

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Controle da ovulação em programas de IATF em novilhas de corte: Funcionalidade do GnRH como indutor da ovulação aplicado 34 horas após retirada do dispositivo de progesterona**

**Autor: Bruna Favretto de Souza**

**Porto Alegre**

**2023**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Controle da ovulação em programas de IATF em novilhas de corte: Funcionalidade do GnRH como indutor da ovulação aplicado 34 horas após retirada do dispositivo de progesterona**

**Autor: Bruna Favretto de Souza**

**Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Embriologia e Biotécnicas da Reprodução Animal.**

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bertolini**

**Porto Alegre**

**2023**

## BRUNA FAVRETTO DE SOUZA

Controle da ovulação em programas de IATF em novilhas de corte: Funcionalidade do GnRH como indutor da ovulação aplicado 34 horas após retirada do dispositivo de progesterona

Defesa em 22 de março de 2023, às 9 h.

## COMISSÃO AVALIADORA:

---

Prof. Dr. Marcelo Bertolini, FAVET/UFRGS

Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Fernando Caetano de Oliveira, FAVET/UFRGS

Membro da Comissão

---

Prof. Bernardo Gasperin, FAVET/UFPel

Membro da Comissão

---

Prof. Ricardo Zanella, ESAN/UPF

Membro da Comissão

Para a minha maior incentivadora, aquela que sempre acreditou e sonhou junto comigo, que nunca mediu esforços para que tudo o que eu almejasse se concretizasse. Por ser uma pessoa tão boa, de um coração tão generoso e bondoso, Deus quis tê-la por perto. Mas eu sei que de onde está, olha por mim e comemora junto comigo.

**MÃE OBRIGADA POR TODO AMOR, CARINHO E DEDICAÇÃO COMIGO, VOCÊ É A MINHA MAIOR INSPIRAÇÃO E FORÇA E SE HOJE EU CONSEGUI É PORQUE VOCÊ SEMPRE ESTEVE AO MEU LADO ME APOIANDO. TE AMO COM TODO O MEU AMOR, SAUDADES ETERNAS!**

**A você, DEDICO.**

**Salete Ighes Favretto, *in memoriam*.**

*“Tudo posso naquele que me fortalece”.*  
*Filipenses 4:13*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, por me mostrar que tudo é possível, basta acreditar. “Tudo o que fizerem, seja em palavra seja em ação, façam-no em nome do Senhor Jesus, dando por meio dele graças a Deus pai.”

Colossenses 3:17

Agradeço a minha família, minha avó Cezira, minha tia Sirlei, meus dindos Cirileide e Luiz Henrique e meus primos Laíse e Henrique, esses que juntamente com minha mãe sempre foram os meus maiores incentivadores, que estiveram juntos comigo, me apoiando, e que me ensinaram sobre o valor da vitória digna. A minha avó Cezira, fonte de sabedoria, força e amor. Mulher guerreira e de muita fé, que apesar de todas as dificuldades em sua vida sempre buscou encontrar soluções, e que me ensinou muito sobre família.

À Rafael, meu amor, pela compreensão, paciência, cumplicidade e por nunca duvidar e me mostrar que na vida nada é por acaso e que duas almas jamais se encontram sem um por que. Todo o seu incentivo, amor e carinho eram o meu combustível.

Ao professor e orientador Marcelo Bertolini pela paciência, confiança e orientação no campo de pesquisa. Agradeço por desde o começo acreditar que isso seria possível e por todos os seus ensinamentos que me fizeram refletir e amadurecer como pessoa e profissional. Ao meu coorientador e professor Fernando Caetano de Oliveira por toda paciência, dedicação, disciplina e por compartilhar comigo sua grande experiência. Agradeço também por acreditar e depositar esta confiança em mim, se hoje isto está sendo possível, com certeza foi porque vocês acreditaram que era possível. Pessoas/profissionais que seguirei exemplo.

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade do GnRH como indutor adicional de ovulação aplicado 34 h após a remoção do dispositivo intravaginal de progesterona (DIV de P4) em um protocolo padrão de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) para novilhas de corte. Foram utilizados quatro lotes distintos com 116, 102, 76 e 96 fêmeas, totalizando 390 novilhas das raças Hereford e Braford de 2 anos, alocadas de forma homogênea. O protocolo hormonal padrão de sincronização da ovulação foi utilizado nos grupos controle e tratamento. No D0, aplicou-se benzoato de estradiol (BE, 2 mg) via i.m., juntamente com a inserção de um DIV de P4 (1 g). No D8, removeu-se o DIV de P4, administrando-se um análogo da PGF<sub>2α</sub> (0,15 mg de d-cloprostenol) e cipionato de estradiol (CE, 1 mg) como indutor de ovulação. Em um subgrupo de novilhas (n=17) realizou-se a avaliação da função ovariana pelo monitoramento da dinâmica folicular por ultrassonografia transretal (US) a cada 24 h, do D8 ao D10 em ambos os grupos. No D9, 34 h após a remoção do DIV de P4, realizou-se no grupo tratamento (GnRH34h) a aplicação de um hormônio indutor adicional de ovulação análogo do GnRH (0,05 mg de lecorelina). No D10, foram realizadas as IATFs em ambos os grupos. Coletas sanguíneas foram realizadas de um subgrupo de novilhas (n=15) nos D7 e D12 após a IATF para a avaliação da função lútea pela determinação da concentração sérica de P4. As taxas de prenhez foram avaliadas por US no D30 após a IATF. Não houve diferenças entre os grupos experimentais quanto às taxas de crescimento folicular do dia 8 ao dia 10 (P=0,63), aos tamanhos dos folículos ovulatórios (P=0,15), e às manifestações de estro (G.C=100%) e (GnRH34h=90%) até a IATF do subgrupo de novilhas da dinâmica folicular. As concentrações de P4 nos dias 7 (P=0,45) e 12 (P=0,23) também não apresentaram diferenças do subgrupo das novilhas da concentração sérica P4. As taxas de prenhez também não apresentaram diferenças entre os grupos (G.C, 50,2% e GnRH34h, 50,2%). Houve somente diferenças nas concentrações de P4 entre os dias de avaliação, sendo mais elevadas no dia 12 (P=0,004) em comparação ao dia 7 após a IATF, e nas taxas de prenhez entre lotes de animais (P=0,07), independente dos grupos experimentais. Em síntese, a aplicação de GnRH 34 h após a remoção do DIV de P4 não influenciou a função ovariana e a fertilidade das novilhas de 2 anos, indicando que o tratamento GnRH34h não melhorou a eficiência dos resultados da IATF em novilhas de corte.

**Palavras-chave:** novilhas, sincronização, ovulação, protocolo hormonal.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of GnRH as an additional ovulation inducer applied 34 h after removing the intravaginal progesterone device (P4 IVD) in a standard timed artificial insemination (TAI) protocol for beef heifers. Four different animal lots were used with 116, 102, 76, and 96 females, in a total of 390 homogeneously allocated 2-year-old Hereford and Braford heifers. As a standard hormonal protocol for ovulation synchronization for both control and treatment groups, on D0, estradiol benzoate (EB, 2 mg) was applied i.m., and a P4 IVD (1 g) was inserted. On D8, the P4 IVD was removed, and a PGF<sub>2α</sub> analogue (0.15 mg of d-cloprostenol) and estradiol cypionate (EC, 1 mg) were administered as an ovulation inducer. Ovarian function was evaluated by monitoring follicular dynamics and ovulatory follicular diameter by transrectal ultrasonography in a subgroup of heifers (n=17) every 24 h, from D8 to D10 in both groups. On D9, the treatment group (GnRH34h) was given an additional ovulation-inducing hormone analogous to GnRH (0.05 mg of lecirelin), 34 h after the P4 IVD removal. On D10, TAI was carried out in both groups. Blood collections were performed in a subgroup of heifers (n=15) from both groups on D7 and D12 after TAI to evaluate luteal function by determining P4 serum concentrations. Pregnancy rates were assessed by transrectal ultrasonography on D30 after TAI. No differences were detected between the experimental groups in terms of the follicular growth rate patterns from day 8 to day 10 (P=0.63), sizes of ovulatory follicles (P=0.15), estrus expression (G.C=100% vs. GnRH34h=90%) until TAI, P4 concentrations on days 7 (P=0.45) and 12 (P=0.23), and pregnancy rates on day 30 after TAI (G.C n=50.2% vs. GnRH34h n=50.2%). Differences were only observed in terms of P4 concentrations between days, with higher levels on day 12 (P=0.004) than on day 7 after TAI, and in pregnancy rates between animal lots (P=0.07), regardless of the experimental groups. In summary, the use of GnRH 34 h after removing the P4 IVD did not influence the ovarian function and fertility of 2-year-old Hereford and Braford heifers, indicating that the GnRH34h treatment did not improve the efficiency of TAI in 2-year-old beef heifers.

**Keywords:** heifers, synchronization, ovulation, hormonal protocol.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Protocolos de IATF utilizados no Grupo Controle e no Grupo Tratamento para a sincronização de uma nova onda folicular em novilhas de corte Hereford e Braford..... 33
- Figura 2.** Taxa de crescimento folicular médio diário do folículo dominante (FD) até o folículo pré-ovulatório (FPO), do sub-grupo da dinâmica folicular ovariana de acordo com os grupos experimentais (Grupo Controle, n=7; Grupo Tratamento, GnRH34, n=10)..... 36
- Figura 3.** Diâmetro folicular diário do folículo dominante (FD) até o folículo pré-ovulatório (FPO) do sub-grupo da dinâmica folicular ovariana do dia 8 ao dia 10 do protocolo de IATF de acordo com os grupos experimentais (Grupo Controle, n=7; Grupo Tratamento, GnRH34, n=10)..... 37
- Figura 4.** Concentrações séricas de P4 do sub-grupo de novilhas da avaliação da função lútea, nos dias 7 e 12 após a IATF, de acordo com os grupos experimentais (Grupo Controle, n=7; Grupo Tratamento, GnRH34, n=8)..... 38
- Figura 5.** Taxas de prenhez total e por lote/fazenda de novilhas mestiças de 24 meses no dia 30 após a IATF, de acordo com os grupos experimentais Controle e Tratamento..... 38
- Figura 6.** Taxas de prenhez no dia 30 após a IATF de novilhas de 24 meses de acordo com os grupos experimentais grupo controle e tratamento em relação às fêmeas que manifestaram ou não sinais de estro até o momento da IATF..... 39

**LISTA DE TABELA**

<b>Tabela 1.</b> Diâmetro do folículo pré-ovulatório (FPO), taxa de ovulação, manifestação de estro e taxa de prenhez 30 em novilhas de 24 meses, de acordo com o grupo experimental (Controle vs Tratamento).....	36
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne
BE	Benzoato de Estradiol
CE	Cipionato de Estradiol
CGP	Células Germinativas Primordiais
CL	Corpo Lúteo
ECC	Escore Condição Corporal
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
FAVET	Faculdade de Veterinária
FD	Folículo Dominante
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i>
g	grama
GnRH	<i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>
h	horas
HHG	Hipotalâmico-hipofisiário-gonadal
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGF-I	<i>Insulin-like growth factor-I</i>
IGFBP	<i>Insulin-like growth factor binding proteins</i>
im	intramuscular
LH	<i>Luteinizing Hormone</i>
mg	miligrama
mm	milímetro
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandina F <sub>2α</sub>
P4	Progesterona
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
US	Ultrassom
VE	Valerato de Estradiol
α	<i>Alfa</i>
τ	<i>Tau</i>
DIV	Dispositivo intravaginal

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>HIPÓTESES E OBJETIVOS</b> .....	14
<b>2.1</b>	<b>Hipóteses</b> .....	14
<b>2.2</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	14
<b>2.3</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	14
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
<b>3.1</b>	<b>Gametogênese feminina</b> .....	15
<b>3.1.1</b>	<i>Oogênese</i> .....	15
<b>3.1.2</b>	<i>Foliculogênese</i> .....	15
<b>3.2</b>	<b>Ciclo estral bovino</b> .....	17
<b>3.2.1</b>	<i>Fase lútea</i> .....	17
<b>3.2.2</b>	<i>Fase folicular</i> .....	18
<b>3.3</b>	<b>Dinâmica folicular bovina</b> .....	19
<b>3.3.1</b>	<i>Recrutamento folicular</i> .....	20
<b>3.3.2</b>	<i>Seleção e dominância folicular</i> .....	20
<b>3.3.3</b>	<i>Desvio e dominância folicular</i> .....	21
<b>3.4</b>	<b>Diferenças na fisiologia reprodutiva de fêmeas <i>Bos taurus taurus</i> vs. <i>Bos taurus indicus</i></b> .....	22
<b>3.5</b>	<b>Princípios da IATF e efeito dos métodos alternativos de controle da onda folicular</b> .....	23
<b>3.5.1</b>	<i>Sincronização de uma nova onda folicular</i> .....	23
<b>3.5.1.1</b>	<i>Método hormonal</i> .....	24
<b>3.5.2</b>	<i>Potenciais falhas dos protocolos, pontos vulneráveis e variações biológicas</i> .....	25
<b>3.5.3</b>	<i>Princípios dos indutores da ovulação e a funcionalidade do GnRH como um indutor de ovulação</i> .....	28
<b>3.6</b>	<b>Novilhas</b> .....	29
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
<b>4.1</b>	<b>Aspectos éticos</b> .....	32
<b>4.2</b>	<b>Animais e propriedades</b> .....	32
<b>4.3</b>	<b>Delineamento experimental</b> .....	32
<b>4.4</b>	<b>Protocolos hormonais e IATF – Grupos controle e tratamento</b> .....	33
<b>4.5</b>	<b>Avaliação da dinâmica folicular por meio de ultrassonografia em tempo real</b> .....	34
<b>4.6</b>	<b>Avaliação da função lútea</b> .....	34
<b>4.7</b>	<b>Diagóstico de prenhez</b> .....	35
<b>4.8</b>	<b>Análise estatística</b> .....	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	36
<b>5.1</b>	<b>Avaliação da dinâmica folicular do subgrupo amostral</b> .....	36
<b>5.2</b>	<b>Avaliação da função lútea</b> .....	37
<b>5.3</b>	<b>Taxas de prenhez entre grupos experimentais</b> .....	38
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	40
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	44
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	45
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	46

## 1 INTRODUÇÃO

O movimento do agronegócio da pecuária de corte em 2021 foi de R\$ 913,14 bilhões. Essa quantidade inclui todos os negócios e movimentações relacionados à cadeia, que são desde valores dos insumos utilizados na pecuária, dos investimentos em genética, sanidade animal, nutrição, exportações até as vendas no mercado interno.

Conforme o Presidente da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC), os embarques brasileiros de carne bovina destinada à exportação em 2021 atingiram o valor histórico de US\$ 9,2 bilhões, com acréscimo de 8,4% sobre o resultado de 2020. A estimativa do rebanho brasileiro ficou em 196,47 milhões de cabeças, com um abate de 39,14 milhões de animais.

Diante deste mercado consumidor exigente, a ABIEC estima que a produção brasileira de carne precise aumentar 35% até 2030. As exportações de carne bovina ultrapassarão os três milhões de toneladas entre 2025 e 2030. Por isso, os pecuaristas deverão superar as suas limitações em relação ao aumento da produção, aliado à rentabilidade dos rebanhos. Considerando este fator, é indispensável a utilização de ferramentas que auxiliem a multiplicação e disseminação da genética de animais superiores e que proporcionem maior retorno econômico.

