

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

**INDUÇÃO HORMONAL OU POR ABLAÇÃO FÍSICA DA ONDA FOLICULAR
OVARIANA PARA A SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E DA OVULAÇÃO EM
FÊMEAS BOVINAS DE CORTE**

Autor: Thomaz Kranen Cunha

Porto Alegre

2021

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

INDUÇÃO HORMONAL OU POR ABLAÇÃO FÍSICA DA ONDA FOLICULAR
OVARIANA PARA A SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E DA OVULAÇÃO EM
FÊMEAS BOVINAS DE CORTE

Autor: Thomaz Kranen Cunha

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

Coorientador: Prof. Dr. José Luiz Rodrigues

Porto Alegre

2021

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Kranen Cunha, Thomaz

INDUÇÃO HORMONAL OU POR ABLAÇÃO FÍSICA DA ONDA FOLICULAR OVARIANA PARA A SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E DA OVULAÇÃO EM FÊMEAS BOVINAS DE CORTE / Thomaz Kranen Cunha. -- 2021.

138 f.

Orientador: Marcelo Bertolini.

Coorientador: José Luiz Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Ciclo estral bovino. 2. Sincronização. 3. Dinâmica folicular bovina. 4. Ovulação. 5. Ablação folicular. I. Bertolini, Marcelo, orient. II. Rodrigues, José Luiz, coorient. III. Título.

THOMAZ KRANEN CUNHA

INDUÇÃO HORMONAL OU POR ABLAÇÃO FÍSICA DA ONDA FOLICULAR
OVARIANA PARA A SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E DA OVULAÇÃO EM
FÊMEAS BOVINAS DE CORTE

Defesa em 19 de julho de 2021, às 14:00 h.

COMISSÃO AVALIADORA:

Prof. Dr. Marcelo Bertolini, FAVET/UFRGS

Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. João Batista Borges, FAVET/UFRGS

Membro da Comissão

Prof. Dr. Luís Fernando Schutz, University of Nevada, EUA

Membro da Comissão

Prof. Dr. Ricardo Zanella, Universidade de Passo Fundo (UPF)

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

À minha companheira de vida, **Larissa Dariva**, que sempre ao meu lado me apoiou e incentivou em todos os meus projetos e desafios profissionais e pessoais, pois sem o amor e apoio incondicional, esta trajetória seria muito mais difícil.

À toda a minha família, em especial a minha mãe **Mônica Kranen**, meu pai **Jerson Luiz Lima Cunha**, e meu avô **Luiz Henrique Kranen**, que sempre me deram amor e apoio para perseguir meus sonhos e obtivesse sucesso na vida.

Ao Professor e orientador **Marcelo Bertolini**, por todos ensinamentos e conselhos dados durante esta etapa da minha vida e carreira.

Ao Professor e coorientador **José Luis Rodrigues**, por tantos conselhos e apoio fornecidos.

À toda a equipe do Laboratório de Embriologia, **Bruno, Higor, Eduardo, Gabriella, Juliana, César, Mônica, Bruna, Louise, Verônica, Martin e João**, pelos ensinamentos mútuos, companheirismo e risadas durante todo o mestrado. Em especial, gostaria de agradecer ao colega **Favorino Collares**, que sem seu auxílio durante os experimentos este trabalho não seria executado.

Ao Professor **Jaime Urdapilleta Tarouco** e à médica veterinária **Verônica Rolim**, e à toda a equipe da Estação Experimental Agronômica da UFRGS, que de alguma forma auxiliaram ou permitiram a execução deste trabalho. Em especial gostaria de agradecer à **Carolina Silveira** que participou e auxiliou durante todos os dias dos experimentos na EEA/UFRGS.

À **CAPES**, pela concessão da bolsa.

RESUMO

O desenvolvimento de protocolos hormonais para a manipulação do ciclo estral em bovinos tornou significativamente mais prática a aplicação das biotécnicas da reprodução. Porém, a eficácia de tais protocolos ainda pode ser melhorada, em especial com respeito a uma maior eficiência da sincronização de uma nova onda folicular e ovulação. O objetivo deste estudo foi comparar a dinâmica folicular em bovinos de corte submetidos a protocolos de sincronização da onda folicular e da ovulação pelo uso de um éster de estradiol (benzoato de estradiol, BE) ou pela ablação física de folículos ovarianos. Um total de 34 fêmeas nulíparas (Experimento 1) e 22 fêmeas múltíparas (Experimento 2), híginas e cíclicas da raça Brangus da Estação Experimental Agronômica da UFRGS, foram submetidas à avaliação dos tratamentos reprodutivos por palpação e ultrassonografia transretal. As fêmeas foram homogeneamente distribuídas em dois grupos experimentais por categoria (Experimentos 1 e 2): grupo BE (Benzoato de Estradiol, n= 17 novilhas e n=11 vacas), e grupo OPU (*Ovum Pick-Up*, n=17 novilhas e n=11 vacas). No Dia 0, o grupo BE recebeu 2 mg de benzoato de estradiol por via i.m., com a introdução de um inserto intravaginal de progesterona (P4), enquanto no grupo OPU, todos os folículos terciários ≥ 5 mm de diâmetro foram aspirados por via transvaginal guiada por ultrasonografia, seguido da introdução de um inserto de P4. Os insertos de P4 foram removidos das fêmeas dos grupos OPU e BE nos Dias 6 e 8, respectivamente, com a administração de 0,6 mg de cipionato de estradiol e 0,15 mg de D-cloprostenol via i.m. A dinâmica folicular foi acompanhada por ultrasonografia transretal a cada 24 h do Dia 0 até um dia após a retirada do inserto de P4, e a intervalos de 12 h até 96 h desde a retirada do inserto de P4, com a observação de sinais de estro. No Experimento 1 (nulíparas), houve diferença ($P < 0,05$) em relação ao sucesso da indução de uma nova onda folicular, que foi de 71% (12/17) e 100% (17/17) para os grupos BE e OPU, respectivamente. Já no Experimento 2 (múltíparas), não houve diferença na indução da onda, com a nova onda sendo induzida em 100% (22/22) das vacas em ambos os grupos. No grupo BE, a emergência de uma nova onda folicular ocorreu $3,8 \pm 0,3$ e $3,9 \pm 0,2$ dias nas novilhas e vacas, respectivamente, enquanto no grupo OPU, a emergência ocorreu $2,0 \pm 0,1$ dias e $1,5 \pm 0,2$ dias nas novilhas e vacas, respectivamente. Houve diferença ($P < 0,05$) quanto à taxa de crescimento diário do futuro folículo dominante (FD) do recrutamento ao início do desvio e à remoção da P4 entre os grupos, sendo maior no grupo OPU do que no grupo BE das nulíparas (Experimento 1). No Experimento 2 (múltíparas), o crescimento folicular foi semelhante do recrutamento ao início do desvio, mas diferente ($P < 0,05$) do recrutamento à remoção da P4 entre os grupos,

sendo maior no grupo OPU do que no grupo BE. Esta diferença na taxa de crescimento ocasionou também uma diferença entre os grupos ($P < 0,05$) quanto ao diâmetro do FD ao desvio aparente, observado na ultrassonografia, no Experimento 1, e na remoção da P4 no Experimento 2. No Experimento 1 (nulíparas), 84% (10/12) e 65% (11/17) das novilhas com indução de nova onda ovularam nos grupos BE e OPU, respectivamente. No Experimento 2 (multíparas), 82% (9/11) das fêmeas, tanto do grupo BE como da OPU, ovularam no final do experimento. Obteve-se uma taxa de ovulação final de 59% (10/17) e 65% (11/17) nas novilhas dos grupos BE e OPU, respectivamente (Experimento 1). Já no Experimento 2, observou-se uma taxa de ovulação final de 82% (9/11) nas fêmeas múltiparas de ambos os grupos. Houve falhas na indução da nova onda folicular ovariana pelo método hormonal (BE) nas fêmeas bovinas nulíparas de corte, mas não nas fêmeas múltiparas, o que conseqüentemente reduziu a eficiência do protocolo com BE nas novilhas em termos de taxa ovulatória final. Por sua vez, o método físico (OPU) foi eficaz em induzir uma nova onda folicular em ambas as categorias (nulíparas e múltiparas). Porém a permanência ligeiramente mais prolongada (12 a 24h) do inserto intravaginal de P4 pode ter contribuído com a redução da taxa ovulatória final, em especial nas fêmeas nulíparas e no grupo de ablação folicular pela OPU.

Palavras-chave: Ciclo estral, sincronização, dinâmica folicular, ovulação, ablação folicular, protocolo hormonal, bovinos.

ABSTRACT

The development of hormonal protocols for the manipulation of the estrous cycle in cattle has made the application of reproductive technologies significantly more practical. However, the effectiveness of such protocols can still be improved, especially with respect to a greater efficiency of the synchronization of a new follicular wave and ovulation. The aim of this study was to compare the follicular dynamics in beef cattle submitted to protocols for the synchronization of the follicular wave and ovulation using either an estrogen ester (estradiol benzoate, BE) or the physical ablation of ovarian follicles. A total of 34 and 22 healthy and cyclic Brangus nulliparous (Experiment 1) and multiparous females (Experiment 2), respectively, from the UFRGS Agronomic Experimental Station beef cattle herd, were selected following the evaluation of the status of the reproductive tract by rectal palpation and transrectal ultrasonography. Females were homogeneously distributed into two experimental groups per animal category (Experiments 1 and 2): BE group (Estradiol Benzoate, n=17 heifers and n=11 cows), and OPU group (Ovum Pick-Up, n=17 heifers and n=11 cows). On Day 0, a 2-mg estradiol benzoate dose was given via im to the BE group, along with the insertion of an intravaginal progesterone (P4) device, whereas in the OPU group, all ≥ 5 mm tertiary follicles were aspirated transvaginally, guided by ultrasonography, followed by the insertion of a P4 device. On Days 6 and 8, the P4 devices were withdrawn from the females in the OPU and the BE groups, respectively, with the administration of 0.6 mg estradiol cypionate and 0.15 mg D-cloprostenol via i.m. Follicular dynamics were followed by transrectal ultrasonography every 24 h from Day 0 until one day after the removal of the P4 device, and at 12 h intervals up to 96 h after the P4 removal, along with estrus detection. In Experiment 1 (nulliparous), a difference ($P < 0.05$) was observed in the success rate in inducing a new follicular wave, being 71% (12/17) and 100% (17/17) for the BE and OPU groups, respectively. In turn, no differences were seen in Experiment 2 (multiparous), with a new wave induced in 100% (22/22) of the females in both groups. In the BE group, the emergence of a new follicular wave occurred at 3.8 ± 0.3 and 3.9 ± 0.2 days in heifers and cows, respectively, whereas in the OPU group, the emergence occurred 2.0 ± 0.1 days and 1.5 ± 0.2 days in heifers and cows, respectively. A difference ($P < 0.05$) was observed between groups in the daily growth rate of the future dominant follicle (DF) from recruitment to the beginning of deviation in Experiment 1 (heifers), and from recruitment to P4 removal in Experiment 2 (cows), being greater in the OPU group than in the BE group. In Experiment 2 (multiparous), follicular growth rate was similar from

recruitment to the beginning of deviation, but different ($P < 0.05$) from recruitment to P4 removal between groups, being greater in the OPU group than in the BE group. Such difference in growth rate also caused a difference between groups ($P < 0.05$) regarding the diameter of the DF at the observed deviation, detected by ultrasonography, in Experiment 1, and at P4 removal in Experiment 2. In Experiment 1, 84% (10/12) and 64% (11/17) of the heifers displaying a new follicular wave in the BE and OPU groups, respectively, ovulated up to the end of the experiment, whereas in Experiment 2, 82% (9/11) of the females in both groups ovulated up to the end of the experiment. An overall ovulation rate of 59% (10/17) and 65% (11/17) was attained in heifers (Experiment 1) in the BE and OPU groups, respectively, whereas 82% (18/22) of the multiparous females ovulated in both groups (Experiment 2). Failures occurred in the induction of a new follicular wave under the hormonal treatment (BE) in nulliparous beef cattle, but not in multiparous females, which consequently reduced the efficiency of the protocol in heifers in terms of overall ovulatory rate. In turn, the follicular ablation by OPU was effective in inducing a new follicular wave in both animal categories (nulliparous and multiparous females). However, a reduction in the overall ovulatory rate may have been caused by a slightly longer time (12 to 24 h) of the P4 intravaginal device into some females, especially in nulliparous females and in the follicular ablation group by OPU.

Keywords: Estrous cycle, synchronization, follicular dynamics, ovulation, follicular ablation, hormone protocols, cattle.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Ilustração da interrelação entre os hormônios circulantes (FSH, GnRH, LH, E2 e Ih) e os fatores intrafoliculares (E2, IGF1 e IGFBP) durante o crescimento folicular e ao início do processo de desvio folicular. O aumento da concentração de FSH antes do pico deste hormônio é um reflexo da baixa concentração dos supressores (Ih e E2) sobre esta gonadotrofina. Inicialmente, o FSH está estimulando todos os folículos, e a inibina é o primeiro supressor deste hormônio a ser liberado quando os folículos atingem 5 mm de diâmetro. Literalmente, a seleção ocorre contra os folículos subordinados, onde o folículo dominante continua seu crescimento, enquanto seus subordinados diminuem a taxa de crescimento, pois ao início do processo de desvio apenas o folículo dominante está preparado para manter seu desenvolvimento mesmo com as condições decrescentes de FSH. Durante o desvio, o E2 (assim como a Ih) atua como supressor do FSH e como um estimulante da liberação de LH, através da liberação de GnRH. Os efeitos intrafoliculares das gonadotrofinas são mediados através do sistema entre o IGF1 e o E2. O processo de desvio entre os 2 maiores folículos inicia 12 horas antes da manifestação aparente do desvio no diâmetro folicular, observado via exames ultrassonográficos. Os aspectos intrafoliculares envolvidos no desvio do processo de seleção folicular estão destacados pela caixa cinza. E2: estradiol; IGF1: *insulin-like growth factor 1*; IGFBP: *insulin-like growth factor binding protein*; Ih: inibina. Fonte: Ginther (2016)..... 40
- Figura 2.** Modelo esquemático do aspecto celular do processo de desvio folicular envolvendo as células da granulosa e da teca do futuro FD em bovinos. Na parte superior do esquema observa-se a mudança que a célula da granulosa passa durante o processo de seleção e desvio folicular, onde passa a ter a presença de receptores de LH que seguirão aromatisando os andrógenos produzidos pelas células da teca em estradiol. Na parte inferior do esquema se observa a interação do FD, após o desvio, entre células da teca e da granulosa em relação à produção e liberação de estradiol no líquido folicular, IGF-1 livre e as proteases das IGBP impedindo a ligação desta com as IGF-1, todas características presentes no futuro FD no desvio folicular. Adaptado de: Ginther *et al.* (1996; 2001b)..... 42
- Figura 3.** Metodologias hormonal (Grupo BE) e física (Grupo OPU) utilizadas para a sincronização de uma nova onda folicular nos grupos controle (BE) e tratamento (OPU) em fêmeas bovinas nulíparas (Experimento 1) e múltíparas (Experimento 2) da raça Brangus (*Bos taurus taurus vs. Bos taurus indicus*). No D0, aplicaram-se 2 mg de BE no Grupo BE, enquanto realizou-se a ablação por aspiração folicular guiada por ultrassonografia transvaginal de todas as estruturas >5 mm no Grupo OPU, com a inserção de um inserto intravaginal bovino de 1 g de progesterona em ambos os grupos. Do D0 ao D8 no Grupo BE, e do D0 ao D6 no Grupo OPU, realizou-se a avaliação da função ovariana por ultrassonografia transretal a cada 24 h. No D8 no Grupo BE e no D6 no Grupo OPU, removeu-se o inserto de P4, administrando-se também um hormônio luteolítico (0,15 mg D-cloprostenol) e um hormônio indutor de ovulação (0,6 mg de Cipionato de Estradiol). Após o D8 (Grupo BE) ou D6 (Grupo OPU), realizou-se a observação de sinais de estro a cada 4-8 h, e a avaliação da função ovariana e da ovulação por ultrassonografia a cada 12 h por 96 h (4 dias), pelo desaparecimento do folículo pré-ovulatório (FPO)..... 59
- Figura 4.** Monitoramento ultrassonográfico diário para o mapeamento e identificação de todas as estruturas ≥ 5 mm dos ovários nos grupos controle (BE) e tratamento (OPU) em fêmeas bovinas nulíparas (Experimento 1) e múltíparas (Experimento 2) da raça Brangus (*Bos taurus taurus vs. Bos taurus indicus*). A partir do sétimo dia de avaliação, o intervalo entre avaliações diminuiu para 12 h, com o intuito de identificar o momento da ovulação do FPO..... 62
- Figura 5.** Tempos (h) e tamanho (mm) do folículo dominante (FD) nos diferentes eventos fisiológicos da dinâmica folicular após a indução da nova onda folicular por via hormonal (Grupo BE) e física (Grupo OPU) em fêmeas nulíparas (Experimento 1) bovinas da raça Brangus (*Bos taurus taurus vs. Bos taurus indicus*), somente para fêmeas que ovularam a partir da nova onda induzida. (a) Recrutamento; (b) Início do desvio; (c) Remoção da P4; (d) Desvio aparente; (e) Dominância; (f) Estro; e (g) Ovulação..... 71

