL-TAHAWY, A. E. G. S.; FAHMY, M. M. Partial budgeting assessment of the treatment of pyometra, follicular cysts and ovarian inactivity causing postpartum anoestrus in dairy cattle. **Research in Veterinary Science**, v. 90, n. 1, p. 44–50, 2011.

FERGUSON, J. *et al.* **Body condition of lactating cows**, Part 1. 1994.

GIORDANO, J. O. *et al.* 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, p. 3781-3793, 2012.

GUGSSA, T.; ASHEBIR, G.; YAYNESHET, T. Effects of fixed time AI and AI at detected estrus on conception rate in smallholder zebu and crossbred heifers and cows subjected to double PGF2 administration. **Tropical Animal Health and Production**, v. 48, n. 6, p. 1209–1213, 2016.

HERBERT, C. A.; TRIGG, T. E. Applications of GnRH in the control and management of fertility in female animals. **Animal reproduction science**, v. 88, n. 1, p. 141-153, 2005.

HILLS, J. L. *et al.* Invited review: An evaluation of the likely effects of individualized feeding of concentrate supplements to pasture-based dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 3, p. 1363-1401, 2015.

KIM, U.H. *et al.* Comparison of Two Types of CIDR-based Timed Artificial Insemination Protocols for Repeat Breeder Bairy Cows. **J Reprod Dev**, v. 53, n. 3, p. 639-45, 2007.

KUMAR, P.; SHARMA, A. Gonadotropin-releasing hormone analogs: Understanding advantages and limitations. **Journal of human reproductive sciences**, v. 7, n. 3, p. 170-174, 2014.

LANDAETA-HERNÁNDEZ, A. J. *et al.* Social and breed effects on the expression of a PGF2 induced oestrus in beef cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, n. 5, p. 315–320, 2004.

LEÃO, I. M. R. *et al.* Effect of 200 µg of gonadorelin at the first gonadotropin-releasing hormone of the Resynch-25 on ovarian dynamics and fertility in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 107, n. 5, p. 3319–3334, 2024.

LONERGAN, P. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1594–1601, 2011.

MADUREIRA, G. *et al.* Progesterone-based timed AI protocols for Bos indicus cattle II: Reproductive outcomes of either EB or GnRH-type protocol, using or not GnRH at AI. **Theriogenology**, v. 145, n. 86-93, 2020.

MARTINS, J. P. N. *et al.* Level of circulating concentrations of progesterone during ovulatory follicle development affects timing of pregnancy loss in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 11, p. 10505-10525, 2018.

MIALOT, J. P. *et al.* Estrus synchronization in beef cows: Comparison between GnRH + PGF2 + GnRH and PRID + PGF2 + eCG. **Theriogenology**, v. 60, n. 2, p. 319–330, 2003.

MONTEIRO, P. L. J. *et al.* Increasing estradiol benzoate, pretreatment with gonadotropinreleasing hormone, and impediments for successful estradiol-based fixed-time artificial insemination protocols in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 6, p. 5577–5587, 2019.

MIDDLETON, E. L.; MINELA, T.; PURSLEY, J. R. The high-fertility cycle: How timely pregnancies in one lactation may lead to less body condition loss, fewer health issues, greater fertility, and reduced early pregnancy losses in the next lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 6, p. 3826–3839, 2015.

ORTMANN, O.; WEISS, J. M.; DIEDRICH, K. Gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and GnRH agonists: mechanisms of action. **Reproductive biomedicine online**, v. 5, p. 1-7, 2002.

PADULA, A. M. GnRH analogues - agonists and antagonists. **Animal reproduction science**, v. 88, n. 1, p. 115-126, 2005.

PERRETT, R. M.; MCARDLE, C. A. Molecular mechanisms of gonadotropin-releasing hormone signaling: integrating cyclic nucleotides into the network. **Frontiers in endocrinology**, v. 4, p. 180, 2013.

PETER, A. T.; VOS, P. L. A. M.; AMBROSE, D. J. Postpartum anestrus in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 71, n. 9, p. 1333–1342, 2009.

PICARD-HAGEN, N. *et al.* Effect of gonadorelin, lecirelin, and buserelin on LH surge, ovulation, and progesterone in cattle. **Theriogenology**, v. 84, n. 2, p. 177–183, 2015.

RODRIGUES, C. A. *et al.* How FTAI and FTET impact reproductive efficiency of brazilian dairy herds. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. Suppl 1, p. 3–13, 2011.

ROMAGNOLI, S. *et al.* Clinical use of deslorelin for the control of reproduction in the bitch. **Reproduction in domestic animals**, v. 44, s.2, p. 36-39, 2009.

SANGSRITAVONG, S. *et al.* High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 85, n. 11, p. 2831-2842, 2002.

SANTOS, D. S. *et al.* Incidência de doenças digestivas, metabólicas e reprodutivas no pós-parto em vacas holandesas de alta lactação. In: **Anais do Salão de Iniciação Científica Tecnológica**, 2022.

SARTORI, R. *et al.* Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of dairy science**, v. 85, n. 11, p. 2803-2812, 2002.

SILVA, L. O. *et al.* Influence of GnRH analog and dose on LH release and ovulatory response in Bos indicus heifers and cows on day seven of the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 214, p. 215-223, 2024.

SOUZA, A. H. *et al.* 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.

WILTBANK, M. C. *et al.* Positive and negative effects of progesterone during timed AI protocols in lactating dairy cattle. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 231–241, 2012.

ZAPLETAL, D.; PAVLIK, A. The effect of lecirelin (GnRH) dosage on the reproductive performance of nulliparous and lactating rabbit does. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 2, p. 306-315, 2008.