Dentro de um sistema de produção de pecuária, o desempenho reprodutivo dos animais é um dos principais indicadores de produtividade e está relacionado diretamente com a sanidade, nutrição e genética (ROVIRA, 1996). O melhoramento genético nos rebanhos é uma ferramenta que possibilita que seja feita a seleção dos indivíduos com maior desenvolvimento ponderal, um bom rendimento de carcaça, produção leiteira, melhor conversão alimentar e precocidade sexual, fatores que auxiliam no aumento da produtividade, tanto de carne quanto de leite (PINEDA, 2004). Para obter a máxima eficiência na reprodução de um rebanho, é preciso que a fêmea produza um bezerro por ano.

Inúmeras são as biotecnologias disponíveis para aumentar os índices reprodutivos. A inseminação artificial (IA) é uma biotécnica reprodutiva que tem sido muito utilizada em fazendas há várias décadas. Por meio da IA é possível direcionar o melhoramento genético do rebanho pela utilização de sêmen de touros testados e provados como melhoradores. Contudo, esta biotécnica faz o uso da detecção de estro, que ao final poderá obter resultados insatisfatórios devido a falhas na detecção do estro (ROELOFS *et al.*, 2010; SÁ FILHO *et al.*, 2013). Entretanto, a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) merece

destaque, pois é uma biotécnica de reprodução assistida, que visa sincronizar a ovulação da fêmea para inseminar em dia e horário pré-determinado, ou seja, não há a necessidade de detecção de estro (GOTTSCHALL *et al.*, 2008).

Buscando facilitar o manejo e evitar falhas na detecção de estro, o que reduz as taxas de concepção em um rebanho, foi desenvolvido na década de 1990 para bovinos de leite, um protocolo hormonal de indução de ovulação, denominado “OvSynch”, com base no uso de GnRH, que permitiu a inseminação em tempo pré-determinado de todas as fêmeas sincronizadas (PURSLEY *et al.*, 1995). Desde então, diversos protocolos foram desenvolvidos, com a combinação de hormônios como a progesterona, ésteres de estradiol, prostaglandina, GnRH e eCG para controlar o ciclo estral e sincronizar a ovulação de fêmeas bovinas de corte e de leite (BARUSELLI *et al.*, 2012b; WILTBANK; PURSLEY, 2014). Porém, é importante salientar que o uso de cada protocolo hormonal deve à viabilidade econômica, à aplicabilidade e, principalmente, estar de acordo com a legislação vigente em cada país.

Os estudos de IATF que vêm sendo realizados tem o objetivo de melhorar o desempenho reprodutivo e aumentar a taxa de desfrute dos rebanhos. Sendo assim, a categoria das novilhas que representa a geração seguinte de progresso genético para o rebanho bovino, torna necessária que sejam selecionadas, criadas e manejadas para assegurar o desempenho reprodutivo adequado (ENGELKEN, 2008). Com isso, são necessários estudos na aplicação destes protocolos que maximizem as taxas de concepção e de prenhez dos rebanhos, com a categoria das novilhas ainda necessitando enfoque. O presente estudo teve o objetivo de avaliar a funcionalidade de um protocolo de IATF em novilhas, com a associação de dois indutores da ovulação, visando melhorar a função uterina, a sincronização da ovulação e os resultados sob as taxas de concepção/prenhez.

## **2 HIPÓTESES E OBJETIVOS**

### **2.1 Hipóteses**

- a) Aplicação de GnRH como indutor de ovulação 34 h após retirada do dispositivo intravaginal de P4, em protocolos hormonais para IATF em novilhas de 2 anos induz a ovulação em sincronia com a inseminação.
- b) Há aumento na taxa de prenhez em novilhas de 2 anos após a aplicação de GnRH 34 h após a retirada do dispositivo intravaginal de P4 em protocolos hormonais para IATF.
- c) Há alteração no diâmetro dos folículos ovulatórios em novilhas tratadas com GnRH 34 h, em comparação com aquelas tratadas apenas com CE.

### **2.2 Objetivo geral**

- a) Avançar o conhecimento no controle de desenvolvimento folicular e na sincronização da ovulação em bovinos, com aumento da eficiência dos protocolos hormonais de controle do ciclo estral com foco na inseminação artificial em tempo fixo de novilhas de corte.

### **2.3 Objetivos específicos**

- a) Monitorar as características da dinâmica folicular por ultrassonografia transretal, desde a retirada do dispositivo intravaginal de P4, até a ovulação, comparando a taxa de desenvolvimento folicular e a taxa ovulatória em novilhas taurinas cruzas de corte de 2 anos submetidas a um protocolo hormonal padrão (controle) com ou sem a utilização adicional de GnRH como indutor da ovulação 34 h após a remoção do dispositivo intravaginal de P4; e
- b) Comparar as taxas de manifestação de estro, diâmetros dos folículos ovulatórios e taxas de ovulação e de prenhez aos 30 dias em novilhas de corte submetidas a um protocolo hormonal padrão (controle) com ou sem a utilização adicional de GnRH como indutor da ovulação 34 h após a remoção do dispositivo intravaginal de P4.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Gametogênese feminina

A gametogênese caracteriza-se pela divisão e diferenciação das células germinativas precursoras de gametas, que serão capazes através da fecundação de gerar um novo indivíduo. Na fêmea, divide-se em oogênese e foliculogênese, que juntos geram as unidades básicas do gameta feminino: o folículo e o oócito, estes estando intimamente ligados e dependentes (FINEGAN & BERGSTRALH, 2020).

##### 3.1.1 Oogênese

Define-se oogênese como a sequência de eventos que iniciam no desenvolvimento e diferenciação das células germinativas primordiais (CGP), que se encontram na fase embrionária (SOTO-SUAZO & ZORN, 2005), perdurando até a formação do oócito, ovulação e fecundação (ADONA *et al.*, 2013). Na gônada embrionária em diferenciação alojam-se as CGP, que se proliferam por mitose. Quando há expansão destas células, em milhões, cessa o processo de mitose e as CGPs diferenciam-se em oogônias, que são revestidas com uma camada de células epiteliais achatadas (MONNIAUX, 2018).

Entre os 75 e 80 dias de gestação da fêmea bovina, as oogônias iniciam o processo de meiose com início da prófase I da meiose. Na fase de diplóteno da meiose I, entre 150 e 180 dias de gestação, os oócitos que estão rodeados por uma única camada de 4 a 8 células achatadas da pré-granulosa e pela lâmina basal intacta, formam a primeira categoria de folículos, chamados de folículos primordiais em repouso (FAIR, 2003).

Nos folículos primordiais, os oócitos primários estão quiescentes e permanecem assim até o período de maturidade sexual (MONNIAUX, 2018). A fêmea bovina nasce com cerca de 135 mil folículos primordiais quiescentes nos ovários (AERTS & BOLS, 2010a).

##### 3.1.2 Foliculogênese

Entre a transição da mitose para a meiose durante a oogênese, ocorre a foliculogênese. Este processo ocorre quando as oogônias se tornam oócitos primários e concluem com a atresia dos folículos, ou de forma cíclica após a puberdade na formação do folículo pré-ovulatório e/ou folículo de Graaf. Divide-se em duas etapas: na formação dos folículos pré-antrais, com duração mais longa, e no desenvolvimento dos folículos

antrais, que crescem e entram em atresia ou então ovulam durante o ciclo estral, caracterizando a dinâmica folicular (AERTS & BOLS, 2010ab).

A composição da fase pré-antral inclui folículos primordiais, primários e secundários, e na fase antral, folículos terciários e pré-ovulatórios. Quando ocorre a ativação dos folículos primordiais, há uma transformação das células achatadas da granulosa para a forma cuboide (AERTS & BOLS, 2010a).

Embora os mecanismos do controle da ativação não serem totalmente elucidados, alguns já são conhecidos. Figueiredo *et al.* (2018) mencionam que fatores e ligantes primariamente intraovarianos (parácrinos e autócrinos) controlam o desenvolvimento de folículos primordiais, e que também podem ser influenciados por fatores e ligantes extraovarianos (regulação endócrina) derivados de diferentes tecidos. Desta forma, a foliculogênese ocorre pela combinação de tais fatores e ligantes que tem ações complementares ou opostas (*feedback* positivo e/ou negativo), em uma imensa complexidade (JUENGEL *et al.*, 2018).

A continuação para a fase de folículo secundário se caracteriza pelo surgimento da segunda camada de células da granulosa, chegando até no máximo a seis camadas (AERTS & BOLS, 2010a). Nesta fase, há também o início da deposição de glicoproteínas que formarão a zona pelúcida no entorno do oócito e da lâmina basal que separará as futuras células da teca interna e da granulosa.

A fase que sucede o folículo secundário para o folículo antral terciário se caracteriza pela contínua proliferação das células do oócito, que são as células da teca interna e as células da granulosa, separadas pela lâmina basal, das células da *corona radiata* e do *cumulus oophorus*, que estão justapostas ao oócito primário e à zona pelúcida em formação final. Nesta fase da foliculogênese, acontece o processo de permeabilização a íons sódio ao interior da estrutura, seguido por íons cloro e pela água, levando à formação de uma cavidade cheia de fluído, denominada antro, dando início à fase folicular antral (FAIR, 2003).

A duração do desenvolvimento de folículos primordiais até ovulatórios é estimado em 180 dias na vaca, sendo que 42 dias correspondem ao período de crescimento do folículo antral à ovulatório (LUSSIER *et al.*, 1987).

### 3.2 Ciclo estral bovino

O ciclo estral bovino é caracterizado pela atividade cíclica útero-ovariana da fêmea, marcado pelo intervalo entre dois períodos de receptividade reprodutiva, denominado de estro (SARTORI & BARROS, 2011). Nos bovinos, após a puberdade, o estro acontece de forma cíclica em intervalos médios de 17 a 25 dias.

Duas fases endócrinas e quatro estágios compõem o ciclo estral. Sendo fase folicular ou estrogênica, com os estágios de proestro e estro, e a fase lútea ou progesterônica, com os estágios de metaestro e diestro, sendo reguladas pela interação hormonal do eixo hipotalâmico-hipofisiário-gonadal (HHG) (FORDE *et al.*, 2011).

O funcionamento do eixo HHG ocorre através da liberação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelos centros tônico e pré-ovulatório do hipotálamo, em dois padrões de secreção agindo nas células gonadotróficas da adenohipófise para a secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH). Estes hormônios estimulam as gônadas na produção e liberação de estradiol, inibina e progesterona, atuando por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos na foliculogênese, ovulação, função do corpo lúteo e esteroidogênese do ovário (FORDE *et al.*, 2011).

#### 3.2.1 Fase lútea

A fase lútea inicia após a ovulação, com a formação do corpo lúteo (CL), principal estrutura encontrada neste período, o qual sintetiza progesterona (P4), e termina com a lise do CL. A duração média desta fase é de 14 a 18 dias e é subdividida em dois estágios: o metaestro, com duração média de 3 a 6 dias, e o diestro, que perdura em média 11 a 14 dias (FORDE *et al.*, 2011).

O início do metaestro é marcado pela ovulação, que ocorre em média 12 horas após o término do estro. Neste estágio ocorre a formação do CL, o qual neste momento é chamado de corpo hemorrágico, e há início da síntese com pequena liberação de P4 (DIRKSEN *et al.*, 1993). A P4 é o hormônio responsável pela manutenção da possível gestação de um concepto. Após a formação do CL, a P4 começa a aumentar os níveis de concentração sérica concomitantemente com o aumento no tamanho e volume do CL. Entretanto, somente a partir do 5º dia é que a concentração sérica começará a aumentar substancialmente.

O diestro é o maior período do ciclo estral, onde se têm a maior concentração de P4 secretada e intensa atividade do CL (BENITES & BARUSELLI, 2011).

Esta fase é caracterizada também pela responsividade à luteólise pela prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ). Os níveis séricos da P4 através de um *feedback* negativo, impedem a ocorrência de um pico de LH pelo centro pré-ovulatório, ocorrendo apenas liberação de maior amplitude e menor frequência, sendo insuficiente para ativar a ovulação de algum folículo dominante (FD) (PETER *et al.*, 2009). Se não houver reconhecimento materno embrionário (via *interferon- $\tau$* ), entre os dias 16º e 18º do ciclo, iniciará o processo de luteólise do CL. O endométrio é o responsável por secretar  $PGF_{2\alpha}$ , que é o hormônio responsável da luteólise do CL.

O FSH que possui função de estimular a proliferação e crescimento folicular, tanto no metaestro como no diestro, continuará ocorrendo de forma cíclica, pois o crescimento e desenvolvimento dos folículos seguem ocorrendo. O *feedback* negativo exercido pela secreção folicular de estradiol e inibina tem controle sobre as modulações das concentrações na liberação de FSH. Folículos grandes secretam mais estradiol, que vai gradualmente inibindo o centro tônico hipotalâmico (GnRH) e gonodotrofos (FSH), ocasionando redução de FSH circulante (AUSTIN *et al.*, 2001). Todavia, o aumento plasmático de FSH está relacionado ao início de uma nova onda de crescimento folicular (GIBBONS *et al.*, 1997), recrutando folículos terciários FSH-responsivos de 4 a 5 mm em diâmetro. Devido ao processo fisiológico de atresia folicular, a maioria dos folículos não chegará ao estágio final de ovulação.

### 3.2.2 Fase folicular

A fase folicular que culminará na ovulação de um FD se dá após a luteólise e em concentrações baixas de P4 sérica, próximas ao nível basal (1 ng/mL). As estruturas características deste momento são folículos terciários FSH-responsivos, que vão crescer e formar FD e folículos subordinados (FS), com secreção folicular crescente de estradiol e inibina. A duração da fase estrogênica é de 3 a 5 dias e subdivide-se em dois estágios: proestro (3 a 4 dias) e estro (12 a 18 horas) (BINELLI *et al.*, 2014).

Dentro do ciclo estral, este é o período mais variável, uma vez que a sua duração é dependente do crescimento do FD e da constante liberação de estradiol. Devido à baixa P4 sérica, ocorrerá liberação de GnRH pelo centro pré-ovulatório com a elevação de estradiol, e por sua vez, de LH pela hipófise anterior, levando à maturação folicular e oocitária, luteinização do folículo pré-ovulatório e ovulação (FORDE *et al.*, 2011).

O proestro caracteriza-se pela baixa da P4 e aumento do estradiol (E2) sérico, devido ao desenvolvimento folicular, liberação de GnRH e posterior liberação de gonadotrofinas FSH e LH (DIRKSEN *et al.*, 1993). Ao final do proestro, o crescimento linear sérico do LH induzirá a maturação do FD com aumento nas secreções dos pulsos e amplitudes, bloqueando o crescimento dos folículos subordinados através do *feedback* negativo exercido sobre o centro tônico e hipófise anterior, que reduzirá a liberação de FSH (GINTHER *et al.*, 2019).

O estro ou cio é a fase em que a fêmea passa a demonstrar sinais de receptividade sexual, pela elevação nos níveis séricos de E2, seguida da indução da ovulação do FD. A fêmea aceita a monta do macho apenas no período do estro, que tem duração média de 11 a 18 horas (SÁ FILHO *et al.*, 2011). A alta concentração sérica de E2, sob níveis basais de P4 é que faz este comportamento, aonde é estimulado o centro sexual do comportamento em nível hipotalâmico (ROELOFS *et al.*, 2010). Com isso, ocorrerá a liberação de GnRH do centro pré-ovulatório, liberação do LH em alta amplitude e com frequências de 40 a 70 minutos por 2 a 3 dias, caracterizando o pico de LH pré-ovulatório e início do estro.