- Figura 6.** Tempos (h) e tamanho (mm) do folículo dominante (FD) nos diferentes eventos fisiológicos da dinâmica folicular após a indução da nova onda folicular por via hormonal (Grupo BE) e física (Grupo OPU) em fêmeas multíparas (Experimento 2) bovinas da raça Brangus (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*), somente para fêmeas que ovularam a partir da nova onda induzida. (a) Recrutamento; (b) Início do desvio; (c) Remoção da P4; (d) Desvio aparente; (e) Dominância; (f) Estro; e (g) Ovulação..... 72
- Figura 7.** Distribuição das faixas de tamanhos dos folículos nos diferentes dias de avaliação ovariana, comparando a população folicular entre os grupos controle (BE) e tratamento (OPU) de fêmeas bovinas nulíparas (Experimento 1) e multíparas (Experimento 2) da raça Brangus (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*), somente para fêmeas que ovularam a nova onda induzida. Pareamento dos dias, para fins comparativos entre grupos, realizado no Dia 0, equivalente à emergência da nova onda folicular..... 79
- Figura 8.** Taxa média de crescimento do folículo dominante (FD, mm/dia) do recrutamento ao início do desvio folicular ou à remoção da P4 entre os grupos controle (BE) e tratamento (OPU) de fêmeas bovinas nulíparas (Experimento 1) e multíparas (Experimento 2) da raça Brangus (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*), somente para fêmeas que ovularam a nova onda induzida..... 80
- Figura 9.** Intervalos de tempo desde a remoção da progesterona (t=0) ao estro (barras laranjas), do estro à ovulação (barras azuis) e da remoção da progesterona (t=0) à ovulação (barras laranja + azul) entre os grupos controle (BE) e tratamento (OPU) em fêmeas bovinas nulíparas (Experimento 1) e multíparas (Experimento 2) da raça Brangus (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*)..... 82
- Figura 10.** Taxa de crescimento média do folículo dominante (FD, mm/dia) do recrutamento ao desvio aparente, do recrutamento à dominância folicular, da remoção da P4 à ovulação e do desvio aparente à ovulação entre os grupos controle (BE) e tratamento (OPU) em fêmeas bovinas nulíparas (Experimento 1) e multíparas (Experimento 2) da raça Brangus (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*)..... 84
- Figura 11.** Taxa de crescimento médio (mm/dia) do folículo dominante (FD) do recrutamento à ovulação entre os grupos controle (BE) e tratamento (OPU) em fêmeas bovinas nulíparas (Experimento 1) e multíparas (Experimento 2) da raça Brangus (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*)..... 84
- Figura 12.** Média dos Intervalos de tempos (h) da remoção da progesterona (t=0) à ovulação (P4-O), da remoção da P4 aos sinais de estro (P4-E) e dos sinais de estro à ovulação (E-O) para fêmeas nulíparas (Experimento 1) ou multíparas (Experimento 2) da raça Brangus (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*) que ovularam em um período regular esperado e que ovularam tardiamente..... 90

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Proporção de fêmeas nulíparas (novilhas, Experimento 1) e múltíparas (vacas, Experimento 2) bovinas da raça Brangus (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*) com manifestação de estro e com ovulação por grupo experimental (BE, OPU) e por experimento, com intervalos de ovulação desde a remoção da progesterona e a indução da ovulação..... 68
- Tabela 2.** Desenvolvimento folicular em fêmeas nulíparas (Experimento 1) e múltíparas (Experimento 2) bovinas da raça Brangus (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*) com nova onda folicular induzida hormonalmente (Grupo BE) ou fisicamente (Grupo OPU), em função do tempo (h) e do tamanho folicular (mm) nos diferentes eventos fisiológicos da dinâmica folicular (somente fêmeas que ovularam a partir da nova onda induzida)..... 70
- Tabela 3.** Número médio de folículos nas diferentes categorias por tamanho, na escala fisiológica, em relação ao dia da avaliação de fêmeas nulíparas bovinas (Experimento 1) da raça Brangus (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*), somente incluindo as fêmeas que ovularam a nova onda induzida..... 77
- Tabela 4.** Número médio de folículos nas diferentes categorias por tamanho, na escala fisiológica, em relação ao dia da avaliação de fêmeas múltíparas bovinas (Experimento 2) da raça Brangus (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*), somente incluindo as fêmeas que ovularam a nova onda induzida..... 78

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne
AMH	<i>Anti-Müllerian Hormone</i>
ANOVA	Análise de Variância
ART	<i>Assisted Reproductive Technologies</i>
BE	Benzoato de Estradiol
CE	Cipionato de Estradiol
CGP	Células Germinativas Primordiais
CL	Corpo Lúteo
DF	Divergência Folicular
ECC	Escore Condição Corporal
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
EEA	Estação Experimental Agronômica
EUA	Estados Unidos da América
FAOSTAT	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FAVET	Faculdade de Veterinária
FD	Folículo Dominante
FIV	Fecundação <i>In vitro</i>
FPO	Folículo pré-ovulatório
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i>
g	grama
GnRH	<i>Gonadotropin Release Hormone</i>
h	horas
Hg	Mercúrio
HHG	Hipotalâmico-hipofisiário-gonadal
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICSI	<i>Intracytoplasmic sperm injection</i>
IGF-I	<i>Insulin-like growth factor-I</i>
IGFBP	<i>Insulin-like growth factor binding protein</i>
IETS	<i>International Embryo Transfer Society</i>
im	intramuscular
IVD	<i>In vivo-Derived embryos</i>
LEBR	Laboratório de Embriologia e Biotécnica da Reprodução
LH	<i>Luteinizing Hormone</i>
mg	miligrama
MHz	Mega Hertz
mm	milímetro
MOET	<i>Multiple Ovulation and Embryo Transfer</i>
mL	milímetro
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
ng	nanograma
OPU	<i>Ovum Pick Up</i>
PGF _{2α}	Prostaglandina-F 2alfa
PIV	Produção <i>In vitro</i>
P4	Progesterona
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

US	Ultrassom
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
SOV	Superovulação
TEC	Toneladas Equivalente Carça
TE	Transferência de Embriões
TETF	Transferência de Embriões em Tempo Fixo
TN	Transferência Nuclear
VE	Valerato de Estradiol
α	<i>Alfa</i>
τ	<i>Tau</i>
χ^2	qui-quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	HIPÓTESES E OBJETIVOS	21
2.1	Hipóteses	21
2.2	Objetivos gerais	21
2.3	Objetivos específicos	21
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1	Ciclo estral bovino	22
3.1.1	<i>Fase lútea e controle neuroendócrino</i>	23
3.1.2	<i>Fase folicular e controle neuroendócrino</i>	25
3.2	Gametogênese feminina	27
3.2.1	<i>Oogênese</i>	27
3.2.2	<i>Foliculogênese</i>	28
3.3	Dinâmica folicular bovina	31
3.3.1	<i>Recrutamento folicular</i>	32
3.3.2	<i>Seleção folicular</i>	35
3.3.3	<i>Desvio e dominância folicular</i>	37
3.4	Diferenças na fisiologia reprodutiva de fêmeas <i>Bos taurus indicus vs. Bos taurus taurus</i>	43
3.5	Sincronização de uma nova onda folicular	46
3.5.1	<i>Método hormonal</i>	47
3.5.2	<i>Método físico</i>	48
3.6	Manipulação do ciclo estral por meio da sincronização de uma nova onda folicular para uso nas principais biotécnicas reprodutivas	48
4	MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1	Local, animais, manejo geral e nutricional	57
4.2	Seleção das fêmeas para a execução dos experimentos	57
4.3	Manipulação do ciclo estral bovino para a sincronização do estro e da ovulação: experimentos e grupos experimentais	59
4.3.1	<i>Método hormonal (Grupo BE)</i>	60
4.3.2	<i>Método físico (Grupo OPU)</i>	60
4.4	Mapeamento ovariano e acompanhamento da dinâmica folicular por meio de ultrassonografia em tempo real	61
4.5	Organização, análise e interpretação dos dados	63
4.6	Análise estatística	65
5	RESULTADOS	67
5.1	Observações gerais da função ovariana nas fêmeas	67
5.2	Observações das fêmeas responsivas à indução da ovulação	69
5.2.1	<i>Período do início do protocolo ao recrutamento/emergência da nova onda folicular</i>	69
5.2.2	<i>Período do recrutamento/emergência folicular à remoção do inserto intravaginal de progesterona e luteólise</i>	75
5.2.3	<i>Período da remoção da fonte de progesterona exógena e endógena à ovulação</i>	80
5.2.4	<i>Eventos excepcionais de relevância fisiológica</i>	85
5.3	Observações das fêmeas não responsivas à indução de uma nova onda folicular e/ou à ovulação	91
6	DISCUSSÃO	94
7	CONCLUSÕES	105
8	PERSPECTIVAS	106
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
10	BIOGRAFIA DO AUTOR	140

1 INTRODUÇÃO

As explorações animais almejam uma maior eficiência produtiva de seus sistemas, e um dos fatores primordiais para se alcançar este objetivo é através da maior eficiência reprodutiva das matrizes. O uso das biotecnologias da reprodução tem colaborado para o aumento da eficácia reprodutiva e produtiva dos rebanhos mundiais por meio da diminuição do intervalo entre gerações e pela disseminação mais eficiente de genética superior, além de poder impactar na redução dos custos de produção e no controle de enfermidades (BERTOLINI & BERTOLINI, 2009).

O Brasil é um importante ator (*player*) nos mercados mundiais de carne e leite bovino. Estas explorações são de grande importância para a economia nacional, gerando milhares de empregos diretos e indiretos. O país possui um rebanho bovino de 221,8 milhões de cabeças (IBGE, 2018), ficando atrás apenas da Índia no *ranking* mundial (USDA, 2018). Segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC), foram produzidos cerca de 10,5 milhões de toneladas equivalente carcaça (TEC) no ano de 2019, o que foi equivalente a 14,8% da produção mundial de carne bovina, permanecendo somente atrás dos EUA, que detém 17,3% do mercado mundial (FAOSTAT, 2018; USDA, 2018). A produção de leite cru no Brasil foi de 33,8 milhões de toneladas em 2018, representando 5,0% da produção mundial, estando atrás dos EUA e da Índia (FAOSTAT, 2018). Porém, em termos de produtividade, o Brasil ainda tem muito a crescer e poderá galgar posições mais importantes nos mercados internacionais, pelas características únicas do setor primário.

As biotecnologias da reprodução são tradicionalmente divididas em quatro gerações, sendo a inseminação artificial (IA) e a criopreservação espermática a primeira geração, a superovulação (SOV) e a transferência de embriões produzidos *in vivo* (IVD, *in vivo-derived embryos*) a segunda geração, e a produção *in vitro* (PIV) de embriões pela fecundação *in vitro* (FIV) a terceira geração. Estas ferramentas tiveram rápida evolução, disseminação e

grande êxito comercial devido principalmente ao avanço genético que seus usos proporcionaram aos rebanhos bovinos mundiais, o que naturalmente ocasionou um aumento da produção e produtividade, gerando maior lucratividade aos sistemas produtivos (RODRIGUES & BERTOLINI, 2019; THIBIER, 2005). Segundo Gordon (2003), cerca de 50% do ganho em produtividade leiteira nos rebanhos em países desenvolvidos durante a segunda metade do século XX pode ser atribuído ao incremento genético por meio da disseminação e uso da IA, o que demonstra o potencial destas tecnologias. Já a quarta geração de tecnologias engloba procedimentos menos eficientes e aplicados majoritariamente no âmbito experimental, que compreendem a clonagem por transferência nuclear (TN), a engenharia genética e edição gênica, e a biologia das células-tronco, com o suporte de todas as ômicas (genômica, proteômica, bioinformática), sendo que em algum momento, tais procedimentos são dependentes das biotécnicas antecessoras (RODRIGUES & BERTOLINI, 2019).

A IA é uma grande ferramenta para aumentar a frequência de genes de interesse de machos provenientes de programas de seleção tradicional ou de testes genômicos. Já as ferramentas que permitem a difusão do material genético superior na fêmea são as biotécnicas que envolvem a produção e transferência de embriões (TE), tanto *in vivo* como *in vitro*, incluindo a SOV, a aspiração folicular ovariana (OPU, *Ovum Pick Up*) associada à PIV, e a TE em tempo fixo, ou TETF (BERTOLINI & BERTOLINI, 2007; MOORE & HASLER, 2017; MOORE & THATCHER, 2006). A aplicação e a eficiência de tais tecnologias dependem da eficiência e eficácia da manipulação e controle do ciclo estral, utilizando estratégias e protocolos hormonais para a sincronização do estro, da ovulação e da onda de desenvolvimento folicular de maneira efetiva.