A ovulação de um oócito apto a ser fecundado ocorrerá em média de 10 a 14 horas após o final dos sinais de estro, ou seja, cerca de 20 a 30 horas após o início do estro e do pico de LH, já no início do metaestro (FORDE *et al.*, 2011). Neste estágio, concomitante à liberação do LH, o FSH também será estimulado a ser liberado, para o processo de recrutamento dos folículos da primeira onda do ciclo subsequente (GIBBONS *et al.*, 1997)

### **3.3 Dinâmica Folicular Bovina**

O fenômeno denominado de dinâmica folicular foi descrito pela primeira vez por Rajakoski (1960), representada pela fase dos folículos antrais terciários, ocorrendo durante o ciclo estral da fêmea. Com o advento da ultrassonografia, o padrão de ondas foliculares foi bem mais avaliado, passando a ser de 2 a 3 ondas, podendo chegar a 4 ondas em cada fêmea por ciclo estral (GINTHER *et al.*, 2017). Na presença de folículos terciários responsivos ao FSH, ocorre a emergência deste grupo de folículos dando início uma nova onda. Cada onda folicular é estimulada pelo aumento na concentração sérica de FSH (JAISWAL *et al.*, 2004).

Os eventos característicos da dinâmica folicular são: recrutamento de folículos terciários FSH-responsivos, seleção, desvio ou divergência e dominância de um folículo sobre os demais subordinados, que posteriormente sofrerão atresia (WEBB *et al.*, 2016).

### 3.3.1 *Recrutamento folicular*

Segundo Roche (2004), o recrutamento folicular acontece através da mobilização de um grupo de folículos antrais com diâmetro médio de 3 mm. É preciso que ocorra um aumento do FSH sérico para o crescimento dos folículos recrutados. A partir dos 4 mm os folículos passam a serem FSH-dependentes.

Atualmente, porém, já se conhecem inúmeros fatores e ligantes intraovarianos e extraovarianos que atuam desde o período de folículos primordiais até o recrutamento dos folículos terciários que passam a serem responsivos às gonadotrofinas. Contudo, os mecanismos de seleção dos folículos terciários ainda não são totalmente elucidados, devido ao grande número e sua intensa complexidade (JUENGEL *et al.*, 2018).

No recrutamento destes grupos foliculares, o número recrutado é de 5 a 10 (DRIANCOURT, 2001), podendo chegar a 24 folículos por onda folicular (MIHM & AUSTIN, 2002), com uma duração de crescimento comum por cerca de três dias. O período de crescimento comum vai do início do recrutamento da onda até o início do desvio folicular, coincidindo com o processo de seleção. Em média, a divergência do futuro FD é de 6 horas antes dos futuros subordinados. Esta divergência precoce do FD cria uma vantagem de crescimento e tamanho em relação aos futuros folículos subordinados, ao final da fase de crescimento comum. Os folículos que aparecem mais tarde em uma onda, crescem mais lentamente durante a fase de crescimento comum, e atingem um diâmetro máximo menor, podendo atingir um platô antes do final da fase de crescimento comum (PETER *et al.*, 2009).

Ao final da onda, após a ovulação, ou até mesmo antes da ovulação, desencadeado pelo pico de LH e pelas mudanças funcionais no FD, ocorre diminuição dos hormônios ovarianos, especialmente da inibina, liberando o bloqueio hipotalâmico-hipofisiário, levando a um novo aumento de FSH, e posterior emergência de uma nova onda de crescimento folicular, repetindo todo o processo (FORDE *et al.*, 2011).

### 3.3.2 *Seleção e dominância folicular*

Define-se seleção folicular como o processo no qual somente um folículo segue o curso do desenvolvimento (BARUSELLI *et al.*, 2007), passando pela maturação até a ovulação. Com isso, ocorre o fenômeno da divergência folicular. Na fase final de crescimento comum dos folículos, o respectivo folículo dominante, e em média de 2 a 4

folículos subordinados, são selecionados para continuarem o crescimento, com produção de estradiol e proliferação celular (BAO & GARVERICK, 1998).

Segundo Xu *et al.* (1995), o aumento da expressão de receptores de LH nas células da granulosa favorecem a seleção do respectivo folículo dominante. A relação intrafolicular das proteínas *insulin-like growth factor* (IGF) -I e *insulin-like growth factor binding protein* (IGFBP) -4 e -5 (SPICER, 2004), e o aumento de IGF-I livre no líquido intrafolicular do folículo dominante, através do aumento das proteases IGFBP -4 e -5, levam vantagem no crescimento folicular pelo sinergismo com o FSH e maior liberação de estradiol. Ambos os processos ocorrem simultaneamente no respectivo folículo dominante, sendo essenciais para a ocorrência do desvio folicular e a aquisição da dominância (GINTHER, 2016). O E2 e a inibina mais elevados irão causar um *feedback* negativo no centro tônico e na hipófise anterior, respectivamente, reduzindo os níveis séricos de FSH, o que determina a atresia dos folículos subordinados, que necessitam maiores níveis de FSH para continuarem o desenvolvimento.

### 3.3.3 *Desvio e dominância folicular*

O desvio folicular se define como a diferença na taxa de crescimento entre os dois maiores folículos de uma onda, que é determinado através da ultrassonografia de forma retrospectiva, com um desvio aparente. Entretanto, o momento do desvio não deve ser confundido com o processo da seleção, que se refere ao fenômeno da redução do número de folículos recrutados em uma onda, para posteriormente ovularem. Assim, o desvio folicular é marcado no final da seleção, sendo o ponto inicial do período da dominância folicular (IRELAND *et al.*, 2000).

A seleção do respectivo folículo dominante é representada pelo processo do desvio folicular, iniciando próximo das 12 horas antes do início do desvio folicular (GINTHER, 2016). Há um padrão caracterizado para o desvio folicular, onde o respectivo folículo dominante alcança o diâmetro de 8,5 mm em aproximadamente 2,5 dias, enquanto os subordinados atingem diâmetros em torno de 7 mm. Porém, um folículo somente se torna dominante no momento em que for maior do que 7 mm, ou seja, se o folículo dominante foi removido possuindo 8,5 mm, e o subordinado for maior que 7 mm, este passará a assumir a hierarquia e entrará espontaneamente no processo de desvio folicular (GINTHER *et al.*, 2001a).

### 3.4 Diferenças na fisiologia reprodutiva de fêmeas *Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*

As singularidades fisiológicas de fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* geram respostas reprodutivas diferentes em muitos aspectos (BARUSELLI *et al.*, 2007). O *pool* de folículos antrais que parece ser maior em fêmeas *Bos taurus indicus* (especialmente em vacas Nelore) do que em *Bos taurus taurus*, é um exemplo clássico de diferenças fisiológicas reprodutivas entre as subespécies (SILVA-SANTOS *et al.*, 2011).

No momento da emergência das respectivas ondas foliculares, estudos observaram que em raças zebuínas (Nelore e Gir) há uma média de  $33,4 \pm 3,2$  folículos pequenos em comparação com  $25,4 \pm 2,5$  folículos pequenos em raças taurinas (Angus e Holandesa) (CARVALHO *et al.*, 2008). Diferentes concentrações de IGF-I podem estar associadas entre as diferenças das populações foliculares. Alvarez *et al.* (2000) observaram que há concentrações maiores de IGF-I em vacas zebuínas e menores concentrações de FSH, em comparação as fêmeas taurinas (BARROS & NOGUEIRA, 2001).

No momento do desvio e da dominância folicular também há diferenças entre as subespécies, sendo as fêmeas zebuínas com menores diâmetros dos folículos nestes eventos. O tamanho do futuro FD e seu folículo subordinado imediato é de 5,5 a 6,5 mm para as fêmeas taurinas e de 5,0 a 6,0 mm para as fêmeas zebuínas (GIMENES *et al.*, 2008). No diâmetro máximo do FD as fêmeas taurinas apresentam de 12 a 22 mm, enquanto as fêmeas zebuínas atingem entre 10 a 13 mm (MACHADO *et al.*, 2008).

Diferença no estro comportamental é outra particularidade encontrada entre as fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, com a manifestação de estro em fêmeas zebuínas sendo geralmente caracterizada por um período mais curto, de aproximadamente 10 h de duração, com variação de 1 a 20 h (BÓ *et al.*, 2003). Assim, mais que 50% das fêmeas zebuínas iniciam os sinais da manifestação de estro no período noturno, e cerca de 30% iniciam e terminam o estro durante a noite (PINHEIRO *et al.*, 1998).

Entretanto, a duração do ciclo estral é idêntica entre fêmeas zebuínas e fêmeas taurinas, de 20 a 22 dias, com predominância de 2 a 3 ondas foliculares no intervalo interovulação (FIGUEIREDO *et al.*, 1997), muito embora já se tenha observado a ocorrência de 4 a 5 ondas foliculares entre duas ovulações em fêmeas zebuínas, especialmente em novilhas Nelore (MOLLO *et al.*, 2007) e vacas das raças Gir e Brahman (VIANA *et al.*, 2000).

### 3.5 Princípios da IATF e efeito dos métodos alternativos de controle da onda folicular

Inúmeras são as biotecnologias disponíveis para aumentar os índices reprodutivos. A inseminação artificial (IA) é uma biotécnica reprodutiva que tem sido muito utilizada em fazendas. Através dela é possível promover melhoramento genético do rebanho pela utilização de sêmen de touros testados e provados como melhoradores. Contudo, quando se utiliza a IA com base na detecção de estro, poderá se obter resultados insatisfatórios devido a falhas na detecção do estro (SÁ FILHO *et al.*, 2013). Todavia, a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) merece destaque, pois é uma biotécnica de reprodução assistida que visa sincronizar a ovulação da fêmea para inseminar em dia e horário pré-determinado, ou seja, não havendo necessidade de detecção de estro (GOTTSCHELL *et al.*, 2008).

Pensando em facilitar e evitar falhas na detecção de estro, foi desenvolvido na década de 1990 um protocolo hormonal, denominado “Ovsynch”, que permitiu a inseminação em tempo pré-determinado de todas as fêmeas tratadas (PURSLEY *et al.*, 1995). A partir disto, diversos protocolos foram desenvolvidos, sendo a combinação de hormônios como a prostaglandina (PGF<sub>2α</sub>), progesterona (P4), estrógeno (E2), hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH) e gonadotrofina coriônica equina (eCG) para controlar o ciclo estral da fêmea (WILTBANK; PURSLEY, 2014). Porém, é importante salientar que o uso de cada protocolo vai de encontro com a viabilidade econômica, aplicabilidade e principalmente sobre a legislação vigente de cada país.

Com a utilização da IATF, além de não haver a necessidade de observação de estro, essa biotécnica oferece melhoramento genético, a padronização de terneiros, concentração dos partos e a diminuição da estação de monta (SÁ FILHO *et al.*, 2013). Em novilhas a escolha adequada de um protocolo de IATF é um ponto importante para que se alcance altas taxas de prenhez (GUTIERREZ *et al.*, 2014).

Os princípios dos protocolos de IATF baseiam-se na indução de uma nova onda de crescimento folicular, também prolongando a fase luteínica de maneira artificial com a aplicação de progesterona exógena (COLAZO & MAPLETOF, 2014).

#### 3.5.1 Sincronização da onda folicular

No final da década de 1980, com o advento da ultrassonografia (US), houve a possibilidade de um melhor entendimento da dinâmica folicular bovina e os efeitos que os hormônios causavam sob as estruturas ovarianas em diferentes momentos do ciclo. Com

isso, na década de 1990, foi permitindo que os principais métodos de manipulação e sincronização de uma nova onda folicular fossem executados (PURSLEY *et al.*, 1995). Hoje em dia, formas evoluídas destes protocolos são amplamente utilizadas, com variações e aprimoramentos, com os conceitos se mantendo ao longo das décadas (MAPLETOFT *et al.*, 2018).

#### 3.5.1.1 Método hormonal

A combinação de progestágenos com estrógenos para induzir o estro em novilhas já vem sendo muito utilizado como forma de mimetizar as alterações fisiológicas que acontecem nas concentrações hormonais circulantes durante o período da puberdade (PATTERSON *et al.*, 1999). No estudo desenvolvido por WHISNANT & BURNS (2002) em novilhas, após a retirada do implante de progesterona houve um comportamento de estro e elevada concentração de P4 plasmática, consistente com a formação de um corpo lúteo após a ovulação, o que corrobora com o papel importante da P4 em protocolos hormonais de sincronização do estro e ovulação em bovinos.

COLAZO *et al.* (2003) observaram em novilhas púberes que o diâmetro do folículo dominante também sofre influência quando utilizou P4 exógena. Em seu estudo, observaram que novilhas de corte tratadas com CIDR<sup>®</sup> durante 9 dias de protocolo apresentaram diâmetros maiores (12,8 mm) em comparação a fêmeas que foram tratadas por 8 dias (10,8 mm), com o intervalo entre a remoção do DIV e a ovulação sendo menor para as novilhas tratadas por 9 dias com o DIV de P4. Entretanto, a utilização da P4 injetável em associação com a inserção do DIV de P4 em novilhas resultou em um maior intervalo entre a remoção do CIDR<sup>®</sup> e o estro, em comparação com o grupo controle, resultando também em menores taxas de estro comportamental e de concepção (COLAZO *et al.*, 2006).

Outros estudos relataram haver falhas na indução de uma nova onda folicular, em menor e maior grau (0 a 20%), nos protocolos baseados nos ésteres de estradiol, como o benzoato de estradiol (BE), valerato de estradiol (VE) e o Estradiol-17 $\beta$  (E-17 $\beta$ ), em associação a um dispositivo intravaginal (DIV) de P4 (MADUREIRA *et al.*, 2020).

Os ésteres de estradiol encontram-se disponíveis em três diferentes formas farmacológicas principais, cada qual apresentando diferentes metabolizações e períodos de meia-vida sanguínea: valerato de estradiol (VE), benzoato de estradiol (BE) e cipionato de estradiol (CE). Quando é utilizado no início do protocolo em associação ao progestágeno, a

finalidade destes hormônios é de promover atresia dos folículos existentes, induzindo o surgimento de uma nova onda de crescimento folicular, entre 3 a 5 dias após aplicação. Entretanto, quando se aplica na retirada do DIV de P4, sua funcionalidade é favorecer a liberação do GnRH, auxiliando no processo de ovulação (PERALTA-TORRES *et al.*, 2010).

A base fisiológica no tratamento com ésteres de estradiol no início do protocolo hormonal é de simular a ação que o FD causa sobre os folículos subordinados, sob alta concentração de P4. O princípio deste protocolo é de que os aumentos séricos nos níveis de estradiol causam a redução do padrão pulsátil de liberação de GnRH pelo centro tônico hipotalâmico, levando à redução nos níveis séricos de FSH, que por sua vez leva à atresia dos folículos FSH-dependentes presentes nos ovários no momento da aplicação do éster de estradiol. Após a depuração do estradiol, uma elevação de FSH leva à emergência de uma nova onda folicular subsequente, em média 4 dias após a aplicação do hormônio (CUNHA, 2021).