Com o desenvolvimento de protocolos hormonais de manipulação das ondas de crescimento folicular a partir dos anos de 1990, pôde-se então induzir uma nova onda

folicular com alta repetibilidade, independentemente do estágio do ciclo estral e da ciclicidade, em especial por via hormonal pelo uso de ésteres de estradiol (BÓ *et al.*, 1991, 1995, 1996; MACMILLAN & PETERSON, 1993; MACMILLAN *et al.*, 1991, 1993), como o valerato de estradiol (VE) ou o benzoato de estradiol (BE), ou análogos sintéticos do hormônio liberador de gonadotrofina, o GnRH (PURSLEY *et al.*, 1995), sendo normalmente associados à progesterona ou gestágenos por distintas vias de administração (implantes auriculares, insertos intravaginais, via injetável, via oral), princípios estes já observados por pesquisadores na década de 1960, em que testavam o uso de progestágenos e estrógenos injetáveis para a sincronização de novilhas virgens (WILTBANK *et al.*, 1965). Os chamados protocolos hormonais passaram a ser fundamentais para o desenvolvimento e vasta aplicação em programas de IA em tempo fixo (IATF) em bovinos, procedimento em contínua expansão no Brasil e no mundo, em gado de leite e corte (BARUSELLI *et al.*, 2017a, 2019; MAPLETOFT *et al.*, 2018; STEVENSON & BRITT, 2017). Em menor escala, mas não de menor importância, tais procedimentos hormonais também passaram a ser implementados para a produção e TE, pelo simples uso de protocolos de IATF adaptados à TETF, bem como para fins de uso na OPU-PIV a partir de fêmeas doadoras, seja para a sincronização da onda folicular e subsequente aspiração folicular, seja para a superstimulação ovariana seguida da OPU (BARUSELLI *et al.*, 2011; HASLER, 2014; PHILLIPS & JAHNKE, 2016). Por fim, os protocolos hormonais de sincronização de onda folicular também passaram a ser utilizados com sucesso para a SOV e coleta de embriões produzidos *in vivo*, o que tornou o processo mais prático, porém sem haver um aumento significativo em eficiência ao longo dos anos (BARUSELLI *et al.*, 2011; MIKKOLA *et al.*, 2020).

Atualmente, os protocolos hormonais de sincronização do estro e da ovulação para uso na IATF normalmente atingem taxas de prenhez médias de 50%, variando de 40 a 60% (BÓ *et al.*, 2016, 2018), considerando rebanhos férteis em ciclicidade ou em iminência de

ciclicidade, boas condições de manejo geral, sanitário e nutricional, e salvaguardando o uso de sêmen de fertilidade comprovada e procedimentos técnicos adequados. Já a aplicação de protocolos para a preparação de fêmeas receptoras para a TETF normalmente apresenta um aproveitamento de 70 a 90% na avaliação pré-TETF (HASLER, 2010; PHILLIPS & JAHNKE, 2016). Por fim, mesmo com o desenvolvimento técnico e logístico dos protocolos hormonais modernos de SOV, a eficiência não parece ter aumentado em termos de número médio de estruturas viáveis coletadas por doadora desde os anos 1980 até o presente, independente dos protocolos utilizados (BOLAND *et al.*, 1991; HASLER, 2010, 2014; MIKKOLA *et al.*, 2020; PHILLIPS & JAHNKE, 2016). Desta forma, os protocolos hormonais, apesar de comercialmente viáveis, ainda apresentam limitações biológicas que devem ser superadas para o aumento das eficiências na IATF, TETF ou SOV.

Entre muitos fatores relacionados à fêmea, uma das possíveis causas de insucessos e redução de eficiência em uma parte das fêmeas pode estar relacionada a falhas ou respostas variáveis em função do tempo na regressão de folículos ovarianos presentes em distintas fases da dinâmica folicular subsequentes à administração de ésteres de estradiol ou GnRH no início do protocolo. Tal fenômeno pode levar à não indução do recrutamento de uma nova onda folicular, ou a indução de uma nova onda de forma assíncrona entre as fêmeas, resultando em falhas de ovulação na janela biológica desejada para a concepção na IATF e SOV, e falha ou assincronia de fêmeas receptoras para uso na TETF. Outro insucesso nos protocolos também pode estar associado ao crescimento folicular assíncrono da nova onda, ou à falha da ovulação *per se*, o que contribui para menores taxas de prenhez após a IATF, menor aproveitamento de receptoras para a TETF e menor produção de embriões viáveis após a SOV em bovinos. Protocolos alternativos de indução de uma nova onda folicular, como o método físico da ablação folicular, mesmo que não tenham praticidade técnica em trabalhos em maior escala, podem permitir a melhor compreensão de falhas na manipulação

de eventos fisiológicos, na busca por protocolos e procedimentos que aumentem a eficiência e eficácia de métodos hormonais de manipulação do ciclo estral e da ovulação em bovinos.

2 HIPÓTESES E OBJETIVOS

2.1 Hipótese

- a) Protocolos hormonais de sincronização do estro e da ovulação com ésteres de estradiol em fêmeas bovinas de corte cíclicas apresentam uma menor eficiência comparados à ablação folicular ovariana na indução de uma nova onda folicular. O uso de ésteres de estradiol nos protocolos hormonais convencionais falha de forma variável, aleatória e temporalmente significativa na indução da sincronização da onda folicular ovariana no início do protocolo, o que contribui na redução da eficiência e eficácia de biotécnicas da reprodução, como a IATF, TETF, OPU-PIV e SOV.

2.2 Objetivo geral

- a) Desenvolver estratégias de manipulação da dinâmica folicular em bovinos de corte para o aumento da eficiência e da eficácia de procedimentos aplicados à reprodução em bovinos, como a IATF, a TETF, mas em especial para a OPU-PIV e a SOV.

2.3 Objetivos específicos

- a) Comparar os efeitos de um protocolo hormonal padrão (Controle) de sincronização do estro e da ovulação em fêmeas bovinas de corte nulíparas e multíparas cíclicas com um método físico (ablação folicular por ultrassonografia transvaginal) quanto à efetividade da indução de uma nova onda folicular, monitorando as características temporais e espaciais da dinâmica folicular por ultrassonografia transretal, desde a indução de uma nova onda folicular até a ovulação; e
- b) Determinar a variação do momento do início do recrutamento folicular na nova onda folicular subsequente aos tratamentos hormonal (benzoato de estradiol) ou físico (ablação folicular por ultrassonografia transvaginal), comparando espacial e temporalmente a taxa de desenvolvimento e crescimento folicular, e a ocorrência e o momento da ovulação subsequentes em fêmeas bovinas de corte nulíparas e multíparas cíclicas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Ciclo estral bovino

O ciclo estral bovino é a representação do padrão cíclico da atividade útero-ovariana da fêmea, que é marcado pelo intervalo entre dois períodos de receptividade reprodutiva, denominado de estro (FORDE *et al.*, 2011; PETER *et al.*, 2009; SARTORI & BARROS, 2011). Historicamente, a caracterização destes eventos se iniciou pela observação dos sinais de estro, já que era a demonstração mais marcante e perceptível na época, e que os sinais deste período eram detectáveis por um intervalo de 12 a 18 horas (HAMMOND, 1927; NALBANDOV & CASIDA, 1942; WILTBANK *et al.*, 1967), variando de 3 a 28 horas (ALLRICH, 1994). Posteriormente foi estabelecido que o intervalo entre dois estros consecutivos, portanto a duração de um ciclo estral, era de 21 dias em média, variando de 17 a 24 dias (SALISBURY *et al.*, 1978; WISHART, 1972) e que a ovulação ocorre em média de 25 a 30 horas após o início do estro (BERNARD *et al.*, 1983; CHRISTENSON *et al.*, 1975).

O ciclo estral normalmente é dividido endocrinamente em duas fases e quatro estágios, a fase folicular com os estágios de próestro e estro, e a fase lútea com os estágios de metaestro e diestro, sendo reguladas por uma complexa interação hormonal do eixo hipotalâmico-hipofisiário-gonadal (HHG). O GnRH é liberado pelos centros tônico e pré-ovulatório do hipotálamo em dois padrões de secreção, atuando nas células gonadotróficas da adenohipófise (gonadotrofos na hipófise anterior) que possuem grânulos secretórios contendo os Hormônios Folículo Estimulante (FSH) e/ou Hormônio Luteinizante (LH). O FSH e o LH estimulam as gônadas a produzir e liberar estradiol e inibina (fase folicular) ou progesterona (fase lútea), os quais atuam através de mecanismos endócrinos e neuroendócrinos, na foliculogênese, ovulação, função do corpo lúteo e esteroidogênese do ovário, possuindo importantes funções de *feedback* positivo e negativo no HHG (DOWNEY,

1980; FORDE *et al.*, 2011; KOJIMA, 2003; PETER *et al.*, 2009; RATHBONE *et al.*, 2001; ROCHE, 1996).

3.1.1 Fase lútea e controle neuroendócrino

A fase lútea inicia após a ovulação, com a formação da principal estrutura que caracteriza este período, o corpo lúteo (CL), o qual sintetiza progesterona (P4), hormônio predominante desta fase, e conclui com a lise do CL. A duração é de 14 a 18 dias em média, logo, esta etapa compõe aproximadamente dois terços de todo o ciclo estral, sendo subdividida em dois estágios: o metaestro, que dura em média de 3 a 6 dias; e o diestro, que dura em média de 11 a 14 dias (FORDE *et al.*, 2011; GARVERICK & SMITH, 1993; KOJIMA, 2003; PETER *et al.*, 2009).

O metaestro inicia imediatamente após o final do estro e dentro de, em média, 10 a 12 horas ocorrerá a ovulação e a subsequente formação do CL, o qual neste momento será chamado de corpo hemorrágico, começando a síntese e pequena liberação de P4 (FORDE *et al.*, 2011; PETER *et al.*, 2009). Por meio da ação luteotrófica do LH, em um padrão de liberação com alta frequência e baixa amplitude (CUPP *et al.*, 1995; KOJIMA, 2003; RATHBONE *et al.*, 2001), este hormônio gonadotrófico luteiniza as células da granulosa e da teca da parede folicular que permaneceram no tecido ovariano, determinando também a maturação do folículo dominante (FD) para um folículo pré-ovulatório (FPO), a maturação do oócito e a ovulação (ALILA & HANSEL, 1984; MILVAE *et al.*, 1996; PETER *et al.*, 2009). A P4 é o hormônio responsável por atuar no estabelecimento e manutenção da possível gestação de um conceito, portanto a partir da formação do CL, a P4 começa a aumentar a concentração sérica concomitantemente com o aumento do tamanho e do volume celular do CL, porém somente a partir do 5º dia, já na transição para a fase de diestro, é que a concentração sérica começará a aumentar substancialmente (FORDE *et al.*, 2011; HANSEL & CONVEY, 1983; KOJIMA, 2003; PETER *et al.*, 2009).

O diestro é a fase de maior concentração de P4 secretada e sérica do ciclo estral. A crescente concentração de P4 do final do metaestro atinge seu *plateau* máximo entre o 7º e 12º dia do ciclo, e se mantém elevada até o momento da luteólise, por volta do 18º dia. O aumento de tamanho e volume celular do CL atinge seu limite máximo durante esta fase, sendo perceptíveis uma maior vascularização e uma coloração amarelo/alaranjada brilhante da estrutura secretora de P4, o que também designa o CL como corpo amarelo (KOJIMA, 2003; PETER *et al.*, 2009). Tais níveis séricos da P4 impedem, por meio de um mecanismo de *feedback* negativo, a ocorrência de um pico de LH pelo centro pré-ovulatório, permitindo apenas uma liberação de maior amplitude e menor frequência deste hormônio, comparado com os padrões de liberação da fase anterior, sendo insuficiente para sinalizar a ovulação de qualquer FD (BERGFELD *et al.*, 1995; KOJIMA, 2003; PETER *et al.*, 2009; RATHBONE *et al.*, 2001). Entre o 16º e 18º dia do ciclo, se o reconhecimento materno do conceito (via *interferon-τ*) não ocorrer, o processo de luteólise do CL irá ocorrer (AROSH *et al.*, 2016; GINTHER *et al.*, 2011; RATHBONE *et al.*, 2001; ROVANI *et al.*, 2017). O endométrio irá secretar prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$; LAMOTHE *et al.*, 1977), que por via ativa contracorrente da veia uterina à artéria ovariana, alcançará a irrigação do CL, que se atingido o limiar, após o ciclo em *feedback* positivo entre a $PGF_{2\alpha}$ e a ocitocina lútea, causará a apoptose das células luteais (luteólise morfológica), diminuindo abruptamente os níveis séricos de P4 (luteólise funcional), que culminará na regressão do CL e cicatrização, formando um corpo albicans (AROSH *et al.*, 2016; FORDE *et al.*, 2011; GINTHER *et al.*, 2011; KOJIMA, 2003; NISWENDER *et al.*, 1994; NISWENDER *et al.*, 2000; PETER *et al.*, 2009; ROVANI *et al.*, 2017).

Tanto no metaestro como no diestro a liberação de FSH continua ocorrendo, de forma cíclica, mesmo na presença de altas concentrações de P4, pois durante estas fases, o desenvolvimento e o crescimento dos folículos seguem ocorrendo, uma vez que o FSH

possui a função de estimular a proliferação e crescimento folicular. As modulações das concentrações de liberação de FSH têm um importante controle por meio do *feedback* negativo exercido pela secreção folicular de estradiol e inibina (AUSTIN *et al.*, 2001), principalmente pelos folículos maiores, que irão gradativamente inibindo o centro tônico hipotalâmico (estradiol) e gonodotrofos (FSH), causando a redução de FSH circulante. A elevação de FSH plasmático está associada ao início de uma nova onda folicular (ADAMS *et al.*, 1992; BERGFELT *et al.*, 1997b; GIBBONS *et al.*, 1997), onde serão recrutados folículos terciários pequenos (4 a 5 mm em diâmetro), FSH-responsivos, que irão progressivamente crescer durante esta fase. Contudo, a vasta maioria dos folículos não atingirão o estágio final para a ovulação devido ao fenômeno de atresia folicular (apoptose folicular) pela dinâmica folicular (abaixo) e à elevada concentração de P4 durante o período que o CL está funcional, o que leva à constante atresia de folículos terciários de diversos tamanhos, desde este novo recrutamento folicular, à atresia de um FD que aguarda LH para seguir o desenvolvimento a pré-ovulatório (FORDE *et al.*, 2011; JOLLY *et al.*, 1994; KAIPIA & HSUEH, 1997; KOJIMA, 2003; YANG & RAJAMAHENDRAN, 2000).

3.1.2 Fase folicular e controle neuroendócrino

A fase folicular inicia após a luteólise e a redução sérica da P4 até um nível mais próximo do basal (1 ng/mL). Posteriormente, ocorre o crescimento da(s) estrutura(s) característica(s) deste momento, que são folículos terciários FSH-responsivos, que culminam normalmente com a existência de um FD e folículos subordinados (FS), com secreção folicular crescente de estradiol e inibina. A duração desta fase estrogênica é de 3 a 5 dias, compondo o terço final do ciclo, sendo subdividida em próestro (3 a 4 dias) e estro (12 a 18 horas). Este período folicular é o mais variável dentro do ciclo, uma vez que a duração depende do crescimento do FD e da crescente liberação de estradiol, que pela baixa P4 sérica, acarretará na liberação de GnRH pelo centro pré-ovulatório, e por sua vez, de LH

pela hipófise anterior, levando à maturação folicular e oocitária, luteinização do folículo e ovulação, finalizando um ciclo estral com o início da manifestação psicossomática do estro, também pela elevação do estradiol e estímulo ao centrosexual hipotalâmico, dando início ao ciclo subsequente (BINELLI *et al.*, 2014; FORDE *et al.*, 2011; GARVERICK & SMITH, 1993; KOJIMA, 2003; PETER *et al.*, 2009).

A fase de próestro é caracterizada por possuir um ambiente hormonal com níveis basais de P4, devido à luteólise, que permite um crescimento linear na média da concentração sérica de LH, devido ao aumento na frequência e amplitude do pulso de liberação de GnRH pelo centro pré-ovulatório hipotalâmico, em resposta a elevados níveis de estradiol folicular, acompanhado do LH (ALLRICH, 1994; FORDE *et al.*, 2011; KOJIMA, 2011). No final do próestro, este crescimento linear sérico de LH irá induzir a maturação do FD, que resultará em aumento da secreção de pulsos de estradiol e inibina, com uma maior amplitude, bloqueando o crescimento dos FS, através do *feedback* negativo exercido sobre o centro tônico e hipófise anterior, respectivamente, que reduzirá a liberação de FSH, impedindo que os FS dependentes deste hormônio continuem crescendo (GINTHER *et al.*, 2000a; GINTHER *et al.*, 2019), causando a atresia (DRIANCOURT, 2001; FORDE *et al.*, 2011; JOLLY *et al.*, 1994; KAIPIA & HSUEH, 1997; KOJIMA, 2011; YANG & RAJAMAHENDRAN, 2000).

A fase de estro é caracterizada pelos sinais de comportamento sexual da fêmea, tornando-se receptiva à monta, podendo haver hiperemia vulvar, liberação de muco cervical translúcido, agitação e monta em outras fêmeas (PETER *et al.*, 2009; ROELOFS *et al.*, 2010). Este comportamento é desencadeado pela ação da alta concentração sérica de estradiol em ausência de P4, que estimula o centro sexual do comportamento em nível hipotalâmico (ALLRICH, 1994; ROELOFS *et al.*, 2010). O estímulo hipotalâmico acarreta a liberação de picos de GnRH do centro pré-ovulatório, ocasionando a liberação de LH em

uma alta amplitude, com uma frequência de 40 a 70 minutos por 2 a 3 dias, caracterizando o pico de LH pré-ovulatório ao início do estro. Concomitante à liberação do LH, o FSH também será estimulado para ser liberado, caracterizando um aumento considerável deste hormônio na parte final do ciclo estral. Alguns autores consideram que este aumento propicia o recrutamento dos folículos da primeira onda do ciclo subsequente (BERGFELT *et al.*, 1997b; GIBBONS *et al.*, 1997). A ovulação de um oócito secundário, apto a ser fecundado, somente ocorrerá, em média, de 10 a 14 horas após o final dos sinais de estro, cerca de 20 a 30 h após o início do estro e do pico de LH, e será seguida da fase lútea do ciclo seguinte (FORDE *et al.*, 2011; GARVERICK & SMITH, 1993; KOJIMA, 2003; PETER *et al.*, 2009; ROCHE, 1996).

3.2 Gametogênese feminina

A gametogênese é o processo de divisão e diferenciação das células germinativas precursoras em gametas, que ao final do processo serão capazes de, após a fecundação, gerarem um novo indivíduo. A gametogênese feminina é dividida em oogênese e folliculogênese, que é o conjunto de processos que irão gerar as unidades básicas do gameta feminino: o oócito e o folículo, ambos estando intimamente ligados e reciprocamente dependentes (FINEGAN & BERGSTRALH, 2020; McCARREY, 2018).

3.2.1 Oogênese

A oogênese pode ser definida como a sequência de eventos que inicia no desenvolvimento e diferenciação das células germinativas primordiais (CGP), ainda na fase embrionária (SOTO-SUAZO & ZORN, 2005; VAN DEN HURK & ZHAO, 2005), e vai até a formação do oócito, a ovulação e a fecundação (ADONA *et al.*, 2013). As CGP se proliferam por mitose durante a migração e alojamento na gônada embrionária em diferenciação, quando expande-se aos milhões, cessando a mitose, havendo uma camada de células epiteliais revestindo as CGPs, diferenciando-as em oogônias (ADAMS *et al.*, 2008;

MONNIAUX, 2018; RUSSE, 1983). As oogônias iniciam então o processo de meiose, aproximadamente entre os dias 75 e 80 da gestação em bovinos (ERICKSON, 1966; FAIR, 2003), dando início à prófase da meiose I. No estágio de diplóteno da meiose I, aproximadamente entre 150 e 180 dias de gestação (BAKER & HUNTER, 1978), os oócitos são rodeados por uma única camada de 4 a 8 células achatadas da pré-granulosa e uma lâmina basal intacta, efetivamente formando a primeira categoria de folículo, denominado de folículo primordial em repouso (VAN WEZEL & RODGERS, 1996). O folículo primordial contém oócitos primários quiescentes, que permaneceram até o período de maturidade sexual, constituindo-se na reserva folicular ovariana da fêmea em formação (ADAMS *et al.*, 2008; AERTS & BOLS, 2010a; ERICKSON, 1966a; FAIR, 2003; MONNIAUX, 2018; RUSSE, 1983). Desde aproximadamente 2,7 milhões de oogônias, a fêmea bovina nasce com cerca de 135 mil folículos primordiais quiescentes nos ovários, havendo uma redução de 90 a 95% da população oocitária até o parto (AERTS & BOLS, 2010a; ERICKSON, 1966a,b; VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

3.2.2 *Foliculogênese*

A foliculogênese ocorre entre a transição da mitose para a meiose durante oogênese, quando as oogônias se tornam oócitos primários, e conclui com a atresia folicular, ou mais raramente e de forma cíclica após a puberdade, com a formação do folículo pré-ovulatório, ou folículo de Graaf. A foliculogênese é dividida em duas etapas: a formação dos folículos pré-antrais, que tem uma duração mais longa, e o desenvolvimento dos folículos antrais, que crescem e entram em atresia ou ovulam durante o ciclo estral da fêmea, compondo a dinâmica folicular. As estruturas que compõe a fase pré-antral são os folículos primordiais, primários e secundários, e a fase antral, os folículos terciários e os pré-ovulatórios (AERTS & BOLS, 2010a; AERTS & BOLS, 2010b).

Como citado anteriormente, a formação de uma camada achatada de células da pré-granulosa no entorno do oócito primário, juntamente com uma lâmina basal intacta formam o folículo primordial (AERTS & BOLS, 2010a; VAN WEZEL & RODGERS, 1996). Os folículos primordiais estão localizados na periferia do córtex ovariano e apresentam células da granulosa com formato pavimentoso (AERTS & BOLS, 2010a; VAN DEN HURK *et al.*, 1997). Segundo Byskov *et al.* (1977), o crescimento dos folículos começa em um padrão centrífugo dentro do ovário. A ativação dos folículos primordiais é caracterizada pela transformação da forma achatada das células da granulosa para uma forma cuboide, e pela sua proliferação (AERTS & BOLS, 2010a; BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997; FAIR *et al.*, 1997; FAIR, 2003), e de acordo com Hulshof *et al.* (1992), a ativação do crescimento folicular em bovinos é caracterizada pela aquisição de uma camada completa de 11 a 20 células da granulosa cuboide em volta do oócito, formando o folículo primário. Apesar de não serem completamente elucidados, alguns mecanismos de controle da ativação já são conhecidos. Figueiredo *et al.* (2018) citam que o desenvolvimento de folículos primordiais é primariamente controlado por fatores e ligantes intraovarianos (parácrinos e autócrinos), mas que também podem ser influenciados por diversos fatores e ligantes extraovarianos (regulação endócrina) oriundos de diferentes tecidos, sendo o controle da foliculogênese ocorrendo pela combinação destes inúmeros fatores e ligantes, que tem ações complementares ou opostas (*feedback* positivo e/ou negativo), em uma imensa complexidade (FIGUEIREDO *et al.*, 2018; FORTUNE, 2003; JUENGEL *et al.*, 2018; MELLO *et al.*, 2013; SCARAMUZZI *et al.*, 2011). Um destes fatores é o hormônio anti-mülleriano (AMH) que inibe o recrutamento de folículos terciários pequenos (1 a 3 mm) para a onda de folículos em crescimento da dinâmica folicular do ciclo estral, e diminui a responsividade destes folículos em crescimento ao FSH (DURLINGER *et al.*, 1999; DURLINGER *et al.*, 2001; DURLINGER *et al.*, 2002). Estudos estão sendo realizados para

mensurar os níveis de AMH e possivelmente inibi-los em fêmeas candidatas a doadores de embriões programas de MOET e OPU-PIV, com objetivo de prever e escolher fêmeas com boa população folicular responsiva ao FSH e que possivelmente terão uma melhor resposta a protocolos de SOV (MOSSA *et al.*, 2017; RICO *et al.*, 2009; RICO *et al.*, 2011; SEVGI *et al.*, 2019).

A progressão para a fase de folículo secundário é caracterizada pelo aparecimento da segunda camada de células da granulosa (DRIANCOURT, 1991), podendo chegar até seis camadas (ADAMS *et al.*, 2008; AERTS & BOLS, 2010a; BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997; LUSSIER *et al.*, 1987), e pelo início da deposição de glicoproteínas que irão formar a zona pelúcida no entorno do oócito (AERTS & BOLS, 2010a). Neste mesmo momento são formados os grânulos corticais no citoplasma oocitário (FAIR *et al.*, 1997). Diferentes autores afirmam que a expressão de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) para receptores de FSH já foi detectada em folículos de uma a duas camadas de células da granulosa em bovinos (AERTS & BOLS, 2010a; BAO & GARVERICK, 1998; XU *et al.*, 1995). A transição do folículo secundário precoce para tardio, que precede à fase de folículo antral terciário, é caracterizada pela contínua proliferação e diferenciação das células que circundam o oócito em células da teca interna e células da granulosa ou murais, separadas pela lâmina basal, e destas últimas, das células da *corona radiata* e do *cumulus oophorus*, justapostas ao oócito primário e à zona pelúcida em formação final. Segundo Xu *et al.* (1995), a expressão de mRNA do receptor de LH foi detectada no momento da formação da camada celular da teca interna. Neste momento da foliculogênese, pela epitelização das células da granulosa, ocorre o processo ativo de permeabilização a íons sódio ao interior da estrutura, o qual é seguido por íons cloro e pela água, levando assim à formação gradual de uma cavidade repleta de fluído, denominada de antro, iniciando então a fase folicular antral, formando um folículo terciário (DRIANCOURT, 1991; FAIR, 2003). O período de

desenvolvimento da oogênese e da foliculogênese dos folículos pré-antrais até a fase antral tem uma duração longa, podendo tardar de 3 a 6 meses para que o folículo primordial, após a ativação para primário, entre na fase de crescimento até folículo antral (AERTS & BOLS, 2010a; FORTUNE, 1994; MONNIAUX, 2018; WEBB *et al.*, 2004), sendo de enorme relevância para a fertilidade. O destino do folículo antral, quando este atinge a fase FSH-responsiva pela alocação de receptores de FSH à membrana plasmática das células da granulosa em quantidades molares fisiologicamente suficientes (4 a 5 mm de diâmetro) para serem estimuladas, pode ser de recrutamento para a formação de uma nova onda folicular, atresia ou ovulação, em fenômeno denominado de dinâmica folicular, conforme abaixo.

3.3 Dinâmica Folicular Bovina

A fase de folículos antrais terciários é caracterizada pela dinâmica folicular durante o ciclo estral da fêmea, fenômeno descrito pela primeira vez por Rajakoski (1960), denominado de maturação bifásica folicular, onde o autor fez observações diárias das estruturas ovarianas de novilhas abatidas em cada dia do ciclo estral, caracterizando pela primeira vez o crescimento folicular bovino em um padrão de duas ondas em cada ciclo estral. Posteriormente, com o advento da ultrassonografia, diversos autores descreveram que as fêmeas bovinas têm, em média, um crescimento consecutivo de 2 a 3 ondas foliculares durante o ciclo estral, podendo chegar a quatro ondas (GINTHER *et al.*, 1989a; 1989b; 2017; PIERSON & GINTHER, 1984; 1988; SAVIO *et al.*, 1988; SIROIS & FORTUNE, 1988). Cada onda folicular é precedida pelo aumento da concentração sérica de FSH (ADAMS *et al.*, 1992; JAISWAL *et al.*, 2004), quando os folículos terciários responsivos ao FSH levam à emergência de um grupo de folículos terciários ovarianos em crescimento, caracterizando o recrutamento desta onda folicular, da qual apenas um folículo tornar-se-á dominante e potencialmente ovulará, se os níveis séricos de P4 forem baixos (ADAMS *et al.*, 1993a; ADAMS *et al.*, 1993b; ADAMS *et al.*, 2008; BIGELOW & FORTUNE, 1998;

BODENSTEINER *et al.*, 1996; JAISWAL *et al.*, 2004; MIHM *et al.*, 1997). A dinâmica folicular possui três principais eventos característicos: o recrutamento de um grupo de folículos terciários FSH-responsivos, a seleção folicular e o desvio e dominância de um FD sobre folículos que se tornam subordinados (AERTS & BOLS, 2010b; DRIANCOURT, 1991; DRIANCOURT, 2001; FORTUNE, 1994; GINTHER *et al.*, 1996; GINTHER, 2016; HODGEN, 1982; LUCY *et al.*, 1992; WEBB *et al.*, 2016).

3.3.1 *Recrutamento folicular*

Hodgen (1982) definiu recrutamento folicular como o momento em que os folículos terciários iniciam a maturação em um meio de estimulação hipofisiário-gonadotrófico suficiente para permitir o progresso do desenvolvimento folicular até a ovulação, iniciando com um grupo de folículos, de tamanho variável, que será recrutado para iniciar a onda. Posteriormente, Ireland *et al.* (2000) refinaram estes conceitos, afirmando que o recrutamento é o processo pelo qual um grupo de folículos terciários começa a crescer, de forma quase síncrona, ou entra em uma trajetória de crescimento e, a partir daí, torna-se dependente de gonadotrofinas para seu desenvolvimento contínuo até o tamanho ovulatório.

Com o início dos estudos ultrassonográficos e o rastreamento dos folículos dominantes de cada onda em bovinos, Ginther *et al.* (1996) caracterizaram a emergência dos folículos no início do recrutamento da nova onda como o último dia ou exame (se houver mais de um exame por dia) em que o futuro FD possuía 4 mm de diâmetro. Ireland *et al.* (2000) refinaram ainda mais este conceito de emergência, definindo este evento como o primeiro dia durante o crescimento de um grupo de folículos em uma onda, em que o maior folículo detectado é de 4 ou 5 mm de diâmetro, assim, a emergência detectada pela ultrassonografia, marca o início (recrutamento) de uma nova onda folicular.

O recrutamento implica em um grupo de folículos antrais terciários que irão iniciar seu crescimento e proliferação celular, escapando do iminente processo de atresia celular que a grande maioria da população de folículos sofre durante a vida da fêmea. Este repentino crescimento deste grupo é estimulado pelo crescente aumento temporário dos níveis plasmáticos do FSH (ADAMS *et al.*, 1992; JAISWAL *et al.*, 2004; MIHM & BLEACH, 2003; SUNDERLAND *et al.*, 1994), portanto este hormônio atua como um fator de sobrevivência para folículos antrais pequenos (CHUN *et al.*, 1996). Estudos ultrassonográficos permitiram a mensuração e a identificação de folículos menores do que 4 a 5 mm, que apareciam de duas a três vezes de forma cíclica durante o ciclo estral, e consequentemente alguns cresciam até tamanhos maiores (FORTUNE, 1994). Garverick *et al.* (2002) inibiram a secreção de FSH em novilhas através do *downregulation* do GnRH, a partir do uso de um agonista deste hormônio hipotalâmico, e demonstraram que os folículos dos bovinos podem crescer até 4 mm sem a presença do FSH. O crescimento folicular subsequentemente foi dependente de FSH, e a infusão de FSH aumentou a expressão de mRNA para a clivagem da cadeia lateral P450 e enzimas aromatase P450 em células da granulosa e 17 α -hidroxilase P450 em células da teca. Estes resultados forneceram evidências moleculares convincentes de que folículos >4 mm de diâmetro compõem o grupo que participa da onda folicular (DRIANCOURT *et al.*, 1991; DRIANCOURT, 2001; JAISWAL *et al.*, 2004; LUCY, 2007).