Conforme FURTADO *et al.* (2011), o protocolo a base de CE e P4 gera atresia folicular de todos os folículos existentes nos ovários, com a formação de uma nova onda folicular, apesar da meia vida mais prolongada do CE, cerca de 10 a 12 dias. Porém, COLAZO *et al.* (2003) demonstraram que, ao iniciar um protocolo de sincronização comparando a utilização de CE e 17 $\beta$  estradiol, a emergência da onda folicular foi mais variável e com tendência a ocorrer mais tardiamente quando com CE. Isto porque ocorre elevada concentração de estrógeno ocasionada pelo tratamento com CE, provocando menor concentração de FSH circulante com liberação durante um intervalo mais prolongado.

Entretanto, para o tratamento com 17 $\beta$  estradiol, as concentrações de estrógeno são altas e por um período mais curto. Outra opção é a utilização do BE, que por ser um análogo sintético de ação estrogênica tem a mesma eficiência do 17 $\beta$  estradiol na indução de uma nova onda de crescimento folicular e na sincronização da ovulação (MARTÍNEZ *et al.*, 2005). Protocolos que iniciam com BE e DIV de progestágenos resultam em boas taxas de sincronização com o início da emergência de uma nova onda de crescimento folicular em torno de 4 dias após o tratamento (BÓ *et al.*, 2003),

A liberação do pico de LH quando se utiliza BE ocorre dentro de um intervalo de 16 a 30 horas. Conforme CAVALIERI *et al.* (2002), com novilhas meio-sangue zebuino de corte, houve um intervalo de  $50,4 \pm 1,7$  h entre a aplicação de BE e a ovulação. Já

(FERRAZ, 2007) observaram um intervalo entre a aplicação do segundo BE e a ovulação de  $40,6 \pm 1,47$  h para novilhas Nelore. Já a administração do CE simultâneo à retirada do DIV de P4 promove a ovulação em cerca de 60 a 72 h após a aplicação (PERALTA-TORRES *et al.*, 2010).

Atualmente, o protocolo hormonal mais comumente utilizado para a IATF de fêmeas bovinas de corte inclui a administração de BE e do uso de DIV de P4 no D0, remoção do DIV de P4 e administração de CE e PGF<sub>2α</sub> (com ou sem eCG) entre os D7 e D9, com a IATF ocorrendo 48 a 56 h após retirada do DIV (CUNHA, 2021).

### 3.5.2 *Potenciais falhas dos protocolos, pontos vulneráveis e variações biológicas*

Em programas de IATF a estratégia de utilização dessa biotécnica em novilhas cíclicas é criar um ambiente que favoreça o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório por meio de menores concentrações de P4, fornecendo um suporte gonadotrófico exógeno (SÁ FILHO *et al.*, 2009).

Aparentemente, uma possível razão para a ocorrência da baixa fertilidade se deva a um menor CL formado a partir de um FPO menor, o qual, conseqüentemente, secretará menores concentrações de P4 (VASCONCELOS *et al.*, 2001). Concentrações adequadas de P4 nessa fase são fundamentais para o desenvolvimento embrionário reconhecimento materno-fetal e manutenção da gestação. Novilhas que ovulam folículos muito grandes também têm redução na fertilidade. Uma possível explicação para isto seria a ocorrência de folículos persistentes, que geralmente são caracterizados como folículos de diâmetro acima do esperado para folículos ovulatórios, com considerável diminuição na qualidade oocitária (KINDER *et al.*, 1996).

Em seu estudo, Dias (2015), descreveu que novilhas Nelore com baixa concentração de P4 possuem maior diâmetro folicular do que novilhas nelore, com alta concentração de P4 (1,72 ng/mL e 12,66 mm e 8,34 ng/mL e 9,45 mm, respectivamente). Ainda, ambientes com maiores concentrações de P4, os FPO que se desenvolvem apresentam menor expressão de mRNA do receptor de LH e da enzima aromatase nas células da granulosa, assim como menor concentração de estradiol intrafolicular. A P4 possui uma relação inversa com o LH, ou seja, altas concentrações suprimem a pulsatilidade de LH, e diminuem o desenvolvimento ou ocasionam a atresia do folículo dominante (KOJIMA *et al.*, 2003). Entretanto, as concentrações subluteais de P4 estimulam a pulsatilidade de LH (PFEIFER *et al.*, 2009).

Outro fator responsável pela variação dos resultados na IATF é a resposta de novilhas pré-púberes. Novilhas que não apresentam um CL ou que não respondem aos protocolos de indução no início do protocolo de IATF apresentam uma menor taxa de prenhez do que aquelas que se apresentam cíclicas, com a presença de um CL ou após protocolos de indução de puberdade (SÁ FILHO *et al.*, 2010).

Realizou-se um estudo em novilhas nelore púberes sobre os efeitos das concentrações de P4 no início e durante o protocolo de IATF (DIAS *et al.*, 2009). Até o dia 7 do protocolo, as concentrações circulantes de P4 não tiveram efeito sobre a fertilidade, sugerindo que se há efeitos da P4, este ocorrerá após o dia 7, quando a dominância folicular já ocorreu. Conforme já mencionado, há menor expressão de receptores de LH, bem como menor concentração intrafolicular de estradiol, em folículos dominantes que crescem em altas concentrações de P4 (DIAS, 2015), ocasionando uma baixa na fertilidade das fêmeas. O estradiol, tem ação sob a fertilidade, o transporte espermático o ambiente uterino e a formação do CL subsequente (VASCONCELOS *et al.*, 2001). Então, o excesso de P4 em protocolos com novilhas deve ser evitado.

A reutilização de DIV de P4 de terceiro uso em novilhas é uma opção interessante (RODRIGUES *et al.*, 2009). Com tal estratégia, os autores relataram taxas de prenhez em novilhas Nelore com a utilização de DIV 3º uso de 39,7% em relação aquelas que utilizaram DIV monodose 37,5% com o grupo de novilhas de DIV 3º uso que apresentavam folículos menores que 8 mm, com taxa de prenhez de 22%. Entretanto, Figueredo *et al.* (2019) relataram taxas de prenhez em novilhas Nelore, com uso de DIV monodose, com 67,5% em relação ao DIV de 3º uso com taxa de prenhez (48,18%). Conforme Almeida *et al.* (2011) a reutilização dos DIV de P4 permite um desenvolvimento adequado das ondas foliculares e da indução de ovulação, devido à baixa concentração circulante de P4 do DIV.

Outro fator associado às taxas de prenhez é o escore de condição corporal (ECC), que demonstra vantagens de no mínimo 3 pontos na escala de 1 a 5. Aumentos de 0,4 pontos na escala de ECC elevaram as chances de prenhez em 25% em vacas e novilhas das raças Angus e Brangus (TAROUCO *et al.*, 2020).

Abreu *et al.* (2018) correlacionaram o ECC e a taxa de prenhez em novilhas Brangus e cruzas de 24 meses. Os escores variaram de 2,5, 3,0 e 3,5 na escala de 1 a 5. Concluíram que a taxa de prenhez foi consideravelmente maior quando foram acrescentados 0,5 unidades no ECC das fêmeas, com o percentual de prenhez sendo de

34,7%, 41,3% e 61,3% respectivamente. Outros autores também observaram correlações significativas entre o ECC e a probabilidades de prenhez (TORRES *et al.*, 2015).

### 3.5.3 Princípios dos indutores da ovulação e a funcionalidade do GnRH como um indutor de ovulação

Embora os protocolos de sincronização de estro que fazem uso de E2 e P4 sejam efetivos, a sincronização dos estros e das ovulações se distribui em um intervalo de aproximadamente 48 horas. Devido a esta distribuição incorporaram-se indutores da ovulação aos protocolos. A funcionalidade dos indutores da ovulação se dá através da sincronia adequada entre a ovulação e a IATF. Estes fármacos indutores agem por retroalimentação positiva na liberação pulsátil de LH (estrógenos e GnRH) ou agem diretamente nos receptores de LH das células da granulosa dos folículos (hCG e LH) (BARUSELLI *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de novos métodos de sincronização da ovulação em bovinos surgiu pelo uso de um análogo do GnRH no sentido de alterar a dinâmica folicular (WILTBANK *et al.*, 1989). A função do GnRH é de induzir o pico pré-ovulatório de LH e a ovulação do folículo maduro (BRAGANÇA *et al.*, 2013). Dois centros diferentes do hipotálamo sintetizam e secretam o GnRH. O centro tônico secreta de forma contínua e o centro controlador da onda pré-ovulatória libera grandes quantidades de maneira única, através do sistema porta-hipotalâmico-hipofisário (MARTEMUCCI & D'ALESSANDRO, 2011). A administração exógena de GnRH simula a liberação endógena do centro pré-ovulatório, o que determina a liberação subsequente de LH.

Conforme BARROS *et al.* (2005), o protocolo mais utilizado para IATF no início do século consistia na administração de 2,0 mg BE associado à inserção do DIV de P4, sendo este considerado o dia zero (D0) do protocolo. Após os 8 dias (D8), retirava-se o DIV e aplicava-se 0,50 mg de PGF<sub>2α</sub>; 24 horas após a retirada do DIV aplicava-se 1,0 mg de BE. No dia 10 (D10) realizava-se a IATF. A aplicação de 0,5 mg a 1,0 mg BE nas 24 horas após a retirada do DIV sincroniza o estro e a ovulação, aumentando o número de fêmeas que ovulam após o tratamento (McMILLAN, 1999). Porém, tal protocolo demanda quatro manejos das fêmeas, o que é uma desvantagem. Atualmente, o protocolo utilizando CE no dia da remoção do DIV de P4 substituiu o BE no dia seguinte, reduzindo um manejo (CUNHA, 2021).

Pensando em novos modelos de protocolos, Moreira *et al.* (2000) testaram efeitos sob a aplicação de GnRH entre 0, 12, 24 e 36 horas após a retirada do DIV de P4, com a IATF ocorrendo 12 horas após a aplicação do GnRH. Os autores não observaram diferenças em relação à sincronização de estros nas vacas. Contudo, com o aumento no intervalo entre a retirada do DIV e a aplicação de GnRH, houve um aumento também no diâmetro do folículo pré-ovulatório de forma significativa. As taxas de prenhez apresentaram crescimento linear conforme aumentou o intervalo entre a aplicação de PGF<sub>2α</sub> e a aplicação de GnRH.

Segundo Peters & Pursley (2003), o efeito negativo da redução no tempo da administração do GnRH sobre as taxas de prenhez possivelmente se deva à alta porcentagem de fêmeas que desenvolvem uma curta duração da fase lútea, que resulta em ovulação de um folículo pequeno. O aumento do intervalo entre a regressão do CL que é provocada pela PGF<sub>2α</sub> e o pico pré-ovulatório de LH, influenciado pelo GnRH, pode favorecer a sobrevivência e o transporte dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea.

### 3.6 Novilhas

Um parâmetro utilizado para mensurar e analisar a eficiência reprodutiva do rebanho é através da precocidade sexual da fêmea bovina, por meio da idade à puberdade ou idade ao primeiro parto. A idade do rebanho está inteiramente ligada a sua eficiência, ou seja, quando há redução na realização do primeiro acasalamento, observa-se melhora reprodutiva, devido à maior pressão de seleção, escolha precoce de melhores matrizes e uma diminuição no intervalo entre gerações (VAZ *et al.*, 2010).

Considera-se puberdade na fêmea, a partir da idade em que se manifesta o primeiro estro acompanhado da ovulação e desenvolvimento de um corpo lúteo funcional e início da atividade cíclica ovariana. Há diferenças entre as novilhas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* ao manifestarem sinais de puberdade, onde as novilhas taurinas apresentam-se púberes entre 10 a 15 meses e as novilhas zebuínas mais tardiamente, entre 22 e 36 meses de idade (SANTOS; SÁ FILHO, 2006).

A disponibilidade de nutrientes, peso, escore de condição corporal e genótipo são fatores que atuam sobre o desenvolvimento da puberdade em novilhas. A falta de alimento atrasa o crescimento dos animais, prejudicando o bom desenvolvimento, retardando o início da puberdade, causado por níveis inadequados de LH, que é essencial para a

progressão dos folículos ovarianos até a fase pré-ovulatória, e com isso ocorre menor produção de estradiol e a fêmea não apresenta ovulação (VAZ *et al.*, 2010).

Sabe-se que a utilização da IATF em novilhas de corte proporciona muitas vantagens, como a indução precoce da ciclicidade, aumento da produção de bezerros devido a uma maior percentagem de novilhas parindo (GUTIERREZ *et al.*, 2014). A principal causa que leva ao não estabelecimento da prenhez em novilhas durante a primeira temporada de reprodução é a incapacidade da fêmea em atingir a puberdade (VASCONCELOS *et al.*, 2017).

Conforme Silva *et al.* (2018), a taxa de ciclicidade nos rebanhos do Rio Grande do Sul em novilhas taurinas de corte aos dois anos de idade e com peso corporal de  $300 \pm 20$  kg varia entre 60 e 80% no início da estação reprodutiva. Em resposta a programas de IATF, as taxas de prenhez alcançadas em novilhas de corte variam entre 40 e 60%, de acordo com a funcionalidade ovariana ao início dos protocolos, onde a maioria, faz uso de dispositivos de liberação de progesterona (P4) associado ao uso de estradiol (E2) para sincronizar a emergência da onda folicular (BÓ *et al.*, 2018).

Embora existam muitas vantagens no uso da IATF em novilhas de corte, os protocolos possuem alguns desafios únicos nessa categoria de fêmeas, como a falta de ciclicidade ou maturidade uterina (BISHOP *et al.*, 2016). A sincronização do momento da ovulação com a IA tem sido fundamental para otimizar a fertilidade durante os programas de IATF nesta categoria.

Estudos avaliaram a fertilidade de protocolos de IATF utilizando diferentes formas de indução da ovulação em vacas leiteiras em lactação e vacas de corte lactantes (USLENGHI *et al.*, 2014) com resultados variáveis e diferenças na fertilidade. Entretanto, estas importantes comparações ainda não foram registradas em novilhas de corte.

Observou-se em estudos recentes um aumento da fertilidade em novilhas de corte que possuem um CL no início do protocolo. Dois outros fatores relacionados à fertilidade durante programas de IATF foram analisados, como o tamanho do folículo pré-ovulatório (MARTINS *et al.*, 2014) e a expressão do estro antes da IATF em protocolos que utilizam E2 ou GnRH (BISHOP *et al.*, 2016) como indutores de ovulação. Com isso, torna-se importante o desenvolvimento de estudos que tenham domínio sobre a utilização adequada dos protocolos de IATF tanto para vacas como novilhas, proporcionando quaisquer melhorias na biotécnica, seja em aplicação de um indutor de ovulação com melhor efetividade e melhorias nas taxas de prenhezes.

Assim, este estudo tem como objetivo comparar dois diferentes indutores de ovulação comumente utilizados, ECP ou GnRH aplicado 34 horas após remoção do dispositivo de progesterona, num protocolo de IATF para novilhas de corte. Quatro variáveis reprodutivas foram registradas e comparadas, incluindo: expressão de estro próximo ao final do protocolo, tamanho do folículo pré-ovulatório e gestação por IA (P/IA).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Aspectos éticos**

Os procedimentos com animais foram realizados de acordo com as leis brasileiras de ética e de bem estar animal em pesquisa, e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Projeto/protocolo CEUA/UFRGS nº 43372).

### **4.2 Animais e propriedades**

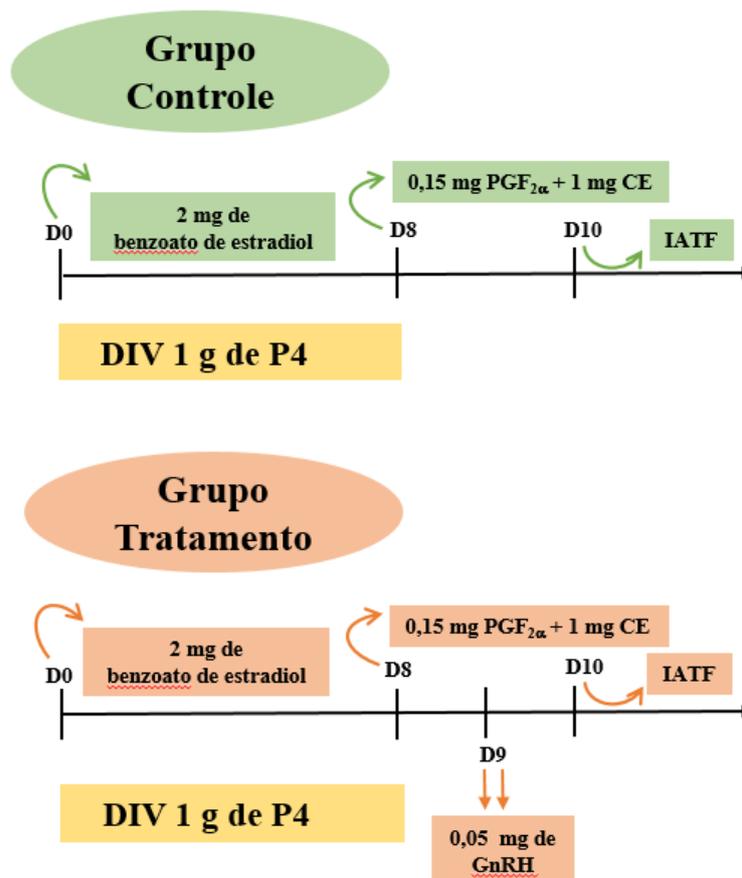
Fêmeas de corte das raças Hereford e Braford (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*), com idade média de 24 meses, foram mantidas em condição extensiva em pastagem nativa nas propriedades, com água e sal mineral disponibilizados *ad libitum*.

Foram utilizadas quatro fazendas, com 116, 102, 76 e 96 fêmeas em cada fazenda. Durante o experimento, os animais foram mantidos em piquetes, e apenas conduzidos à mangueira para a realização dos manejos propostos.

Todas as fêmeas apresentavam protocolo vacinal em dia. Durante os manejos no tronco de contenção, as fêmeas foram observadas quanto ao estado de saúde geral, e qualquer animal que fosse acometido por enfermidade, foi removido do experimento. As fêmeas foram avaliadas individualmente, avaliando peso e escore de condição corporal.

### **4.3 Delineamento experimental**

Um total de 390 fêmeas de 24 meses selecionadas foram submetidas a um protocolo hormonal padrão de sincronização do estro e da ovulação para IATF, de acordo com Crepaldi (2009) e Peralta-Torres *et al.* (2010). As fêmeas foram distribuídas de forma aleatória em (1) Grupo Controle (n=195) e (2) Grupo Tratamento (n=195), que consistiu em protocolo hormonal idêntico ao do grupo Controle, exceto pela aplicação de análogo de GnRH 34 horas após a retirada de inserto intravaginal de progesterona (P4), como um indutor adicional de ovulação, conforme apresentado na Figura 1.



**Figura 1.** Protocolos de IATF utilizados no Grupo Controle e no Grupo Tratamento para a sincronização de uma nova onda folicular em novilhas de corte Hereford e Braford.

#### 4.4 Protocolos hormonais e IATF - Grupos controle e tratamento

Em ambos os grupos, no D0 do protocolo, aplicou-se uma dose de 2 mg de benzoato de estradiol (BE; Bioestrogen<sup>®</sup>, Biogénesis Bago, Curitiba, PR, Brasil) por via im, juntamente com a inserção de um dispositivo intravaginal (DIV) de 1 g de progesterona (P4; Repro Neo<sup>®</sup>, Biogénesis Bago, Curitiba, PR, Brasil). No D8 do protocolo, realizou-se a remoção do DIV de P4 juntamente com a administração i.m. de um hormônio luteolítico análogo sintético da PGF<sub>2α</sub> (0,15 mg de acetato de d-cloprostenol; Croniben<sup>®</sup>, Biogénesis Bago, Curitiba, PR, Brasil) e também um hormônio indutor de ovulação (1 mg de cipionato de estradiol ou CE; Croni-CIP<sup>®</sup>, Biogénesis Bago, Curitiba, PR, Brasil).

No Grupo Tratamento, no D9, 34 horas após a remoção do DIV de P4, administrou-se um hormônio indutor de ovulação adicional, um análogo sintético do GnRH (0,05 mg de leirelina, TEC-Relin<sup>®</sup>, Agener União, São Paulo, SP, Brasil), por via i.m.

No D10 foi realizada a IATF nas fêmeas de ambos os grupos, com sêmen bovino congelado comercial, 48 h após a remoção do DIV de P4. Foram utilizados dois touros. Em ambos os grupos foi feita a marcação dos animais com tinta na região sacro-caudal no D8 (remoção do DIV) para a avaliação da manifestação do estro, como um método de observação auxiliar.

#### **4.5 Avaliação da dinâmica folicular por meio de ultrassonografia em tempo real**

Um subgrupo amostral de fêmeas foi utilizado para realizar a dinâmica folicular ovariana. Grupo Controle (n=7) e Grupo Tratamento (n=10), em três avaliações (D8, D9, D10) a cada 24 h, iniciando-se na remoção do DIV de P4 (D8) até o momento da IATF (D10), por meio de ultrassonografia em tempo real utilizando-se um transdutor transretal linear com frequência de 7,5 MHz em Modo B. As transposições de imagens das estruturas  $\geq 5$  mm foram realizadas para fichas individuais para cada fêmea, as quais foram topograficamente desenhadas nos locais respectivos a cada ovário. Foi mantido um padrão de acompanhamento individual de cada estrutura, pela setorização por quadrantes dos ovários, e a cada avaliação procuravam-se as estruturas identificadas na avaliação anterior, de acordo com a metodologia descrita por Pierson & Ginther (1984). Realizou-se o acompanhamento da dinâmica folicular, com o objetivo de melhor acompanhar o crescimento do folículo dominante (FD) e identificar o momento mais próximo da ovulação do folículo pré-ovulatório (FPO).

#### **4.6 Avaliação da função lútea**

Foram utilizadas 15 fêmeas de um subgrupo amostral para avaliação da função lútea. Grupo Controle (n=7) e Grupo Tratamento (n=8), amostras de sangue venoso foram coletadas nos dias 7 e 12 após a IATF por venopunção da veia coccígea média em sistema de vácuo. Após a coagulação, as amostras de sangue foram centrifugadas a 500 g por 3 min para a separação do soro; em seguida, foram acondicionados em frascos previamente rotulados e conservados em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O soro sanguíneo foi submetido à mensuração da concentração sérica de P4 pelo método de quimioluminescência, em laboratório comercial certificado, com o uso de kits comerciais (ROCHE<sup>®</sup>, Roche Diagnóstica Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), com variação inter e intra ensaio  $<10\%$ .

#### **4.7 Diagnóstico de prenhez**

O diagnóstico de prenhez foi realizado no dia 30 após a IATF por meio de ultrassonografia em tempo real utilizando-se um transdutor transretal linear com frequência de 7,5 MHz em Modo B.

#### **4.8 Análise estatística**

A análise estatística foi conduzida usando o software JMP (SAS Institute Inc., Cary, USA). A distribuição dos dados foi testada com o teste Shapiro-Wilk, sendo os mesmos normalizados quando necessário. Os dados contínuos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido dos testes de Tukey para comparação de médias. As correlações foram testadas por regressão logística. Foi considerado estatisticamente significativo  $P \leq 0,05$ . Todos os resultados são apresentados em médias  $\pm$  SEM.

## 5. RESULTADOS

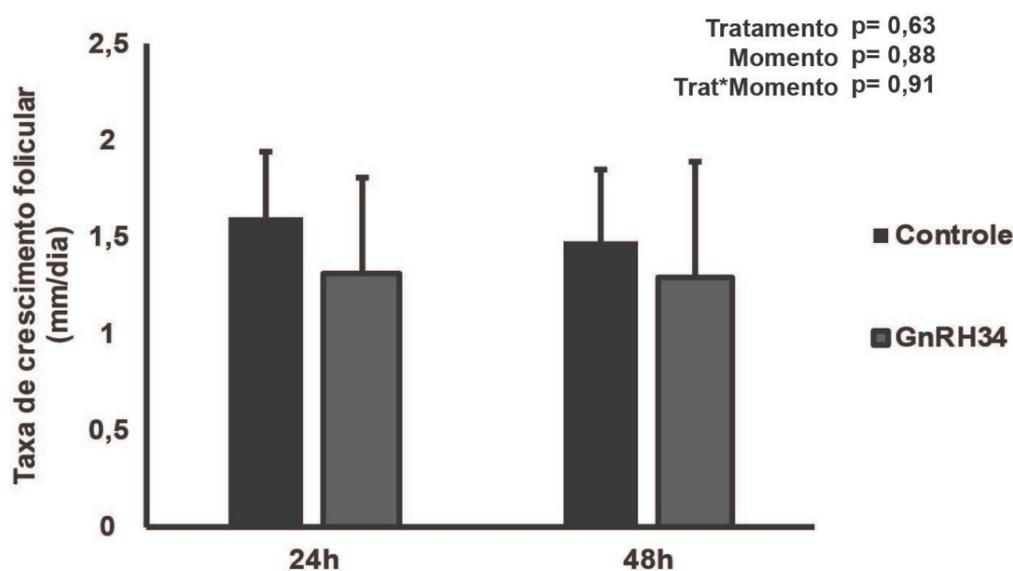
### 5.1 Avaliação da dinâmica folicular do subgrupo amostral

Não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais (Grupo Controle n=7; Grupo Tratamento n=10) do sub-grupo da dinâmica folicular ovariana, quanto ao diâmetro do folículo pré-ovulatório, da taxa de ovulação e de manifestação de estro, conforme apresentado na Tabela 1. A taxa de crescimento folicular médio diário do folículo dominante (FD) até o FPO, do dia 8 ao dia 10 do protocolo hormonal de IATF, também não diferiu entre os grupos experimentais (P=0,630), conforme a Figura 2.

**Tabela 1.** Diâmetro do folículo pré-ovulatório (FPO), taxa de ovulação, manifestação de estro e taxa de prenhez em novilhas de 24 meses, de acordo com o grupo experimental (Controle vs Tratamento)

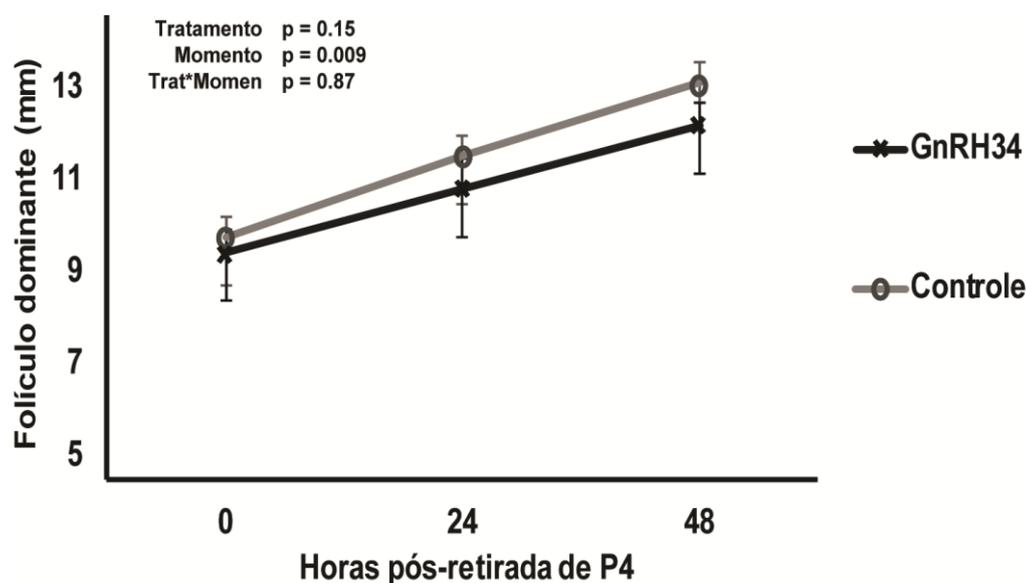
Parâmetros	Grupo Controle (n=7)	Grupo Tratamento (n=10)
Diâmetro FPO (mm)	13,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	12,3 ± 0,5 <sup>a</sup>
Taxa de ovulação (%)	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
Manifestação estro (%)	100 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>
Taxa de prenhez (%)	71 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>: Números seguidos de letras desiguais na linha diferem, para P<0,05



**Figura 2.** Taxa de crescimento folicular médio diário do folículo dominante (FD) até o folículo pré-ovulatório (FPO), do sub-grupo da dinâmica folicular ovariana de acordo com os grupos experimentais (Grupo Controle, n=7; Grupo Tratamento, GnRH34, n=10).

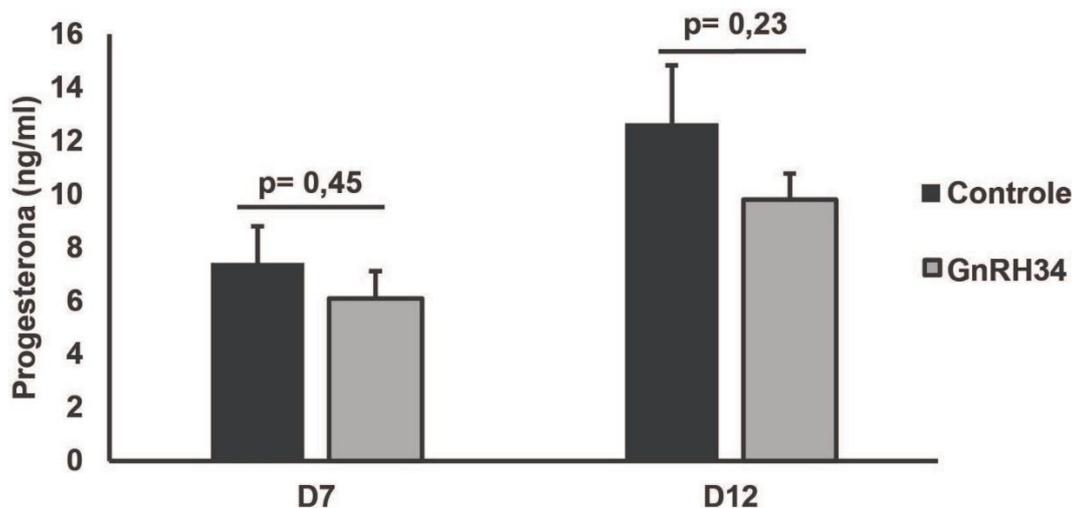
O tratamento com GnRH 34 h após a remoção do DIV de P4 não influenciou o crescimento folicular subsequente, não havendo diferença entre os grupos experimentais, do sub-grupo amostral da dinâmica folicular ovariana, ( $P=0,150$ ), como ilustrado na Figura 3. Contudo, houve diferença entre os dias de avaliação (momento da avaliação,  $P=0,009$ ), entre os dias 8 e 9, e 9 e 10, independente dos grupos experimentais do sub-grupo amostral da dinâmica folicular ovariana, sem a existência de uma interação entre os grupos experimentais e o momento de avaliação.