Cada nova onda folicular é precedida por este aumento do hormônio FSH, caracterizando como uma das principais causas do recrutamento de cada onda folicular bovina (JAISWAL *et al.*, 2004), porém atualmente já se conhecem inúmeros fatores e ligantes intraovarianos e extraovarianos que atuam desde os folículos primordiais até o recrutamento dos folículos terciários que passam a ser responsivos às gonadotrofinas. Devido ao grande número e sua imensa complexidade de atuação destes fatores, ainda não é

totalmente elucidado o mecanismo que seleciona esta população de folículos terciários (FIGUEIREDO *et al.*, 2018; JUENGEL *et al.*, 2018; SCARAMUZZI *et al.*, 2011). A regressão do FD durante uma onda folicular, ou a ovulação no final do ciclo estral, causa o aumento transiente nos níveis circulantes de FSH, uma vez que os hormônios sintetizados por este folículo, estradiol e inibina, atuam através de um mecanismo de *feedback* negativo no centro tônico hipotalâmico e na hipófise anterior, respectivamente, reduzindo a liberação de FSH hipofisário (AERTS & BOLS, 2010b; FORTUNE, 1994). Não apenas neste momento ocorre um aumento do FSH, mas também um pequeno aumento antecede a segunda e a terceira ondas foliculares do ciclo e nas ondas foliculares que ocorrem em fêmeas pré-púberes (FORTUNE, 1994; JAISWAL *et al.*, 2004). O aumento das concentrações sanguíneas de FSH causa o crescimento dos folículos gonadotrofino-dependentes (4 a 5 mm) até tamanhos maiores e promove o início da síntese de estradiol folicular, dos quais posteriormente serão sujeitos ao processo de seleção (LUCY, 2007).

O desenvolvimento destes grupos foliculares tipicamente consiste em um número de 5 a 10 folículos (DRIANCOURT, 2001), mas podem conter mais de 24 folículos por onda folicular (MIHM & AUSTIN, 2002), apresentando uma duração de crescimento comum por cerca de três dias (GINTHER *et al.*, 2003). A fase de crescimento comum se estende do início do recrutamento da onda até o início do processo de desvio folicular, que coincide com o processo da seleção. Na média, o futuro FD emerge seis horas antes dos futuros subordinados. Esta emergência precoce resulta em uma vantagem de crescimento e tamanho do futuro FD em relação aos subordinados ao final da fase de crescimento comum. Os folículos que surgem mais tarde em uma onda atingem um diâmetro máximo menor, crescem mais lentamente durante a fase de crescimento comum e podem atingir um platô ou diâmetro máximo antes do final da fase de crescimento comum (GINTHER *et al.*, 2001; 2003; PETER *et al.*, 2009).

As concentrações sistêmicas e foliculares de estradiol que aumentam paralelamente com o desenvolvimento do FD atingem um pico cerca de 1 a 2 dias antes da ovulação, próximo ao momento em que o maior folículo atinge diâmetro máximo, cerca de dois a três dias antes do pico do LH (BERGFELT *et al.*, 2000; GINTHER *et al.*, 1998). Próximo ao momento da ovulação, há uma diminuição nos níveis de estradiol, o que corresponde a um aumento no FSH antes da ovulação, apesar das elevadas concentrações de inibina (ADAMS *et al.*, 2008; FORTUNE *et al.*, 2001). Ao término da onda, logo após a ovulação, ou mesmo antes da ovulação, desencadeado pelo pico de LH e mudanças funcionais no FD, há marcante diminuição dos hormônios ovarianos, especialmente da inibina, permitindo o desbloqueio hipotalâmico-hipofisiário que leva a um novo aumento na concentração de FSH e, conseqüentemente, à emergência de uma nova onda folicular que repetirá o processo e atingirá a dominância em meio ao diestro (AERTS & BOLS, 2010b; FORDE *et al.*, 2011; FORTUNE *et al.*, 2001).

3.3.2 Seleção folicular

Segundo Hodgen (1982), a seleção é o processo que resulta normalmente em um único folículo seguindo o curso do desenvolvimento. Em última análise, o próprio folículo, sozinho, pode evitar a atresia, possuindo a competência para atingir a ovulação com o passar do desenvolvimento. Ireland *et al.* (2000), a partir de novos conhecimentos acerca da foliculogênese obtidos principalmente na década de 1990, aprimoraram este conceito, afirmando a seleção ser um processo que resulta na redução do número de folículos em um grupo de folículos em crescimento para uma cota ovulatória espécie-específica.

Em cada onda folicular, os folículos recrutados serão sujeitos ao processo de seleção, pelo qual em espécies monovulatórias (bovinos, equinos, humanos), usualmente apenas um folículo se desenvolve até a dominância, ao passo que os subordinados entram em atresia (AERTS & BOLS, 2010b; GINTHER *et al.*, 2000b; 2016). O aumento transitório do FSH

responsável por estimular o início do crescimento da nova onda folicular atinge um platô quando os maiores folículos terciários presentes nos ovários atingem diâmetros entre 4 e 5 mm, diminuindo gradativamente (GINTHER *et al.*, 2015; KULICK *et al.*, 1999). Os níveis séricos máximos de FSH na primeira onda de crescimento folicular de um ciclo são normalmente expressos 28 horas após o início da fase de estro (MIHM & AUSTIN, 2002), e posteriormente, durante os três primeiros dias da nova onda folicular recém recrutada, quando os níveis de FSH começam a reduzir gradativamente (ADAMS *et al.*, 1992; ADAMS *et al.*, 1993a). Mesmo ainda dependentes deste hormônio, os folículos em crescimento iniciam a produção e liberação principalmente de inibina, mas também pequenas quantidades de estradiol, que resultarão na gradativa inibição da secreção de FSH, gerando níveis séricos inadequados desta gonadotrofina para que os folículos menores, recém emergidos, mantenham-se em crescimento (AERTS & BOLS, 2010b; GINTHER, 2016; MIHM & BLEACH, 2003). Segundo Gibbons *et al.* (1999), experimentos na espécie bovina revelaram que folículos terciários com diâmetro de 3 mm não suprimem a secreção de FSH, mas ao atingirem o tamanho de 5 mm de diâmetro, adquirem a capacidade endócrina em *feedback* negativo de suprimir a liberação de FSH.

Ao final da fase de crescimento comum dos folículos, o futuro FD, e em média dois a quatro FS, são selecionados para continuarem crescendo, mantendo a proliferação celular e a produção de estradiol, apesar da redução da concentração de FSH, devido à capacidade de manterem altas expressões de mRNA de receptores de FSH e afinidade de ligação aos receptores (BAO & GARVERICK, 1998; EVANS & FORTUNE 1997). Trata-se de uma questão de limiar de FSH, sendo que esta capacidade é maior no futuro FD, e menor nos subordinados (GINTHER *et al.*, 2001a; GINTHER, 2016). Beg e Ginther (2006) revisaram uma série de experimentos realizados para elucidar os fatores intrafoliculares que permitiam aos folículos terciários recrutados passarem pelo processo de seleção, e futuramente a

participar do processo de divergência e desvio de crescimento do futuro FD. Os autores reuniram duas ideias que propunham os fatores intrafoliculares que seriam centrais para o processo de seleção do futuro FD, sendo a teoria de Missouri (XU *et al.*, 1995), que propunha que o aumento da expressão de receptores de LH nas células da granulosa favoreciam a seleção do futuro FD, e a ideia da relação intrafolicular das proteínas *insulin-like growth factor* (IGF)-I e *insulin-like growth factor binding protein* (IGFBP)-4 e -5 (FORTUNE *et al.*, 2004; SPICER, 2004; SPICER & ECHTERNKAMP, 1994; SPICER & CHAMBERLAIN, 2002; SPICER *et al.*, 2002), que propunham que um aumento de IGF-I livre no líquido intrafolicular do FD, através do aumento de proteases da IGFBP-4 e -5, levaria a uma vantagem no crescimento folicular pelo sinergismo com o FSH e maior liberação de estradiol. A proposta de unir as duas ideias foi aceita, pois ficou evidente que ambos os processos ocorriam simultaneamente no futuro FD, sendo provavelmente essenciais para a ocorrência do desvio folicular e a aquisição da dominância (AUSTIN *et al.*, 2001; BEG & GINTHER, 2006; GINTHER, 2016; LUCY, 2007; MIHM & BLEACH, 2003).

3.3.3 Desvio e dominância folicular

O fenômeno de desvio observado na ultrassonografia (desvio aparente) ocorre quando se observa o início da diferença das taxas de crescimento entre os dois maiores folículos no momento, ou logo após a avaliação na qual o segundo maior folículo atinge seu tamanho máximo (GINTHER *et al.*, 1996). Ireland *et al.* (2000) definiram o evento do desvio folicular como a diferença na taxa de crescimento entre os dois maiores folículos de uma onda, que é determinado por ultrassonografia de forma retrospectiva (desvio aparente). Porém, o desvio não deve ser confundido com o processo de seleção, pois a seleção refere-se ao fenômeno associado com a redução do número de folículos originalmente recrutados em uma onda para posteriormente ovularem. Na verdade, o desvio folicular marca o final da

fase de seleção e é o ponto inicial do período de dominância folicular (IRELAND *et al.*, 2000).

Considerando o fenômeno de seleção e desvio que levam o crescimento folicular do futuro FD ao estágio de dominância, Ginther e colaboradores, após uma série de estudos (GINTHER *et al.*, 1996; 1997; 1998; 1999; 2000a; 2000b; 2001a; 2001b; 2003), desenvolveram uma teoria que sintetizava todos estes anos de estudos observacionais, convergindo para a teoria da seleção folicular na vaca (GINTHER, 2016). O autor propõe que a seleção do FD é totalmente representada pelo processo de desvio folicular, que inicia quando o futuro FD está próximo de 12 horas antes do início do desvio do diâmetro folicular (desvio aparente), ou antes que ele alcance um tamanho próximo de 8,5 mm, período em que a divergência entre os folículos é preponderante para levar ao d do diâmetro (desvio aparente) e dominância folicular (Figura 1). Um folículo que emerge antes pode manter uma vantagem de tamanho e tornar-se o FD por atingir o tamanho de 8,5 mm antes que seus subordinados (AERTS & BOLS, 2010b; GINTHER *et al.*, 1996; 2003; GINTHER, 2016). Porém, uma vantagem precoce de tamanho não é necessária para que ocorra a dominância e não deve ser considerado um componente do processo de desvio e seleção folicular. Em outras palavras, um folículo maior durante a fase de crescimento comum não representa dominância sobre os menores, não antes do início do processo de desvio do crescimento folicular (GINTHER, 2016).

Existem características no processo de desvio já observados em um estudo de Ginther *et al.* (2016) em que se caracterizou um padrão de desvio folicular regular, onde o futuro FD atinge em aproximadamente 2,5 dias o tamanho de 8,5 mm, enquanto seu FS apresenta em torno de 7 mm. Outra duas características alternativas observadas foram de um padrão de desvio folicular subdimensionado, onde o FS não atinge o tamanho de 7 mm enquanto o

futuro FD está próximo do tamanho de 8,5 mm, e de um padrão alternado, onde o futuro FD e o FS crescem em tamanhos muito próximos, havendo sempre uma troca em qual folículo poderá ser o FD, evidenciando que nem sempre o diâmetro folicular é um método confiável como indicador do estágio de desenvolvimento folicular, principalmente quando há uma pequena diferença de tamanho entre os dois maiores folículos na avaliação.

Ginther *et al.* (2001a) afirmaram que mesmo os folículos pequenos estáticos e/ou folículos emergidos tardiamente na onda são capazes de se tornarem FD, quando todos os folículos maiores forem aspirados e/ou entrarem em atresia ainda na fase de crescimento comum, ou seja, antes do desvio folicular. Quando foram aspirados (ablação) o maior folículo, os dois maiores folículos ou os três maiores folículos ao final da fase de crescimento comum, os níveis séricos de FSH aumentaram com mesma intensidade 12 horas após a ablação destes três grupos. Tornou-se evidente que o maior folículo regulava os níveis de FSH, juntamente com seus subordinados, através do *feedback* negativo, e pôde-se observar que os níveis de FSH continuaram a aumentar no grupo que três folículos foram aspirados, até o momento que os folículos menores adquirissem tamanho e capacidade de suprimir esta gonadotrofina (AERTS & BOLS, 2010b; GIBBONS *et al.*, 1999). Esta hierarquia folicular mostrou que um folículo somente está preparado para se tornar um FD no momento que este for maior do que 7 mm. Portanto, se um futuro FD for removido quando possuir 8,5 mm, e se o seu FS for maior do que 7 mm, este último assumirá a hierarquia e entrará espontaneamente no processo de desvio folicular (GINTHER *et al.*, 2001a).

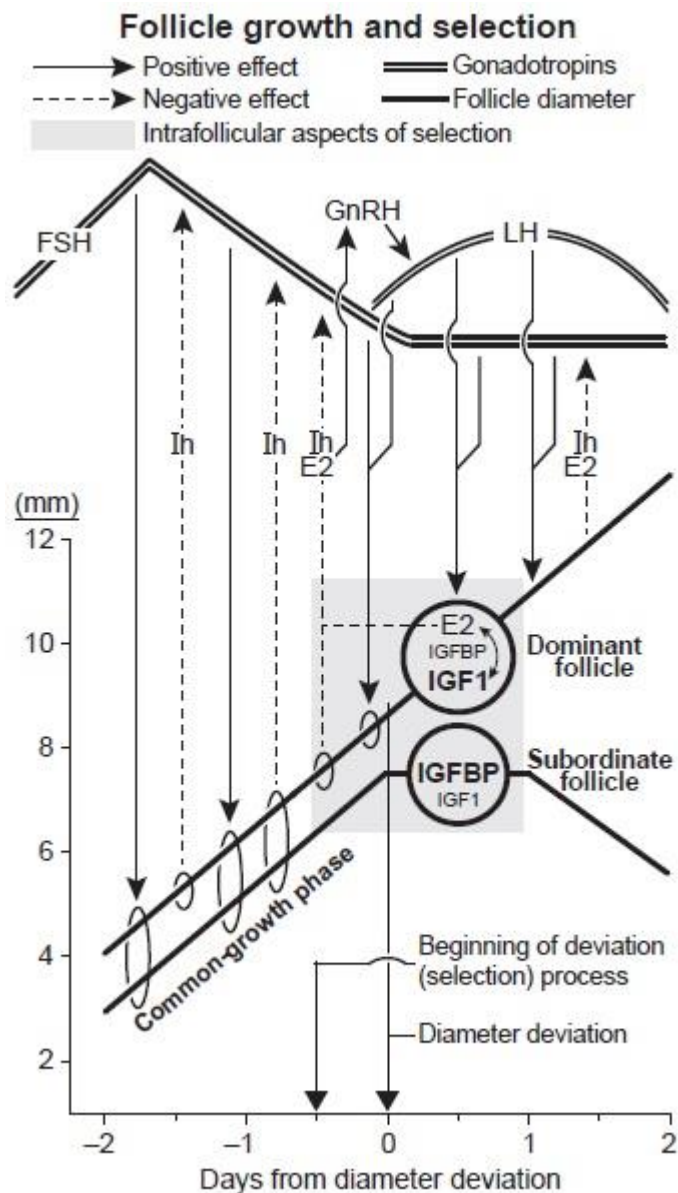


Figura 3 Ilustração da interrelação entre os hormônios circulantes (FSH, GnRH, LH, E2 e Ih) e os fatores intrafolliculares (E2, IGF1 e IGFBP) durante o crescimento folicular e ao início do processo de desvio folicular. O aumento da concentração de FSH antes do pico deste hormônio é um reflexo da baixa concentração dos supressores (Ih e E2) sobre esta gonadotrofina. Inicialmente, o FSH está estimulando todos os folículos, e a inibina é o primeiro supressor deste hormônio a ser liberado quando os folículos atingem 5 mm de diâmetro. Literalmente, a seleção ocorre contra os folículos subordinados, onde o folículo dominante continua seu crescimento, enquanto seus subordinados diminuem a taxa de crescimento, pois ao início do processo de desvio apenas o folículo dominante está preparado para manter seu desenvolvimento mesmo com as condições decrescentes de FSH. Durante o desvio, o E2 (assim como a Ih) atua como supressor do FSH e como um estimulante da liberação de LH, através da liberação de GnRH. Os efeitos intrafolliculares das gonadotrofinas são mediados através do sistema entre o IGF1 e o E2. O processo de desvio entre os 2 maiores folículos inicia 12 horas antes da manifestação aparente do desvio no diâmetro folicular, observado via exames ultrassonográficos. Os aspectos intrafolliculares envolvidos no desvio do processo de seleção folicular estão destacados pela caixa cinza. E2: estradiol; IGF1: *insuline-like growth fator 1*; IGFBP: *insuline-like growth fator binding protein*; Ih: inibina. Fonte: Ginther (2016).