**Figura 3.** Diâmetro folicular diário do folículo dominante (FD) até o folículo pré-ovulatório (FPO) do sub-grupo da dinâmica folicular ovariana do dia 8 ao dia 10 do protocolo de IATF de acordo com os grupos experimentais (Grupo Controle,  $n=7$ ; Grupo Tratamento, GnRH34,  $n=10$ ).

## 5.2 Avaliação da função lútea

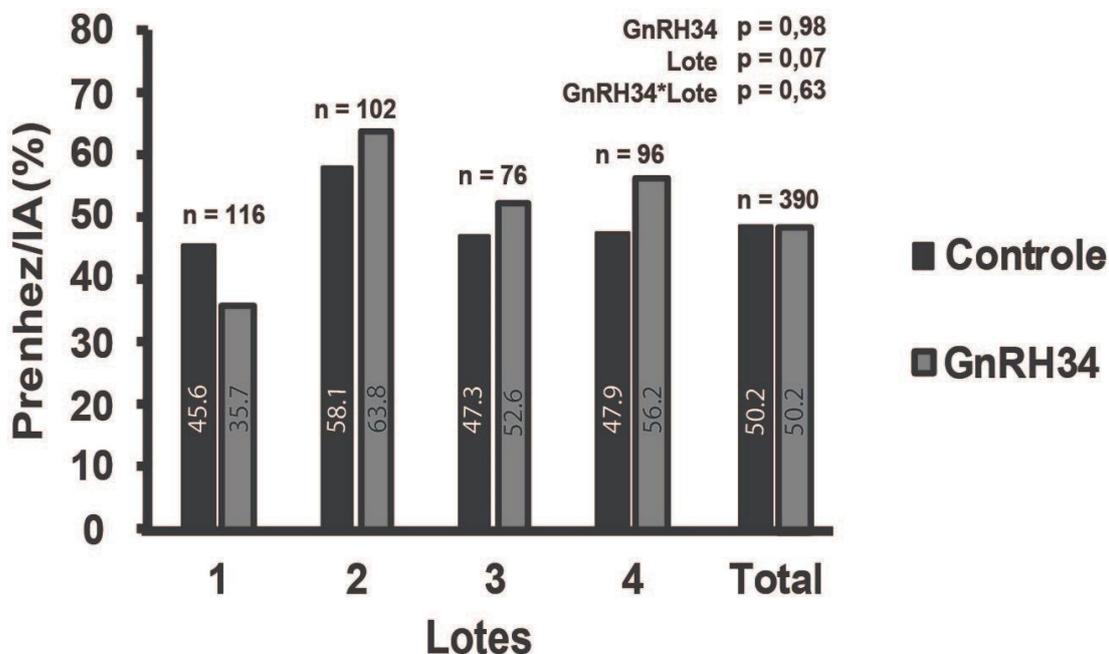
A função lútea, definida pelos níveis séricos de P4 nos dias 7 e 12 após a IATF em novilhas de 24 meses do sub-grupo amostral da função lútea (Grupo Controle  $n=7$ ; e Grupo Tratamento  $n=8$ ), não diferiu entre os grupos experimentais (Figura 4). Houve diferença nas concentrações de P4 somente entre os dias 7 e 12 pós-IATF ( $P=0,004$ ), independente dos grupos experimentais do sub-grupo amostral da função lútea, sendo mais elevada no dia 12, sem a existência de uma interação entre os grupos experimentais e os dias de avaliação.



**Figura 4.** Concentrações séricas de P4 do sub-grupo de novilhas da avaliação da função lútea, nos dias 7 e 12 após a IATF, de acordo com os grupos experimentais (Grupo Controle, n=7; Grupo Tratamento GnRH34, n=8).

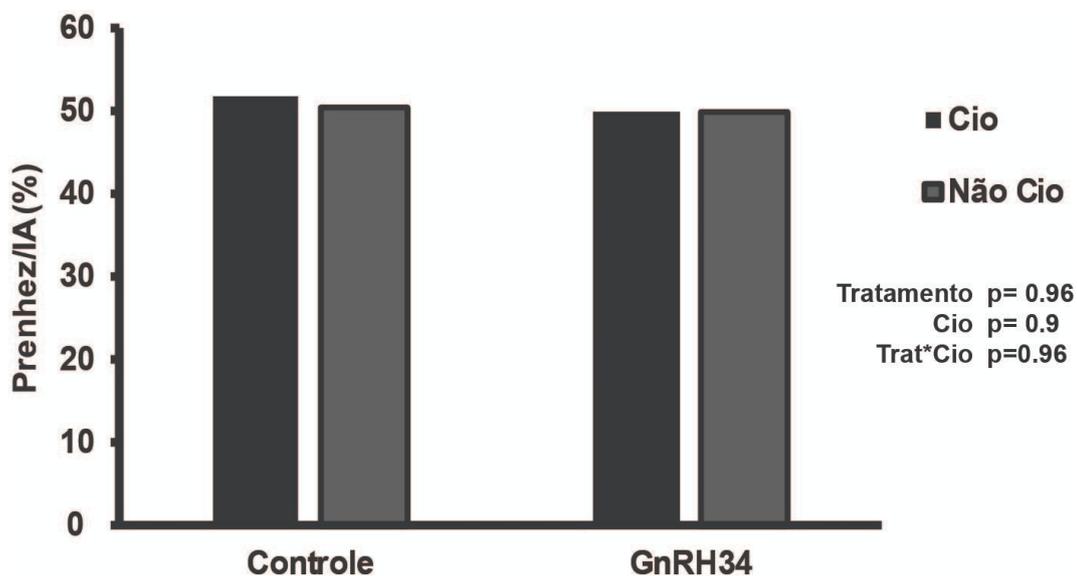
### 5.3 Taxas de prenhez entre os grupos experimentais

As taxas de prenhez obtidas no dia 30 entre os grupos Controle e Tratamento (GnRH34) totais e por lote/fazenda, são apresentadas na Figura 5. Não houve diferenças entre grupos experimentais na taxa de prenhez total e nas taxas de prenhez dentro de cada lote. Porém, houve uma diferença significativa nas taxas de prenhez entre lotes.



**Figura 5.** Taxas de prenhez total e por lote/fazenda de novilhas mestiças de 24 meses no dia 30 após a IATF de acordo com os grupos experimentais, Controle e Tratamento.

Não houve diferenças nas taxas de prenhez em relação às fêmeas que manifestaram ou não os sinais de estro entre cada grupo experimental, também não havendo interações entre grupos e manifestação de estro (Figura 6).



**Figura 6.** Taxas de prenhez no dia 30 após a IATF de novilhas de 24 meses, de acordo com os grupos experimentais, Controle e Tratamento em relação às fêmeas que manifestaram ou não sinais de estro até o momento da IATF.

## 6. DISCUSSÃO

A sincronização entre o tempo de ovulação e a IA tem sido fundamental para melhorar a fertilidade durante os programas de gestão reprodutiva, onde a reprodução ocorre após a detecção de estro ou durante os protocolos de IATF (BISHOP *et al.*, 2016). Durante os ciclos estrais, o pico pré-ovulatório de LH e o início do estro são relativamente sincronizados, com a ovulação a ocorrer aproximadamente 28 h após o início do estro (WILTBANK & PURSLEY, 2014).

Ao final dos programas de IATF, a ovulação sincronizada é geralmente induzida por hormônios indutores da ovulação, como o benzoato de estradiol (BE) e o cipionato de estradiol (CE) (USLENGHI *et al.*, 2014), ou análogos do GnRH (BISHOP *et al.*, 2016). O diferencial entre cada indutor é a farmacocinética que age atuando no comportamento do estro e da ovulação.

No estudo atual, a taxa de prenhez de novilhas de corte do sub-grupo amostral da dinâmica folicular, sincronizadas com GnRH como indutor de ovulação às 34 horas após remoção do DIV de P4 foi semelhante ao do grupo controle (50% e 71% respectivamente). A manifestação de estro, a taxa de ovulação e a taxa de crescimento folicular médio diário do subgrupo amostral da dinâmica folicular, também não diferiram em relação ao grupo tratamento (Tabela 1).

O diâmetro médio do folículo pré-ovulatório foi semelhante para as novilhas do sub-grupo amostral da dinâmica folicular, do grupo controle e tratamento (13,11 mm e 12,25 mm respectivamente). Esses dados corroboram com os achados por Silva *et al.* (2018) onde o diâmetro médio do folículo pré-ovulatório foi semelhante e não diferiu para as novilhas Angus que utilizavam CE e as que utilizavam GnRH (9,98 mm).

O uso de CE, um indutor esteroide de ovulação, induz uma manifestação de estro maior em relação ao GnRH, que é um indutor glicoprotéico (BISHOP *et al.*, 2016). Em trabalho de Silva *et al.* (2018) a manifestação de estro foi maior nas novilhas tratadas com CE em comparação com as tratadas com GnRH (94% e 68% respectivamente), mas a P/IA geral não diferiu entre novilhas tratadas com CE e GnRH ( $P = 0,1996$ ).

Em nosso estudo a manifestação de estro para o grupo controle (100%) e para o grupo tratamento (90%) em relação à taxa de prenhez do sub-grupo amostral da dinâmica folicular não diferiu entre os grupos.

Há diferença na duração do pico de LH após a administração de CE em comparação com GnRH (PICARD-HANGEN *et al.*, 2015), alterando a distribuição da

ovulação que é mais distribuída com CE (USLENGHI *et al.*, 2014) do que com GnRH (PURSLEY *et al.*, 1995). No estudo atual, a taxa de ovulação foi igual entre os grupos (Tabela 1).

A taxa de prenhez geral observada neste estudo está dentro da expectativa após a IATF, com os resultados obtidos corroborando com aqueles observados por Nonato *et al.* (2019) que obtiveram taxa de prenhez de 45% a 59% em novilhas nelore. Rodrigues (2010) cita que índices abaixo de 50% demonstram problemas técnicos na propriedade e de manejo dos animais.

Em geral, a taxa de prenhez por IA (P/IA) não diferiu entre as novilhas do grupo controle e do grupo tratamento (50,2%). Estes resultados vão ao encontro com os encontrados por Silva *et al.* (2018), onde a P/IA não diferiu entre novilhas Angus tratadas com CE e GnRH (52,8% e 59,2%, respectivamente). Entretanto, em nosso trabalho houve diferença na taxa de prenhez entre lotes em relação ao tratamento, que pode estar relacionado a diferenças de manejo entre as fazendas e entre animais, desde a base racial até a condição nutricional e o ECC.

As taxas de prenhez em novilhas de corte apresentam grande variabilidade quando comparadas a de vacas lactantes ou não lactantes (SÁ FILHO *et al.*, 2009). Essas variações podem ser atribuídas à pré- ou peri-puberdade das fêmeas, e também devido à presença de folículos pequenos ao final do protocolo de IATF, gerando baixas taxas de ovulação e diminuindo a taxa de prenhez (MARTINS *et al.*, 2014).

Em geral, atribui-se a baixa fertilidade após a IATF à falta de sincronia do estro/ovulação ou à ovulação de um oócito envelhecido devido ao período prolongado de crescimento folicular, tipicamente associado com os folículos persistentes (AHMAD *et al.*, 1995). O estágio de desenvolvimento do FD após a retirada do DIV de P4 deve estar estreitamente em sincronia ao momento do estro e da ovulação. A assincronia da onda de crescimento folicular pode provocar variações no tamanho do FD, resultando em baixa sincronia da ovulação (DRIANCOURT, 2001).

Alguns pesquisadores indicaram que há diminuição na taxa de prenhez conforme a diminuição do diâmetro do folículo ovulatório (SÁ FILHO *et al.*, 2008). Folículos pequenos possuem menor produção de E2, o que diminui a manifestação de estro (PERRY *et al.*, 2007), formam um CL menor com menor produção de P4 e taxas reduzidas de prenhez (MANN & LAMMING, 2001). Contudo, folículos com mais de 12 mm em bovinos taurinos possuem elevada capacidade ovulatória (SARTORI *et al.*, 2001),

competência oocitária e consequentemente elevada taxa de prenhez (SÁ FILHO *et al.*, 2010).

Neste estudo não se observaram diferenças significativas no diâmetro médio do folículo pré-ovulatório entre os grupos controle ( $13,11 \pm 0,41$  mm) e tratamento ( $12,25 \pm 0,47$  mm). Em estudos de Cavalieri *et al.* (2002), novilhas Brahman apresentaram folículos de diâmetro menor ( $9,1 \pm 0,6$  mm) do que novilhas cruzadas ( $10,7 \pm 0,4$  mm) quando utilizaram protocolos de sincronização da ovulação. Silva *et al.* (2018) em seu estudo encontraram folículos de diâmetro ( $9,98 \pm 2,57$  mm) para novilhas Angus que utilizaram CE e ( $9,98 \pm 2,03$  mm) para aquelas que utilizaram GnRH.

Em nosso trabalho observamos uma taxa de crescimento folicular diário de 1,57 mm/dia no Grupo Controle e de 1,30 mm/dia no Grupo Tratamento, similar entre os grupos, estando de acordo com resultados observados por Utt, Jousan e Beal (2003), que descreveram uma taxa de crescimento folicular diária de 1,2 mm/dia no grupo controle e 1,5 mm/dia no grupo tratamento em vacas Angus. Martinez *et al.* (2000) também obtiveram resultados similares em novilhas cruzadas, com 1,2 mm/dia para o grupo controle e 1,2 mm/dia no grupo tratamento GnRH. Sugere-se assim que não houve comprometimento no perfil de crescimento dos folículos dominantes em ambos os grupos, e que o GnRH não foi favorável, tampouco desfavorável ao desenvolvimento folicular, ovulação e P/IA entre os grupos.

A progesterona inibe a manifestação do cio e impede a ovulação ao suprimir a liberação de LH (CHRISTIAN & CASIDA, 1948). Alguns relatos indicam que o folículo dominante atinge o maior diâmetro quando se desenvolve em presença subluteínicas de concentrações de P4 no plasma (SAVIO *et al.*, 1993b). Considerando que a quantidade de P4 liberada por um dispositivo intravaginal possa atingir concentrações em torno de 5-6 ng/ml (McMILLAN *et al.*, 1991), os resultados encontrados neste estudo sugerem que as concentrações de P4 durante o tratamento com o dispositivo de P4 estavam dentro dos limites tanto do grupo controle como do tratamento (Figura 4).

Segundo Bó *et al.* (2003), há uma grande variabilidade nos resultados de protocolos com GnRH, principalmente para novilhas de corte. Cavalieri *et al.* (2002) obtiveram taxas de ovulação intermediárias (69,6%) em novilhas cruzadas. Entretanto, em trabalho de Barbosa *et al.* (2022) com vacas de corte zebuínas tratadas com GnRH 34 h após a remoção do dispositivo de P4, as vacas ovularam mais precocemente e de forma síncrona no grupo tratamento ( $66,0 \pm 0,0$  h) do que no grupo controle ( $77,2 \pm 4,3$  h), apresentando

maior taxa de P/IA (63%) do que as vacas tratadas apenas com CE no final do protocolo de IATF (50.4%). Assim, parece que fêmeas multíparas respondem mais eficazmente ao uso do GnRH 34 h após a remoção do DIV de P4 do que novilhas de corte, o que corroborava com Bishop *et al.* (2016), que descreveram que as ovulações induzidas por GnRH são menos férteis em novilhas do que em vacas.