Baseado na inspeção de gráficos do diâmetro individual dos futuros FD em diversas ondas, constatou-se que, em média, o início do processo de desvio folicular ocorre 2,5 dias após o recrutamento da onda, quando o futuro FD está com $\pm 8,5$ mm, e seu FS com aproximadamente 7,0 mm de diâmetro (BERGFELT *et al.*, 2003; GINTHER *et al.*, 1996; 1997; GINTHER, 2016). A maioria dos estudos que caracterizaram este evento foram realizados observando o desenvolvimento da primeira onda folicular (pós-ovulatória), mas estudos recentes demonstraram que os padrões de desvio folicular são semelhantes entre as ondas, apesar das diferenças entre as concentrações de progesterona e LH e da diferença inicial dos picos de FSH (GINTHER *et al.*, 2015; 2016a). Este desvio é representado pela vantagem adquirida do futuro FD sobre seus subordinados, uma vez que este folículo apresenta características intrafoliculares que o permitem seguir crescendo. Neste momento, o crescimento ocorre em condições de baixas concentrações de FSH e um pequeno aumento de LH, havendo a liberação de concentrações séricas de estradiol gradativamente maiores, que retroalimenta este estado de vantagem do futuro FD e desvantagem de seus subordinados, uma vez que estes não possuem as condições para se manter em crescimento (AERTS & BOLS, 2010b; BEG & GINTHER, 2006; BERGFELT *et al.*, 2000; GINTHER, 2016; GINTHER *et al.*, 1996; 2000a; 2001b; 2016a; 2016b; MIHM *et al.*, 2006). Detalhes dessa complexa interrelação entre os fatores intrafoliculares (IGI-I, IFGBP e estradiol) e as gonadotrofinas (FSH e LH) está representada na Figura 1 acima.

O LH é um fator chave durante no processo de desvio do futuro FD em relação aos seus subordinados (Figura 2). Ginther *et al.* (2001b) relataram que receptores do LH surgem nas células da granulosa do futuro FD cerca de 8 horas antes do início do processo de desvio folicular. Este fator é crucial para a manutenção do crescimento folicular do futuro FD, em um ambiente com uma baixa concentração de FSH e com um gradual aumento do LH, ocorrendo a transição de uma responsividade à gonadotrofina mais presente para a produção

de estradiol do FD, que resultará em um aumento na inibição do FSH em conjunto com a inibina (AERTS & BOLS, 2010b; BEG & GINTHER, 2006; FORTUNE *et al.*, 2001; GINTHER *et al.*, 1996; 2001b; MIHM *et al.*, 2006).

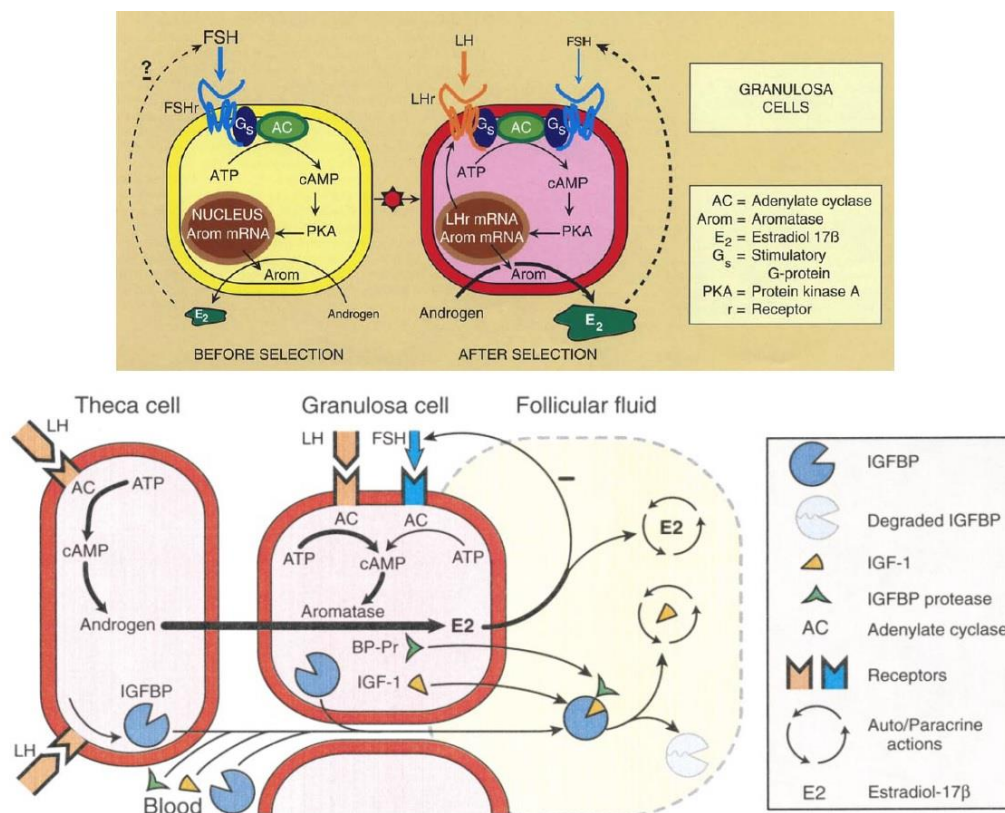


Figura 4. Modelo esquemático do aspecto celular do processo de desvio folicular envolvendo as células da granulosa e da teca do futuro FD em bovinos. Na parte superior do esquema observa-se a mudança que a célula da granulosa passa durante o processo de seleção e desvio folicular, onde passa a ter a presença de receptores de LH que seguirão aromatisando os andrógenos produzidos pelas células da teca em estradiol. Na parte inferior do esquema se observa a interação do FD, após o desvio, entre células da teca e da granulosa em relação à produção e liberação de estradiol no líquido folicular, IGF-1 livre e as proteases das IGFBP impedindo a ligação desta com as IGF-1, todas características presentes no futuro FD na desvio folicular. Adaptado de: Ginther *et al.* (1996; 2001b).

Com o crescimento folicular, o até então futuro FD torna-se dominante, sendo a única estrutura remanescente da onda folicular. Quando o FD se torna dependente do LH, este tem apenas dois destinos: a ovulação ou a atresia (AERTS & BOLS, 2010b; LUCY *et al.*, 2007). Durante a dominância, mudanças funcionais, como o declínio na proporção intrafolicular de

estradiol/progesterona (MIHM *et al.*, 2006), tem como objetivo prepará-lo para a ovulação. Um FD que não é exposto ao pico de LH irá sobreviver por um curto período até se tornar atresico (VALDEZ *et al.*, 2005). Durante este período, o FD é dependente de fatores de crescimento que promovem a transição da fase de G1 para a fase S do ciclo celular e previne a apoptose das células da granulosa (QUIRK *et al.*, 2004). O aumento crescente dos níveis séricos de estradiol em conjunto com a luteólise e queda abrupta da concentração de progesterona irão desencadear os sinais característicos de estro na fêmea e a sensibilização no centro pré-ovulatório do hipotálamo, liberando um pico de GnRH que irá desencadear uma rápida liberação, em uma alta amplitude, de LH pela hipófise anterior, ocasionando a ovulação do FPO (AERTS & BOLS, 2010b; FORDE *et al.*, 2011).

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

A maioria dos estudos sobre a fisiologia reprodutiva, particularmente relacionados à função ovariana, utilizam como modelo experimental animais de raças taurinas (*Bos taurus taurus*; GINTHER *et al.*, 1989b; SAVIO *et al.*, 1988; SIROIS & FORTUNE, 1988), mas devido à grande importância, principalmente em países tropicais, como a maior parte do Brasil, muitos estudos também têm sido realizados para elucidar as características da fisiologia reprodutiva de fêmeas zebuínas (*Bos taurus indicus*; CHENOWETH, 1994; RHODES *et al.*, 1995; FIGUEIREDO *et al.*, 1997). Uma das primeiras diferenças observadas se refere às características do estro comportamental das fêmeas zebuínas, com Galina e Arthur (1990) relatando que os sinais de estro são geralmente caracterizados por um período mais curto, de aproximadamente 10 h de duração, variando de 1 a 20 h (BÓ *et al.*, 2003), o que dificulta a detecção. Somado a isso, mais de 50% das fêmeas zebuínas iniciam a manifestação de sinais de estro no período noturno, sendo que cerca de 30% iniciam e encerram o estro durante a noite (PINHEIRO *et al.*, 1998). Já não há diferença

entre os grupos genéticos quanto ao intervalo médio do início dos sinais de estro e da ovulação, ocorrendo de 26 a 28 h em fêmeas zebuínas do início da observação do estro até a ovulação (BARUSELLI *et al.*, 2007; PINHEIRO *et al.*, 1998; SARTORI & BARROS, 2011).

Em comparação a fêmeas taurinas, a duração do ciclo estral em fêmeas zebuínas também é de 20 a 22 dias, também se observando uma predominância de fêmeas com duas a três ondas foliculares no intervalo interovulação (FIGUEIREDO *et al.*, 1997). Porém, estudos já observaram a ocorrência de fêmeas zebuínas com 4 e até 5 ondas foliculares entre duas ovulações, em especial em novilhas da raça Nelore (FIGUEIREDO *et al.*, 1997; MOLLO *et al.*, 2007; SARTORELLI *et al.*, 2005), e em vacas das raças Gir (GAMBINI *et al.*, 1998; VIANA *et al.*, 2000) e Brahman (RHODES *et al.*, 1995; ZEITOUN *et al.*, 1996). Além desta diferença no número de ondas foliculares, diversos estudos já descreveram que fêmeas zebuínas recrutam um maior número de folículos a cada onda folicular do que fêmeas taurinas (ALVAREZ *et al.*, 2000; BURATINI *et al.*, 2000; CARVALHO *et al.*, 2008). Carvalho *et al.* (2008) observaram uma média de $33,4 \pm 3,2$ folículos pequenos em raças zebuínas (Nelore e Gir), em comparação como $25,4 \pm 2,5$ folículos pequenos em raças taurinas (Angus e Holandesa) na emergência de suas respectivas ondas foliculares. Esta diferença significativa entre a população folicular recrutada em cada onda pode estar associada com a diferença nas concentrações de IGF-I, uma vez que Alvarez *et al.* (2000) relataram que vacas zebuínas apresentam maiores concentrações de IGF-I e menores concentrações de FSH quando comparadas a fêmeas taurinas. É especulado que o IGF-I pode aumentar a responsividade dos folículos ao FSH (BARROS & NOGUEIRA, 2001), e este seria um dos principais motivos pelo qual fêmeas zebuínas tem boas respostas à protocolos de SOV com menores doses do que fêmeas taurinas. Estas características foliculares auxiliaram muito no crescimento comercial da OPU-PIV, principalmente no Brasil, onde se

observam altas taxas de recuperação de oócitos após a OPU de fêmeas zebuínas, proporcionando uma maior produção de embriões *in vitro* por sessão, quando comparado com fêmeas taurinas (GIMENES *et al.*, 2010; GONÇALVES & VIANA, 2019).

Outra diferença marcante entre fêmeas taurinas e zebuínas se refere ao tamanho dos folículos no desvio e dominância folicular, sendo que em fêmeas zebuínas se observam diâmetros menores dos folículos nestes eventos. Diferentemente de fêmeas taurinas, o tamanho do futuro FD e seu FS imediato ao início do desvio é de 5,5 a 6,5 e de 5,0 a 6,0 mm, respectivamente (CASTILHO *et al.*, 2007; GIMENES *et al.*, 2008; SARTORELLI *et al.*, 2005). O diâmetro máximo do FD também é menor em fêmeas *Bos taurus indicus* comparadas com fêmeas *Bos taurus taurus*, podendo variar de 10 a 13 e de 12 a 22 mm, respectivamente (CARVALHO *et al.*, 2008; FIGUEIREDO *et al.*, 1997; MACHADO *et al.*, 2008; RODHES *et al.*, 1995; SARTORELLI *et al.*, 2005). Porém, o início do desvio folicular ocorre em média 2,3 a 2,8 dias após a emergência da nova onda, evidenciando que a duração do ciclo e os tempos em que ocorrem os eventos na onda folicular são semelhantes entre os grupos genéticos, mas com o diâmetro folicular diferindo entre fêmeas taurinas e zebuínas, evidenciando uma taxa de crescimento folicular menor em matrizes *Bos taurus indicus* (0,9 mm/dia; CARVALHO *et al.*, 2008; FIGUEIREDO *et al.*, 1997) do que em fêmeas *Bos taurus taurus* (1,1-2,0 mm/dia; CARVALHO *et al.*, 2008; KNOPF *et al.*, 1989; SARTORI *et al.*, 2004; SIROIS & FORTUNE, 1988). Outro fator já evidenciado e que está intimamente relacionado ao diâmetro máximo do FD é a diferença entre as concentrações séricas de estradiol e progesterona entre fêmeas taurinas e zebuínas, que se dá devido a um menor tamanho do FD, e conseqüentemente, uma menor secreção de estradiol, seguida da formação de um CL menor, que produzirá uma menor quantidade de progesterona, ainda fisiológica (CARVALHO *et al.*, 2008; FIGUEIREDO *et al.*, 1997; MACHADO *et al.*, 2008; MOLLO *et al.*, 2007; SARTORI *et al.*, 2002).

3.5 Sincronização de uma nova onda folicular

O sucesso da manipulação do ciclo estral para os diferentes objetivos almejados pelas biotécnicas da reprodução animal passa obrigatoriamente pelos estudos pioneiros que caracterizaram o ciclo estral bovino, conduzidos por Boyd (1925), Brewster & Cole (1941) e De Alba & Asdell (1946), que identificaram e isolaram os hormônios do eixo HHG, por Allen & Doisy (1923), Allen (1930), Fevold *et al.* (1931) e Casida (1938), e que descreveram o fenômeno da dinâmica folicular bovina, por Rajakoski (1960) e Ginther *et al.* (1989a; 1989b), o que coletivamente permitiria posteriormente a manipulação e a sincronização mais precisa do ciclo estral e da ovulação em bovinos por meio do uso de hormônios sintéticos (BRITT *et al.*, 1974; LAUDERDALE *et al.*, 1974; MAUER *et al.*, 1975; ZOLMAN *et al.*, 1973; PURSLEY *et al.*, 1995; MAPLETOFT *et al.*, 2018; STEVENSON & BRITT, 2017).

Historicamente, no final da década de 1940 e início da década de 1950, a manipulação do ciclo estral se iniciou através do uso de progesterona fornecida via oral, diariamente, misturada a um óleo vegetal para prevenir o estro e a posterior ovulação (ULBERG *et al.*, 1951). A descoberta dos hormônios endógenos GnRH e da PGF_{2α} e o desenvolvimento de formas sintéticas permitiu que se induzisse a luteólise e ovulação de uma forma síncrona em algumas fêmeas (LAUDERDALE *et al.*, 1974; 1974; MAUER *et al.*, 1975; ZOLMAN *et al.*, 1973). Com o advento da ultrassonografia, já no final da década de 1980, houve a possibilidade de um melhor entendimento da dinâmica folicular bovina e os efeitos que os hormônios tinham sob as estruturas ovarianas em diferentes momentos do ciclo, permitindo que os principais métodos de manipulação e sincronização de uma nova onda folicular fossem desenvolvidos na década de 1990 (BÓ *et al.*, 1991; BERGFELT *et al.*, 1994; MACMILLAN & PETERSON, 1993; MACMILLAN *et al.*, 1991, 1993; PURSLEY *et al.*, 1995). Formas evoluídas destes protocolos são amplamente utilizados até hoje, com

algumas variações e aprimoramentos, porém o conceito básico se manteve ao longo das décadas (MAPLETOFT *et al.*, 2018; STEVENSON & BRITT, 2017).

3.5.1 Método hormonal

O grupo do Professor Reuben Mapletoft, do Departamento de Medicina de Rebanhos e de Teriogenologia da Universidade de Saskatchewan/Canadá e o Professor Kate MacMillan do *Dairying Research Corporation Ltd* de Hamilton/Nova Zelândia, realizaram uma série de estudos, independentemente, que corroboraram com o estabelecimento do uso de ésteres de estradiol em conjunto com insertos/implantes de P4 ou gestágenos para induzir uma nova onda folicular de 3 a 5 dias após a aplicação dos esteroides (BÓ *et al.*, 1991; 1993; 1994a; 1994b; 1995a; 1995b; 1996; MACMILLAN & PETERSON, 1993; MACMILLAN *et al.*, 1991, 1993). O tratamento com ésteres de estradiol tem como base fisiológica simular a ação que um FD causaria sobre os FS, em uma condição de alta concentração de P4. A ideia por trás deste protocolo é de que um grande aumento sérico dos níveis de estradiol causaria a supressão do FSH, que levaria à atresia de todos os folículos FSH-dependentes presentes no momento da aplicação do éster de estradiol. Uma vez metabolizado o estradiol, um pico de FSH e a emergência de uma nova onda folicular ocorrem, em média 4 dias após o tratamento (BÓ *et al.*, 1995; MACMILLAN & PETERSON, 1993; MACMILLAN *et al.*, 1993; MAPLETOFT & BÓ, 2013). Naqueles estudos, relatou-se uma alta eficiência da indução de uma nova onda folicular, apesar de não quantificada, levando à sincronia de fêmeas e a subsequente aplicação nas diversas biotécnicas reprodutivas (IATF, SOV, TETF e OPU). Não obstante, em alguns dos casos, os autores citaram que em alguns animais houve uma diferença na emergência da onda, ou mesmo a falha de ovulação ao final dos tratamentos, sendo tais animais excluídos das análises. Resultados com estes animais devem ser mais bem explorados para o entendimento das causas das falhas e das diferenças de resposta. Porém, inúmeros outros autores (BRIDGES *et al.*, 1999; BURKE *et al.*, 2001;

COLAZO *et al.*, 2005; DISKIN *et al.*, 2002; MADUREIRA *et al.*, 2020; MARTÍNEZ *et al.*, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2015) relataram haver falhas na indução de uma nova onda folicular, de menor a maior grau, em protocolos baseados principalmente na aplicação de benzoato de estradiol (BE) em conjunto com um inserto intravaginal de P4, mas também de outros ésteres de estradiol, como o valerato de estradiol (VE) e o Estradiol-17 β (E-17 β).

3.5.2 Método físico

Estudos iniciais após a ablação folicular por electrocauterização por laparotomia demonstraram que a remoção do FD durante a fase de crescimento comum acelerou a emergência da próxima onda folicular (ADAMS *et al.*, 1993b; KO *et al.*, 1991). Foi baseado nestas observações que Bergfelt *et al.* (1994) realizaram um estudo para testar se a ablação folicular por OPU induziria a emergência de uma nova onda folicular síncrona, e se após a aplicação de PGF_{2 α} , ocorreria uma ovulação síncrona em novilhas *Bos taurus taurus*. A ablação folicular consiste na aspiração de todos os folículos ≥ 5 mm de diâmetro presentes no córtex ovariano, em um estágio desconhecido/aleatório do ciclo estral. Através de acompanhamento ultrassonográfico diário, revelou-se que a ablação folicular resultou em uma emergência síncrona de uma nova onda folicular em aproximadamente, 1,5 dias após o procedimento. Outros trabalhos foram realizados posteriormente e comprovaram a eficiência da metodologia, corroborando com o tempo médio do recrutamento da onda induzida (AMIRIDIS *et al.*, 2006; BARACALDO *et al.*, 2000; BERGFELT *et al.*, 1997a; GARCIA & SALAHEDDINE, 1998; KIM *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2007).

3.6 Manipulação do ciclo estral por meio da sincronização de uma nova onda folicular para uso nas principais biotécnicas reprodutivas

O surgimento de conceitos sobre a dinâmica folicular ovariana, a fisiologia reprodutiva e o desenvolvimento de fármacos que atuam no sistema reprodutivo de fêmeas estão constantemente dando suporte para o crescimento e melhoramento das biotécnicas da

reprodução animal. Com o passar dos anos, as biotécnicas relacionadas com a sincronização do desenvolvimento folicular e a manipulação do ciclo estral bovino têm progredido rápido e consistentemente. O uso da IATF, da SOV/MOET, da OPU-PIV e da TETF tem tido um grande papel no aumento da eficiência reprodutiva dos rebanhos e na disseminação de genética superior, diminuindo o intervalo entre gerações e aumentando o ganho genético do rebanho (BARUSELLI *et al.*, 2017; SARTORI *et al.*, 2016). Com o surgimento de protocolos de manipulação do ciclo estral e da sincronização de uma nova onda folicular e da ovulação, a necessidade de se observar os sinais de estro se tornou menos importante em muitos sistemas que adotaram tais manejos. Na emergência destes protocolos mais recentes de manipulação do ciclo, as técnicas de IA, TE, SOV-MOET e mesmo a PIV já eram conhecidas e bem estabelecidas. Os protocolos hormonais surgiram para somar às técnicas já implementadas, reduzindo os intervalos de tempo para as aplicações (por exemplo, de protocolos de superovulação), aumentando a eficiência de aplicação das tecnologias reprodutivas nos rebanhos bovinos de corte e de leite (MOORE & HASLER, 2017; STEVENSON & BRITT, 2017).

O emprego da IA tem o intuito de melhorar o ganho genético e a eficiência reprodutiva dos rebanhos, acelerando o ganho genético e provendo proles mais produtivas que irão gerar um maior retorno econômico para o sistema (BARUSELLI *et al.*, 2019; BÓ *et al.*, 2018). Para tanto, sistemas simples, eficientes e eficazes favorecem o uso da IA. No Brasil, por exemplo, a implementação de protocolos de sincronização do estro e da ovulação levaram ao aumento significativo do emprego da IA, pela IATF nas propriedades, que começou a ser disseminada significativamente no início da virada do milênio (BARUSELLI *et al.*, 2019). Segundo Baruselli *et al.* (2019), o número de protocolos comerciais de IATF no ano de 2002 no Brasil foi de 100 mil, o que representou 1% das inseminações realizadas no país naquele ano. Já em 2018, o número de protocolos de IATF aplicados no país foi de

13,3 milhões, representando 86% das inseminações, para 13,1% do total de matrizes do rebanho nacional, evidenciando que existe a grande possibilidade de melhorar ainda mais este índice, o que conseqüentemente trará benefícios para a cadeia produtiva brasileira.

Sob o ponto de vista da IATF e da TETF, é de grande importância que o procedimento de indução de uma nova onda folicular seja o mais síncrono e eficiente possível. Contudo, existem outros fatores que podem interferir na resposta e desempenho subsequentes à indução, que dependem muito de fatores individuais das fêmeas e de fatores externos, que em conjunto podem aumentar a variabilidade da resposta (BARUSELLI *et al.*, 2017a; BÓ *et al.*, 2018; WILTBANK & PURSLEY, 2014). Devido à alta escalabilidade em que a ferramenta da IATF é aplicada, falhas ou erros na sincronização podem possuir um grande impacto produtivo e econômico nos resultados (BARUSELLI *et al.*, 2019; MAPLETOFT *et al.*, 2018; STEVENSON & BRITT, 2017). Procedimentos práticos, eficientes e eficazes ainda são necessários serem melhor aplicados para o aumento na taxa de indução de uma nova onda folicular, seguida do crescimento e ovulação em janela biológica que salvguarde a concepção em um maior número de fêmeas após a IATF. Os métodos físicos já se mostraram altamente eficientes na indução de uma nova onda folicular síncrona na totalidade das fêmeas aspiradas, porém devido a necessidade de métodos mais práticos e de baixo custo nestas operações aplicadas em alta escalabilidade, tais procedimentos complexos, como a ablação folicular para indução e sincronização de uma nova onda folicular, não se tornam viáveis na prática.

A transferência de embriões tem sido utilizada mundialmente de forma comercial desde a década de 1970 para reproduzir a genética das melhores fêmeas do rebanho. Porém, fatores como nutrição, manejo e eficiência na detecção do estro afetam a disseminação desta tecnologia, principalmente em sistemas de cria de bovinos de corte (BÓ *et al.*, 2012). Os tradicionais tratamentos com $\text{PGF}_{2\alpha}$ a intervalos de 11 a 14 dias para a sincronização do

estro, com subsequente observação de estro (BROADBENT *et al.* 1991), eram utilizados para sincronizar fêmeas doadoras e receptoras de embriões. Porém, se todas as fêmeas são cíclicas, aproximadamente 80% delas mostram sinais de estro durante os cinco dias seguintes à última aplicação da $PGF_{2\alpha}$, devido fundamentalmente à ineficiência na detecção do estro e à variabilidade individual no intervalo do tratamento até o estro e ovulação, com cerca de 50% de receptoras tratadas estando aptas a receber um embrião sete dias após o estro (BÓ *et al.*, 2002). O uso de técnicas de controle da dinâmica folicular e da ovulação reduziram a necessidade da detecção dos sinais de estro, e oportunizaram a aplicação de programas de melhoramento genético utilizando a tecnologia de TE em rebanhos de corte e de leite. Os inúmeros protocolos que originalmente foram desenvolvidos para os programas de IATF permitiram o planejamento da TE, a TETF, sem a necessidade de detecção de estro, os quais não comprometeram os resultados (BÓ *et al.*, 2012).

A prática de superestimulação hormonal ovariana, superovulação ou SOV de fêmeas doadoras de alto mérito genético teve aplicação paralela com os programas de TE comercial, já que a SOV visa o aumento da taxa ovulatória e, conseqüentemente, um aumento no número de embriões a serem recuperados em uma coleta de uma fêmea doadora em um dado momento. Pela SOV, induz-se a codominância folicular durante o crescimento folicular para que o maior número atinja tamanho e condições para posterior ovulação e fecundação, maximizando o número de embriões produzidos, normalmente após a utilização de algum hormônio com efeito folículo estimulante (BÓ & MAPLETOFT, 2014). Protocolos hormonais para a superestimulação ovariana já passaram por inúmeras alterações, como pelo uso da gonadotrofina coriônica equina (eCG; PHILLIPPO & ROWSON, 1975) ou de extratos de pituitária suína (ELSDEN *et al.*, 1978), até o uso de FSH pituitário purificado para estimular o crescimento múltiplo folicular. Um dos fatores chave para o sucesso da SOV é o momento em que se inicia o protocolo hormonal, que para ser efetivo deve ser

concomitante ao início do recrutamento da nova onda folicular (BÓ & MAPLETOFT, 2014; MIKKOLA *et al.*, 2020; PHILLIPS & JAHNKEN, 2016). Após décadas de protocolos experimentais, e até o advento de análogos sintéticos comerciais da $PGF_{2\alpha}$, os tratamentos superovulatórios eram iniciados no final do diestro, normalmente pelo uso de doses únicas de eCG ou múltiplas doses sequenciais de extrato de pituitária suína, buscando aproveitar a luteólise natural do ciclo das fêmeas doadoras (BETTERIDGE, 2003; BÓ & MAPLETOFT, 2014; MAPLETOFT & BÓ, 2012). Com o desenvolvimento de FSH purificado de pituitária suína, pelo uso de análogos sintéticos comerciais da $PGF_{2\alpha}$ para a manipulação do ciclo estral, e com o desenvolvimento de métodos não-cirúrgicos de coleta de embriões, em geral na década de 1970, novos protocolos experimentais passaram a ser utilizados e aplicados comercialmente, alcançando-se sucesso gradual na produção de embriões *in vivo* (BETTERIDGE, 2003; BÓ & MAPLETOFT, 2014; MOORE & HASLER, 2017). Após anos de observações, avanços na fisiologia e na descoberta e síntese de hormônios de forma exógena, os protocolos de SOV aplicados em bovinos desde o final dos anos 1970 fazia uso da sincronização do ciclo estral com $PGF_{2\alpha}$ e observação de sinais de estro das doadoras, para que o tratamento hormonal com FSH exógeno fosse iniciado entre os Dias 8 e 12 do ciclo estral, normalmente caracterizado por oito doses sequenciais decrescentes de FSH a intervalos de 12 h, com a aplicação de análogo da $PGF_{2\alpha}$ no final do tratamento hormonal, seguido da observação de estro e duas IAs, 12 e 24 h após o início do estro, para a coleta dos embriões nos Dias 6 a 7 do novo ciclo (BÓ *et al.*, 1995a). À época, não se detinha o conhecimento detalhado da dinâmica folicular em bovinos, tendo-se alcançado sucesso relativo neste tipo de protocolo por meio de “tentativa-e-erro”. Tais protocolos exigiam comumente mais de 30 dias desde o início da sincronização dos ciclos estrais. Posteriormente, avanços foram alcançados a partir do conhecimento das ondas foliculares e do processo de dinâmica folicular, que inclui o recrutamento de folículos terciários

gonadotrofino-dependentes de pequenos tamanho (4 a 5 mm), a seleção da população folicular recrutada por atresia, com a permanência dos folículos de maior tamanho em crescimento, e a dominância folicular, caracterizada pela presença de apenas um folículo rico em receptores de LH que busca sinalizar o eixo hipotalâmico-hipofisiário para a secreção de LH e subsequente maturação folicular e oocitária, luteinização e ovulação (GINTHER, 2016; MIHM *et al.*, 2006; SCARAMUZZI *et al.*, 2011; WEBB *et al.*, 2016). Com o avanço nestes conhecimentos, percebeu-se que o intervalo entre 8 e 12 dias do ciclo que outrora utilizava-se para a superovulação estava normalmente associado ao início da segunda onda folicular na fêmea doadora, o que estava associado ao maior sucesso do protocolo de SOV do que outras fases do ciclo estral (BÓ & MAPLETOFT, 2014; MIKKOLA *et al.*, 2020).