A redução da fertilidade que ocorre quando as ovulações são induzidas por GnRH tem sido relacionada ao não acompanhamento de uma resposta paralela de secreção de estradiol (HOLM *et al.*, 2009). Estima-se que o tratamento com GnRH em fases aleatórias do ciclo induza a ovulação em 66% das vacas, mas em apenas 50% das novilhas. O estágio de desenvolvimento do folículo dominante é o fator determinante para as novilhas em relação a respostas ao GnRH (GEARY & WHITTIER, 1998).

O número de ondas foliculares por ciclo estral em novilhas é inconsistente e afeta o intervalo de crescimento folicular e atresia para cada onda. Com isso, reduz-se o tempo em que um folículo dominante responde ao GnRH (GINTHER *et al.*, 1989). A resposta ovulatória ao GnRH é dependente da presença de receptores de LH no folículo, que aumentam em número durante o crescimento do folículo dominante, mas diminuem uma vez que o mesmo sofre atresia (XU *et al.*, 1995). O pico de LH induzido pelo GnRH ocorre mais tarde do que aquele que acontece espontaneamente. Portanto, espera-se que a ovulação ocorra mais tardiamente em fêmeas que não manifestam estro após o protocolo de IATF e que respondem ao GnRH exógeno, em comparação a fêmeas que manifestam estro com o pico de LH endógeno (HOLM *et al.*, 2009).

Em síntese, a aplicação de GnRH 34 h após a remoção do DIV de P4 não influenciou a função ovariana e a fertilidade de novilhas Hereford e Braford de 2 anos, não havendo diferença em nenhum parâmetro avaliado entre os grupos experimentais. No entanto, percebeu-se uma diferença entre lotes de animais dispostos em distintas fazendas. Futuros estudos deverão levar em conta ajustes no protocolo utilizado em relação ao momento ideal para a administração de GnRH para que seja alcançado sucesso repetível, integral e previsível da indução na ovulação de forma síncrona em novilhas de corte.

## **7. CONCLUSÕES**

A aplicação de GnRH como indutor de ovulação em protocolo hormonal para IATF em novilhas de 2 anos 34 h após a retirada do dispositivo intravaginal de P4, não alterou a função ovariana, baseado na avaliação de crescimento folicular, taxa ovulatória, manifestação de estro e função lútea. Tampouco afetou a taxa de prenhez por IA, com diferenças em respostas sendo mais associadas a variações entre animais e fazendas.

## 8. PERSPECTIVAS

As observações deste trabalho reforçam o conhecimento de que os protocolos de sincronização da ovulação são eficientes na indução de uma nova onda folicular e da ovulação, mas ainda são relativamente variáveis quando aplicados a novilhas. Inúmeros protocolos para sincronizar a ovulação com o objetivo de realizar a IATF em novilhas estão disponíveis. A escolha do protocolo mais apropriado depende da avaliação técnica das condições dos animais que serão utilizados. O objetivo da pecuária de corte é a produção de um bezerro por ano, por isso é importante que as matrizes fiquem prenhes o quanto antes na estação de monta. Entretanto, as novilhas ainda são um grande desafio em relação à eficiência reprodutiva, devido ao *status* de ciclicidade, escore de condição corporal, peso e ambiência.

É necessário o conhecimento dos mecanismos fisiológicos para a melhoria dos índices reprodutivos dessa categoria. Várias abordagens estão sendo estudadas para aumentar a fertilidade nos protocolos de IATF baseados na utilização de GnRH. A pré-sincronização dessas novilhas é uma alternativa para complementar esses protocolos. Fazer mais estudos onde se possa analisar se novilhas com folículos de tamanho médio em comparação com folículos grandes sejam menos responsivos ao GnRH em comparação ao CE. Outro fator que deverá ser estudado em protocolos baseados em GnRH é a morfologia do CL e a funcionalidade após o tratamento com GnRH.

Os resultados de estudos sobre o controle da ovulação em programas de IATF para incrementar a eficiência reprodutiva em novilhas de corte dependem muito do fator racial, do grau de ciclicidade, da condição corporal/balanço energético, e da maturidade sexual das fêmeas. Estudos futuros devem ser realizados visando aumentar o conhecimento no desenvolvimento da sincronização da ovulação em fêmeas bovinas, aumentando assim a eficiência técnica e econômica dos programas de IATF em novilhas. Estudos futuros ainda são necessários para uma melhor compreensão destes resultados.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, M.S.; SILVA, L.S.; GOTTSCHALL, C.C. Resposta reprodutiva e custo por prenhez em função do escore de condição corporal de novilhas ao acasalamento. *Revista Brasileira de Iniciação Científica da ULBRA*, v.1, n.16, 2018.
- ADONA, P.R. Oogenesis and folliculogenesis in mammals. UNOPAR, *Ciências Biol Saúde*, v. 15, n.3, p.245-250, 2013.
- AERTS, J.M.J.; BOLS, P.E.J. Ovarian follicular dynamics: A review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 45, p. 171–179, 2010a.
- AERTS, J.M.J.; BOLS, P.E.J. Ovarian follicular dynamics: A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 45, p. 180–187, 2010b.
- AGÊNCIA IBGE NOTÍCIAS. PPM 2020: rebanho bovino cresce 1,5% e chega a 218,2 milhões de cabeças. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/31722-ppm-2020-rebanho-bovino-cresce-1-5-e-chega-a-218-2-milhoes-de-cabecas>> Acesso em: 10 out. 2022.
- AHMAD, N.; SCHRICK, F.N.; BUTCHER, R.L.; INSKEEP, E.K. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cattle. *Biology of Reproduction*, v. 52, p. 1129-1135, 1995.
- ALMEIDA, M.R.; MAGERO, J.; TOLOTTI, F.; GOTTSCHALL, C.S. Considerações para Aplicação da técnica de IATF em Rebanhos de Cria de Bovinos de Corte. *A Hora Veterinária*, Ano 31, n. 182, jul./ago. 2011.
- ALVAREZ, P.; SPICER, L.J.; CHASE JR., C.C.; PAYTON, M.E.; HAMILTON, T.D.; STEWART, R.E.; HAMMOND, A.C.; OLSON, T.A.; WETTEMANN, R.P. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *Journal of Animal Science*, v. 78, p. 1291–1302, 2000.
- AUSTIN, E.J.; MIHM, M.; EVANSM, A.C.O.; KNIGHT, P.G.; IRELAND, J.L.H.; IRELAND, J.J.; ROCHE, J.F. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. *Biology of Reproduction*, v. 64, p. 839–848, 2001.
- BARBOSA, I.P.; CESTARO, J.P.; SILVA, S.A.; NOLETO, G.S.; GONÇALVES, R.L.; SILVA, G.M.; PAES, F.H.; GASPERIN, B.G.; ROVANI, M.T.; PFEIFER, L.F.M. GnRH34: An alternative for increasing pregnancy in timed AI beef cows. *Theriogenology*, v. 179, p.1-6, 2022.
- BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, v. 56, p. 1483–1496, 2001.
- BARROS, C.M.; ERENO, R.L.; NOGUEIRA, M.F.G. Estratégias de manejo para maximização da fertilidade em fêmeas de corte. In *Anais, REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA*, v.42, p. 363, Goiânia. 2005.

- BARUSELLI, P.S.; BÓ, G.A.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O. Inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. In *Anais*, São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004.
- BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, p. 205-211, 2007.
- BARUSSELI, P.S.; SALES, J.N.S.; SALA, R.V.; VIEIRA, L.M.; FILHO, M.F.S. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. *Animal Reproduction*, v.9, n. 3, p. 139-152, 2012b.
- BAO, B.; GARVERICK, H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotrophin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *Journal of Animal Science*, v. 76, p. 1466–1473, 1998.
- BENITES, N.R.; BARUSELLI, P.S. Medicamentos empregados para sincronização do crescimento folicular e da ovulação para transferência de embriões. In H. S. Spinosa, S. L. Górniak & M. M. Bernardi (Eds.), *Farmacologia aplicada à medicina veterinária* (pp. 329-344). Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan. 2011.
- BINELLI, M.; PUGLIESI, G.; HOECK, V.V.; SPONCHIADO, M.; RAMOS, R.S.; OLIVEIRA, M.L.; FRANÇA, M.R.; D’ALEXANDRI, F.L.; MESQUITA, F.S.; MEMBRIVE, C.M.B. The role of proestrus on fertility and postovulatory uterine function in the cow. *Animal Reproduction*, v. 11, p.246-253, 2014.
- BISHOP, B.E.; THOMAS, J.M.; ABEL, J.M.; POOCK, S.E.; ELLERSIECK, M.R.; SMITH, M.F.; PATTERSON, D.J. Split-time artificial insemination in beef cattle: I. Using estrous response to determine the optimal time(s) at which to administer GnRH in beef heifers and postpartum cows. *Theriogenology*, 86:1102–1110, 2016.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTÍNEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 78, p. 307–326, 2003.
- BÓ, G.A.; HUGUENINE, E.; MATA, J.J.D.L.; OLIVERA, R.N.; BARUSELLI, P.S.; MENCHACA, A. Programs for fixed-time artificial insemination in South American beef cattle. *Animal Reproduction*, v. 15, p. 952-962, 2018.
- BRAGANÇA, J.F.M., BASTOS, G.M., OLIVEIRA, J.F.C., BORGES, L.F.K., GONÇALVES, P.B.D. Avaliação do emprego do eCG em um programa hormonal de indução/sincronização de estro e ovulação em novilhas de corte entre 12 e 14 meses de idade. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.37, n.1, p.59-63. 2013.
- CARVALHO, J.B.P.; CARVALHO, N.A.T.; REIS, E.L.; NICHI, M.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* X *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, v. 69, p. 167–175, 2008.
- CAVALIERI, J.; COLEMAN, C.; RODRIGUES, H.; MACMILLAN, K.L.; FITZPATRICK, L.A. The effect of timing of administration of oestradiol benzoate on characteristics of oestrus, timing of ovulation and fertility in *Bos indicus* heifers synchronized with a progesterone releasing intravaginal insert. *Australian Veterinary Journal*, v. 80, p. 217-223, 2002.

- CHRISTIAN, R.E., CASIDA, L.E. The effects of progesterone in altering the estrous cycle of the cow. *Journal of Animal Science*, v. 7, p. 540, 1948.
- COLAZO, M.G.; MAPLETOF, R.J. A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 55, n. 8, p. 772, 2014.
- COLAZO, M.G.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R.J. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. *Theriogenology*, v. 60, p. 855–865, 2003.
- COLAZO, M.G.; KASTELIC, J.P.; MAINAR-JAIME, R.C.; GAVAGA, Q.A.; WHITTAKER, P.R.; PEQUENO, J.A.; MARTINEZ, M.F.; WILDE, R.E.; VEIRA, D.M.; MAPLETOFT, R.J. Resynchronization of previously timed-inseminated beef heifers with progestins. *Theriogenology*, v. 65, p. 557-572, 2006.
- CUNHA, T.K. Indução hormonal ou por ablação física da onda folicular ovariana para a sincronização do estro e da ovulação em fêmeas bovinas de corte. 2021. 153f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2021.
- DIAS, C.C.; WECHSLER, F.S.; DAY, M.L.; VASCONCELOS, J.L.M. Progesterone concentrations, exogenous equine chorionic gonadotropin, and timing of prostaglandin F2a treatment affect fertility in postpuberal Nelore heifers. *Theriogenology*, v. 72, p. 378–385, 2009.
- DIAS, H.P. Efeito da progesterona na expressão do RNAm do receptor de LH e enzimas esteroidogênicas reguladoras do desenvolvimento folicular em células da granulosa de novilhas Nelore. São Paulo, 2015. 69f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2015.
- DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H.D.; STÖBER, M. Rosenberger: Exame Clínico dos Bovinos. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 1993.
- DRIANCOURT, M.A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, v. 55, p. 1211-1239, 2001.
- ENGELKEN, T.J. Developing replacement beef heifers. *Theriogenology*, v. 70, n. 3, p. 569-572, 2008.
- FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*, v. 78, p. 203–216, 2003.
- FERRAZ, H.T. Dinâmica Folicular, Concentração Sérica de Hormônio Luteinizante e Citologia Vaginal de Fêmeas Nelore (*Bos taurus indicus*) Submetidas à Sincronização da Ovulação. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2007.
- FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L.; SOLE, J.M.P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*, v. 47, p. 1489-1505, 1997.
- FIGUEIREDO, J.R.; LIMA, L.F.; SILVA, J.R.V.; SANTOS, R.R. Control of growth and development of preantral follicle: insights from in vitro culture. *Animal Reproduction*, v. 15 (Suppl.1), p. 648-659, 2018.

- FIGUEREDO, V.C.; QUEIROZ, A.R.R.; ARAÚJO, A.C.C.; COSTA, M.G.; MIRANDA, C.D.M.; MURTA, D.C.R.X.; MURTA, D.V.F.; SANTOS, J.M.L. Efeito do implante intravaginal de 347 progesterona na taxa de prenhez de novilhas Nelore. *Brazilian Journal of Development*, v. 5, n. 348 11, p. 24291-24295, 2019.
- FINEGAN, T.M.; BERGSTRALH, D.T. Gametogenesis: germ cells aren't just along for the ride. *Current Biology*, v. 30, p. R1324-RR1327, 2020.
- 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, p. 163-169, 2011.
- FURTADO, D.A.; TOZZETTI, D.S.; AVANZA, M.F.B.; DIAS, L.O.G.O. Inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v.16, p.1- 25, 2011.
- GEARY, T.W.; WHITTIER, J.C. Effects of a timed insemination following synchronization of ovulation using the Ovsynch or CO-Synch protocol in beef cows. *The Professional Animal Scientist*, v. 14, p. 217-220, 1998.
- GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; CARVALHO, N.A.T.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; SOUZA, A.H.; MADUREIRA, E.H.; TRINCA, L.A.; SARTORELLI, E.S.; BARROS, C.M.; CARVALHO, J.B.P.; MAPLETOFT, R.J.; BARUSELLI, P.S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, v. 69, p. 852-858, 2008.
- GIBBONS, J.R.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. *Biology of Reproduction*, v. 57, p. 1066-1073, 1997.
- GINTHER, J.O.; KASTELIC, J.P.; KNOPF, L. Composition and Characteristics of Follicular Waves during the Bovine Estrous Cycle. *Animal Reproduction Science*, v. 20, p. 187-200, 1989a.
- GINTHER, J.O.; KNOPF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and three follicular waves. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 87, p. 223-230, 1989b.
- GINTHER, J.O.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; DONADEUS, F.X.; KNOT, K. Follicle selection in monovular species. *Biology of Reproduction*, v. 65, p. 638-647, 2001.
- GINTHER, O.J. The theory of follicle selection in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 57, p. 85-99, 2016.
- GINTHER, J.O.; SIDDIQUI, M.A.R.; ARAUJO, E.R.; DANGUDUBIYYAM, S.V. Follicles and gonadotropins during waves 2 and 3 in three-wave interovulatory intervals in *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, v. 104, p. 192-197, 2017.
- GINTHER, J.O.; DANGUDUBIYYAM, S.V.; DOMINGUES, R.R. Follicle blood flow and FSH concentration associated with variations in characteristics of follicle selection in heifers. *Theriogenology*, v. 125, p. 93-101, 2019.
- GOTTSCHALL, C.S.; MARQUES, P.R.; ALMEIDA, M.R. Aspectos relacionados a sincronização do estro e ovulação em bovinos de corte. *A Hora Veterinária*, Ano 28, n. 164, jul./ago. 2008.
- GUTIERREZ K.; KASIMANICKAM R.; TIBARY A.; GAY J. M.; KASTELIC J.P.; HALL J.B.; WHITTIER W.D. Effect of reproductive tract scoring on reproductive

- efficiency in beef heifers bred by timed insemination and natural service versus only natural service. *Theriogenology*, v. 81, n. 7, p. 918-924, 2014.
- HOLM, D.E.; THOMPSON, P.N.; IRONS, P.C. The value of reproductive tract scoring as a predictor of fertility and production outcomes in beef heifers. *Journal of Animal Science*, v. 87:1934–40, 2009.
- 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, p. 1648–1658, 2000.
- JAISWAL, R.S.; SINGH, J.; ADAMS, G.P. Developmental pattern of small antral follicles in the bovine ovary. *Biology of Reproduction*, v. 71, p. 1244-1251, 2004.
- JUENGEL, J.L.; SMITH, P.R.; QUIRKE, L.D.; FRENCH, M.C.; EDWARDS, S.J. The local regulation of folliculogenesis by members of the transforming growth factor superfamily and its relevance for advanced breeding programmes. *Animal Reproduction*, v. 15, p. 180-190, 2018.
- KINDER, J.E.; KOJIMA, F.N.; BERGFELD, E.G.M.; WEHRMA, M.E.; FIKE, K.E. Progesterin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. *Journal of Animal Science*, v. 74, p. 1424-1440, 1996.
- KOJIMA, F.N.; BERGFELD, E.G.M.; WEHRMAN, M.E.; CUPP, A.S.; FIKE, K.E. Frequency of luteinizing hormone pulses in cattle influences duration of persistence of dominant ovarian follicles, follicular fluid concentrations of steroids, and activity of insulin-like growth factor binding proteins. *Animal Reproduction Science*, v. 77, p. 187 - 211, 2003.
- LUSSIER, J.G.; MATTON, P.; DUFOUR, J.J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 81, p. 301–307, 1987.
- MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M.A.; BARBOSA, R.T.; DE OLIVEIRA, C.A.; BINELLI, M. Ovarian function in Nelore (*Bos taurus indicus*) cows after post-ovulation hormonal treatments. *Theriogenology*, v. 69, p. 798–804, 2008.
- McMILLAN, K.L. Pharmacological control of the oestrus cycle to improve the reproductive performance of cattle. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 23, p. 61-64, 1999.
- McMILLAN, K.L.; TAUFAN, V.K.; BARNES, D.R.; DAY, A.M. Plasma progesterone concentrations in heifers and cows treated with a new intravaginal device. *Animal Reproduction Science*, v. 26, p. 25–40, 1991.
- MADUREIRA, G.; MOTTA, J.C.L.; DRUM, J.N.; CONSENTINI, C.E.C.; PRATA, A.B.; MONTEIRO JR., P.L.J.; MELO, L.F.; ALVARENGA, A.B.; WILTBANK, M.C.; SARTORI, R. Progesterone-based timed AI protocols for *Bos indicus* cattle I: Evaluation of ovarian function. *Theriogenology*, v. 145, p. 126–137, 2020.
- MANN, G.E.; LAMMING, G.E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction*, v. 121, n. 1, p. 175-180, 2001.
- MAPLETOFT, R.J.; BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MENCHACA, A.; SARTORI, R. Evolution of knowledge on ovarian physiology and its contribution to the widespread

- application of reproductive biotechnologies in South American cattle. *Animal Reproduction*, v.15 (Suppl.1), p.1003-1014, 2018.
- MARTEMUCCI, G.; D'ALESSANDRO, A.G. Synchronization of oestrus and ovulation by short time combined FGA, PGF2 $\alpha$ , GnRH, eCG treatments for natural service or AI fixed-time. *Animal Reproduction Science*, v. 123, p. 32-39. 2011.
- MARTINS, T.; PERES, R.F.G.; RODRIGUES, A.D.P.; POHLER, K.G.; PEREIRA, M.H.C.; DAY, M.L.; VASCONCELOS, J.L.M. Effect of progesterone concentrations, follicle diameter, timing of artificial insemination, and ovulatory stimulus on pregnancy rate to synchronized artificial insemination in postpubertal Nelore heifers. *Theriogenology*. v. 81, p. 446-453, 2014
- MARTINEZ, M.F.; ADAMS, G.P.; KASTELIC, J.P.; BERGFELT, D.R.; MAPLETOFT, R.J. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. *Theriogenology*, v. 54, p. 757-769, 2000.
- MARTÍNEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; BÓ, G.A.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R.J. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 86, p. 37–52, 2005.
- MIHM, M.; AUSTIN, E.J. The final stages of dominant follicle selection in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 23, p. 155–166, 2002.
- MOLLO, M.R.; RUMPF, R.; MARTINS, A.C.; MATTOS, M.C.C.; LOPES JR., G.; CARRIJO, L.H.D.; SARTORI, R. Ovarian function in Nelore heifers under low or high feed intake. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 35, p. 958, 2007. [abstract]
- MONNIAUX, D. Factors influencing establishment of the ovarian reserve and their effect on fertility. *Animal Reproduction*, v.15 (Suppl.1), p. 635-647, 2018.
- MOREIRA, F., DE LA SOLTA, 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, p. 1568-1576, 2000.
- NONATO, M.S; COSTA, M.G; BEZERRA, A.R.A.; MURTA, D.C.R.X.; MURTA, D.V.F.; SANTOS, J.M.L.; BARBOSA, L.K.G.; RUFINO, C.A. Programa de IATF em novilhas púberes e prépuberes. *Brazilian Journal of Development*, v. 5, n. 11, p. 24707-24712, 2019.
- PATTERSON, D.J.; WOOD, S.L.; RANDLE, R.F. Procedures that support reproductive management of replacement beef heifers. In *Proceedings, Animal Science*, 1999.
- PERALTA-TORRES, J.; AKÉ-LOPEZ, J.R.; CENTURIÓN, F.G.; MAGÑA-MONFORTE, J.G. Comparación del ciproionato de estradiol vs benzoato de estradiol sobre la respuesta a estro y tasa de gestación em protocolos de sincronización com CIDR em novillas y vacas *Bos indicus*. *Universidad y Ciencia*, v. 26, p. 163-169, 2010.
- PERRY, G.A.; SMITH, M.F.; ROBERTS, A.J.; MACNEIL, M.D.; GEARY, T.W. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *Journal of Animal Science*, v. 85, p. 684-689, 2007.
- PETER, A.T.; LEVINE, H.; DROST, M.; BERGFELT, D.R. Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. *Theriogenology*, v. 71, p. 1343–1357, 2009.

- PETERS, M.W.; PURSLEY, J.R. Timing of final GnRH of the Ovsynch protocol affects ovulatory follicle size, subsequent luteal function, and fertility in dairy cows. *Theriogenology*, v. 60, p. 1197-1204, 2003.
- PFEIFER, L.F.M., MAPLETOFT, R.J., KASTELIC, J.P., SMALL, J.A., ADAMS, G.P., DIONELLO, N.J.; SINGH, J. Effects of low versus physiologic plasma progesterone concentrations on ovarian follicular development and fertility in beef cattle. *Theriogenology*, v. 72, p. 1237-1250, 2009.
- PICARD-HAGEN, N.; LHERMIE, G.; FLORENTIN, S.; MERLE, D.; FREIN, P.; GAYRARD, V. Effect of gonadorelin, lecorelin, and buserelein on LH surge, ovulation, and progesterone in cattle. *Theriogenology*, v. 84, p. 177-183, 2015.
- PINEDA, N. Base genética brasileira para ser multiplicada. In *Anais, 1º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA*, p. 15-20, Londrina, 2004.
- PINHEIRO, O.L.; BARROS, C.M.; FIGUEIREDO, R.A.; DO VALLE, E.R.; ENCARNAÇÃO, R.O.; PADOVANI, C.R. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2 alpha or norgestomet and estradiol valerate. *Theriogenology*, v. 49, p. 667-681, 1998.
- PURSLEY, J.R.; MEE, M.O.; WILTBANK, M.C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF<sub>2alpha</sub> and GnRH. *Theriogenology*, v. 44, n. 7, p.915-923, 1995.
- RAJAKOSKI, E. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical and left-right variations. *Acta Endocrinologica*, v. 52, p. 1-68, 1960.
- ROCHE, J.F. Follicular waves in cattle. *Veterinary Research Communications*, v. 28, p. 107-110, 2004.
- RODRIGUES, B.L.F. Fatores que afetam a taxa de prenhez em vacas da raça Nelore-PO submetidas a inseminação artificial em tempo fixo. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, 2010.
- RODRIGUES, L. A.; COSTA FILHO, L. C. C.; CASTRO ALVES, L. G; RIBEIRO, P. H. P. R.; FILHO, S. D.; SILVA, A. S.; NOGUEIRA, É. Efeitos do implante de progesterona (CIDR e CRONIPRESS MONODOSE) e da avaliação prévia com ultrassonografia na taxa de prenhez de novilhas nelore (*Bos taurus indicus*) submetidas a IATF. In *Anais, Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, v. 46, Maringá, 2009.
- ROELOFS, J.; LÓPEZ-GATIUS, F.; HUNTER, R.H.F.; VAN EERDENBURG, F.J.C.M. & HANZEN, C.H. When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. *Theriogenology*, v. 74, p. 327-344, 2010.
- ROVIRA, J. Manejo nutritivo de los rodeos de cría en pastoreo. Montevideo: Hemisferio Sur, 288 p.,1996.
- SÁ FILHO, M.F.; SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A.; GIROTTO, R.W.; CAVALHEIRO, I.; BARUSELLI, P.S. Effect of different ovulation inductors on pregnancy rates of Nelore (*Bos indicus*) heifers synchronized to fixed-time artificial insemination. *ISABR - International Symposium on Animal Biology of Reproduction*, 2008.

- SÁ FILHO, O.G.; MENEGHETTI, M.; PERES, R.F.G.; LAMB, G.C.; VASCONCELOS, J.L.M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology*, v. 72, p. 210-218, 2009.
- SÁ FILHO, M.F.; CRESPILO, A.M.; SANTOS, J.E.; PERRY, G.A.; BARUSELLI, P.S. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Animal Reproduction Science*, v. 120, n. 1, p. 23-30, 2010.
- SÁ FILHO, M.F.; SANTOS, J.E.P.; FERREIRA, R.M.; SALES, J.N.S.; BARUSELLI, P.S. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. *Theriogenology*, v. 76, n. 3, p. 455-463, 2011.
- SÁ FILHO, M.F.; PENTEADO, L.; REIS, E.L.; REIS, T.A.N.P.S.; GALVÃO, K.N.; BARUSELLI, P.S. Timed artificial insemination earlier during the breeding season improves the reproductive performance of suckled beef cows. *Theriogenology*, v. 79, p. 625-32, 2013.
- SANTOS, J.E.P.; SÁ FILHO, M.F. Nutrição e reprodução em bovinos. Biotecnologias da Reprodução em Bovinos In *Anais*, Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, p. 30-54, Londrina, 2006.
- SARTORI, R.; FRICKE, P.M.; FERREIRA, J.C.; GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biology of Reproduction*, v. 65, n. 5, p. 1403-1409, 2001.
- SARTORI, R.; BARROS, C.M. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 124, p. 244-250, 2011.
- SAVIO, J.D.; THATCHER, W.W.; MORRIS, G.R.; ENTWISTLE, K.; DROST, M.; MATTIACCI, M.R. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing device on follicular turnover and fertility in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 98, p. 77-84, 1993.
- SILVA, E.P.; WILTBANK, M.C.; MACHADO, A.B.; GAMBIN, L.S.; DIAS, M.M.; CHAIBEN, M.F.C.; BERNARDI, M.L.; BORGES J.B.S. Optimizing timed AI protocols for Angus beef heifers: Comparison of induction of synchronized ovulation with estradiol cypionate or GnRH. *Theriogenology*, v. 121, p. 7-12, 2018.
- SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G.M.G.; SILOTO, L.S.; HERTEL, M.F.; ANDRADE, E.R.; RUBIN, M.I.B.; STURION, L.; STERZA, F.A.M.; SENEDA, M.M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* females. *Theriogenology*, v.76, p.1051-1057, 2011.
- SOTO-SUAZO, M.; ZORN, T.M. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. *Animal Reproduction*, v. 2, p. 147-160, 2005.
- SPICER, L.J. Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: a control mechanism for selection of dominant follicles. *Biology of Reproduction*, v. 70, p. 1223-1230. 2004.

- TAROUCO, A.K., TAZZO, I.F., TAROUCO, J.U., FEIJÓ, F., SILVEIRA, C.S.S., BREMM, C., AMARAL, G.A., MATOS, E.U. Efeitos de fatores bioclimáticos no desempenho de fêmeas Brangus e Angus submetidas à Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF). *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, v. 26, p.68-81, 2020.
- TORRES, H.A.L.; TINEO, J.S.A.; RAIDAN, F.S.S. Influência do escore de condição corporal na probabilidade de prenhez em bovinos de corte. *Arquivo de Zootecnia*, v. 64, n. 247, p. 255-260, 2015.
- USLENGHI, G.; CHAVES, S.G.; CABODEVILA, J.; CALLEJAS, S. Effect of estradiol cypionate and amount of progesterone in the intravaginal device on synchronization of estrus, ovulation and on pregnancy rate in beef cows treated with FTAI based protocols. *Animal Reproduction Science*, v. 145, n. 1, p. 1-7, 2014.
- UTT, M.D.; JOUSAN, F.D.; BEAL, W.E. The effects of varying the interval from follicular wave emergence to progestin withdrawal on follicular dynamics and the synchrony of estrus in beef cattle. *Journal of Animal Science*, v. 81, p. 1562-1567, 2003.
- VASCONCELOS, J.L.M.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H.N.; GUENTHER, J.N.; WILTBANK, M.C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rates. *Theriogenology*, v. 56, p. 307 - 314, 2001.
- VASCONCELOS, J.L.M. Reproductive programs for beef cattle: incorporating management and reproductive techniques for better fertility. In *Proceedings*, 31<sup>o</sup> Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE); Cabo de Santo Agostinho, PE, Brazil, Aug. 17 a 19, 2017.
- VAZ, R.Z.; LOBATO, J.F.P. Efeito da idade de desmame no desempenho reprodutivo de 445 novilhas de corte expostas à reprodução aos 13/15 meses de idade. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.39, n.1, p.142-150, 2010.
- 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.
- WHISNANT, C.S.; BURNS, P.J. Evaluation of steroid microspheres for control of estrus in cows and induction of puberty in heifers. *Theriogenology*.v. 58, p. 1229-1235. 2002.
- WILTBANK, M.C.; KNICKERBOCKER, J.J.; NISWENDER, G.D. Regulation of the Corpus Luteum by Protein Kinase C I. Phosphorylation Activity and Steroidogenic Action in Large and Small Ovine Luteal Cells. *Biology of Reproduction*, v. 40, p. 1194-1200, 1989.
- WILTBANK, M.C.; PURSLEY, J.R. The cow as a induced ovulator: Timed AI after synchronization of ovulation. *Theriogenology*, v. 81, n.1, p. 170-185, 2014.
- XU, Z.Z.; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; HAMILTON, S.A.; YOUNQUIST, R.S. Expression of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biology of Reproduction*, v. 53, p. 951–957, 1995.