Com o advento dos protocolos hormonais de sincronização do estro e da ovulação com vistas à IA e IATF, a aplicação para a SOV foi rápida e natural, tornando o protocolo completo significativamente mais curto e de fácil aplicação. Com os novos protocolos para a produção *in vivo* de embriões, houve um aumento de eficiência na aplicação dos protocolos hormonais, por meio de pelo menos dois processos: (a) pelo gradual aumento de disponibilidade comercial de hormônios ou análogos sintéticos de melhor qualidade, efetividade biológica e/ou purificação (peptídicos, protéicos, esteroides e ésteres de esteroides, eicosanoides), que em muito foram desenvolvidos pela enorme expansão comercial da IATF no Brasil e no mundo; e (b) pela otimização do cronograma de aplicação de um protocolo de superovulação, que outrora demandava aproximadamente 35 dias desde o início da sincronização dos ciclos estrais das doadoras até a coleta dos embriões, para protocolos que demandam hoje 15 a 16 dias desde o início até o final (coleta de embriões).

Antes da aplicação dos protocolos modernos para a SOV de fêmeas doadoras, Boland *et al.* (1991) constataram que cerca de um terço das fêmeas doadoras tratadas hormonalmente não respondiam ao tratamento superovulatório, cerca de um terço produzia de 1 a 3 embriões viáveis/doadora, enquanto apenas o terço restante realmente produzia um número significativo de embriões transferíveis por doadora, com a média final se situando entre 5 e 7 embriões viáveis por doadora. Presume-se que uma proporção destas falhas se deve a falhas na correta indução de uma nova onda folicular, em adição a erros de dosagens hormonais, do momento adequado de início e manutenção da estimulação ovariana, e de falhas no processo de indução da ovulação múltipla. Mais recentemente, Hasler (2014) confirmou que a eficiência dos protocolos de SOV em bovinos permaneceu relativamente constante no mundo desde a década de 1980, permanecendo com uma média de 5 a 7 embriões transferíveis por doadora, inobstante o protocolo de SOV utilizado, fator racial ou localização geográfica (HASLER, 2010; MIKKOLA *et al.*, 2020; PHILLIPS & JAHNKE, 2016). Uma das causas fundamentais de tal variação na resposta superovulatória parece residir na população de folículos responsivos a gonadotrofinas presentes nos ovários no início do tratamento superestimulatório (IRELAND *et al.*, 2007; SINGH *et al.*, 2004), sendo a variabilidade individual da resposta ovariana ao tratamento com gonadotrofinas entre as fêmeas doadoras o fator mais limitante do sucesso da SOV (HASLER, 2010; LONERGAN, 2007; MIKKOLA & TAPONEN, 2017; MIKKOLA *et al.*, 2020). Isto evidencia a importância de se induzir efetivamente uma nova onda folicular, e conseqüentemente, iniciar o tratamento de SOV no início do recrutamento desta nova onda, para que se obtenha o máximo de ovulações, fecundações e coleta de estruturas viáveis.

Sob o ponto de vista da OPU-PIV de embriões, e considerando as características do Brasil, onde a grande maioria das atividades são realizadas com raças zebuínas, não se torna tão relevante a sincronização de uma nova onda folicular, muito menos a superestimulação

exógena com FSH, com a OPU ocorrendo em estágios aleatórios da dinâmica folicular (BERNAL *et al.*, 2016; GONÇALVES & VIANA, 2019; VIANA *et al.*, 2018). Porém, para bovinos de raças europeias (taurinas), e em especial na América do Norte, atualmente associam-se protocolos de sincronização de uma nova onda folicular com a superestimulação com FSH exógeno visando a codominância folicular e aspiração antes do pico de LH e da ovulação (BARUSELLI *et al.*, 2012; BÓ & MAPLETOFT, 2019; HASLER, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2016; ONGARATTO *et al.*, 2020), com a aplicação do *coasting* folicular para o aumento da competência oocitária, que é um processo que tenta mimetizar a fase final do crescimento comum dos folículos, onde há um ambiente com baixos níveis de FSH e necessita-se um aumento sérico de LH, características necessárias para o desenvolvimento folicular final e maturação oocitária necessárias para que ocorra a ovulação e subsequente fecundação do oócito. Portanto, o procedimento de *coasting* consiste em permitir que ocorra uma queda no FSH após a última aplicação do FSH nos protocolos de superovulação de 33 a 48 horas para posterior realização da aspiração dos oócitos, por isto também é denominado de *FSH starvation* (BLONDIN *et al.*, 2002; LANDRY *et al.*, 2016; NIVET *et al.*, 2012). Tais procedimentos normalmente têm resultado em maiores taxas de recuperação de oócitos mais competentes, aumentando a eficiência e eficácia na produção *in vitro* de embriões (BARUSELLI *et al.*, 2016; BÓ & MAPLETOFT, 2019; ONGARATTO *et al.*, 2020; VIEIRA *et al.*, 2014), que à primeira vista levaram aqueles países à competição lado-a-lado com o Brasil pela liderança na PIV de embriões bovinos no mundo nos últimos cinco anos (VIANA, 2020).

Em síntese, grandes foram os avanços na aplicação de distintos hormônios sobre a função reprodutiva, em especial ovariana, mimetizando processos e eventos biológicos. O uso eficiente de protocolos hormonais para a indução de uma nova onda folicular permitiu a adequação de terapias hormonais adicionais que não somente sincronizam o estro, mas

principalmente, sincronizam a ovulação. Este sucesso tornou a IATF operacional em grande escala, o que tem revolucionado a disseminação de genética aos rebanhos em escala antes não antecipada, para categorias animais (fêmeas em anestro, com cria ao pé) que anteriormente também apresentavam taxas baixas a médias de repetição de cria. Se de um lado, mesmo que o uso da IATF não determine a concepção, a terapia hormonal antecipa a ciclicidade nestas fêmeas em anestro, o que por si traz benefícios econômicos ao produtor. Porém, ainda há margem para o aumento da eficiência do processo, e o conhecimento da fisiologia e das respostas dos animais frente a distintos protocolos poderá permitir uma diminuição de falhas desde a indução de uma nova onda folicular até a ovulação síncrona com a IA. Tais avanços também deverão beneficiar a produção de embriões, seja *in vivo*, pela SOV/TE, seja *in vitro*, pela OPU-PIV e TE, com melhor aproveitamento de fêmeas receptoras também pela TETF.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local, animais, manejo geral e nutricional

Foram realizados dois experimentos junto ao rebanho de bovinos de corte da Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA/UFRGS), localizada no município de Eldorado do Sul/RS. Para a realização dos manejos e procedimentos dos experimentos, os animais eram conduzidos calmamente ao curral de manejo onde eram manipulados em um tronco de contenção. As fêmeas utilizadas durante todo o período experimental foram mantidas sob regime alimentar extensivo em piquetes de campo nativo, com suplementação mineral e água *ad libitum*.

4.2 Seleção das fêmeas dos experimentos

Sete dias antes do início de cada experimento, um total de 80 fêmeas nulíparas (novilhas) e múltíparas (vacas) da raça Brangus (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*) foi selecionado para utilização nos Experimentos 1 (nulíparas, n = 48) e 2 (múltíparas, n = 32), executados em intervalos de tempo distintos. As fêmeas de cada categoria animal, em cada experimento, foram individualmente identificadas quanto à pelagem (vermelha ou preta), e pela tatuagem auricular e brincos numerados em ambas as orelhas. Selecionaram-se fêmeas púberes e cíclicas com escore de condição corporal (ECC) entre 2,5 e 3,5 (em escala de 1 a 5), *frame* de 3,5 a 6,0 (escala de 1 a 10). Tanto o ECC quanto o *frame* dos animais foram realizados por inspeção visual pelo mesmo técnico em todas as avaliações do experimento. O ECC das fêmeas foi reavaliado no início e no final dos experimentos, incluindo as etapas de seleção dos animais, não havendo diferença estatística entre os ECCs das fêmeas de ambos os experimentos, tampouco dos ECCs do início do experimento em relação ao final. As fêmeas foram avaliadas individualmente, em troncos de contenção, por meio de exame ginecológico por palpação retal e ultrassonografia em tempo real de Modo B (Mindray, DP 2200 Vet, Schenzen, China), com transdutor linear de frequência de 7,5

MHz. Ao exame ginecológico, baseado em Grunert & Berchtold (1988) e Rosenberger (1993), consideramos semiologicamente (a) o tamanho ovariano, a presença, o número, o tamanho, e as características das estruturas ovarianas (folículos, corpos lúteos), e a funcionalidade ovariana (eventos da dinâmica folicular e ovulação), e (b) o tamanho e a forma do útero e da cérvix, a espessura e a simetria dos cornos uterinos, o tônus (contratilidade) uterino e a evidência e características de conteúdo intrauterino por avaliação ultrassonográfica. Também foram avaliadas por inspeção a vulva e o vestíbulo. As fêmeas foram consideradas cíclicas quando apresentavam ovários de tamanho fisiológico e funcionais, com uma população folicular significativa e dinâmica folicular evidente, contendo um FD e/ou CL presente no momento da avaliação, e tônus uterino pelo menos médio (de flácido a contraído).

Em cada experimento, fêmeas hípidas nulíparas e múltiparas da raça Brangus, não-prenhes, não-lactantes, e cíclicas foram distribuídas de forma homogênea em (1) grupo Controle ou Benzoato de Estradiol (BE), e (2) Grupo Tratamento ou *Ovum Pick Up* (OPU), conforme abaixo. No Experimento 1, foram selecionadas 34 nulíparas de dois a três anos de idade ($2,1 \pm 0,1$ anos) de um total de 48 fêmeas, das quais metade foi designada ao grupo BE (n=17) e a outra metade ao grupo OPU (n=17). No Experimento 2, foram selecionadas 22 fêmeas múltiparas predominantemente entre quatro e cinco anos de idade ($4,1 \pm 0,2$ anos) de um total de 32 fêmeas. As fêmeas selecionadas neste experimento foram homogeneamente alocadas aos grupos BE (n=11) e OPU (n=11). Após a seleção, o escore de *frame* médio das fêmeas nulíparas (Experimento 1) foi de $4,3 \pm 0,1$, variando de 3,5 a 5,0, e nas múltiparas (Experimento 2) foi de $4,5 \pm 0,2$, variando de 3,5 a 6,0. Os ECCs das fêmeas no início e no final dos experimentos foram de $2,76 \pm 0,04$ e $2,72 \pm 0,03$ no Experimento 1, e de $2,64 \pm 0,05$ e $2,61 \pm 0,05$ no Experimento 2, respectivamente, sendo homogêneos e semelhantes. A diferença de ECC entre o final e o início do experimento foi de $-0,04 \pm 0,03$

para as fêmeas nulíparas (Experimento 1) e de $-0,02 \pm 0,04$ para as fêmeas múltíparas (Experimento 2), sendo semelhantes entre grupos em cada experimento, o que corrobora com a homogeneidade da distribuição das fêmeas por grupo experimental.

4.3 Manipulação do ciclo estral bovino para a sincronização do estro e da ovulação: experimentos e grupos experimentais

No início do protocolo hormonal de sincronização do estro e da ovulação, a sincronização da onda folicular ovariana foi realizada nas nulíparas (Experimento 1) e múltíparas (Experimento 2) por dois procedimentos distintos, sendo um hormonal (Grupo Controle ou BE) e outro físico (Grupo Experimental ou OPU). Os manejos e procedimentos realizados nos grupos BE e OPU dos Experimentos 1 e 2 são apresentados na Figura 3.

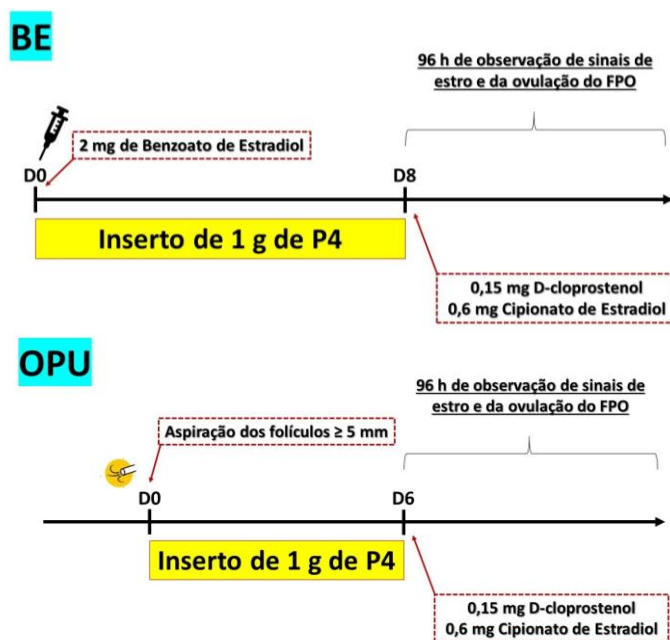


Figura 3. Metodologias hormonal (Grupo BE) e física (Grupo OPU) utilizadas para a sincronização de uma nova onda folicular nos grupos controle (BE) e tratamento (OPU) em fêmeas bovinas nulíparas (Experimento 1) e múltíparas (Experimento 2) da raça Brangus (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*). No D0, aplicaram-se 2 mg de BE no Grupo BE, enquanto realizou-se a ablação por aspiração folicular guiada por ultrassonografia transvaginal de todas as estruturas >5 mm no Grupo OPU, com a inserção de um inserto intravaginal bovino de 1 g de progesterona em ambos os grupos. Do D0 ao D8 no Grupo BE, e do D0 ao D6 no Grupo OPU, realizou-se a avaliação da função ovariana por ultrassonografia transretal a cada 24 h. No D8 no Grupo BE e no D6 no Grupo OPU, removeu-se o inserto de P4, administrando-se também um hormônio luteolítico (0,15 mg D-cloprostenol) e um hormônio indutor de ovulação (0,6 mg de Cipionato de Estradiol). Após o D8 (Grupo BE) ou D6 (Grupo OPU), realizou-se a observação de sinais de estro a cada 4-8 h, e a avaliação da função ovariana e da ovulação por ultrassonografia a cada 12 h por 96 h (4 dias), pelo desaparecimento do folículo pré-ovulatório (FPO).

4.3.1 Método hormonal (Grupo BE)

Foi aplicada uma dose por via im de 2 mg de benzoato de estradiol (BE; Gonadiol[®], Zoetis, São Paulo, SP, Brasil), um ester de estradiol comumente utilizado em protocolos comerciais de IATF para induzir a regressão dos folículos existentes nos ovários e/ou a ovulação/luteinização de folículos dominantes. Em seguida, foi inserido asepticamente um inserto intravaginal de 1 g de progesterona (P4; Sincrogest[®], Ourofino, Cravinhos, SP, Brasil). O dia da administração de BE e da inserção do dispositivo de P4 no grupo Controle (BE) foi considerado o Dia 0 (D0).

4.3.2 Método físico (Grupo OPU)

A indução da nova onda folicular foi realizada pela ablação folicular utilizando a técnica da OPU para a aspiração de folículos ≥ 5 mm por ultrassonografia transvaginal com transdutor convexo de 7,5 MHz (Mindray, DP 2200 Vet, Schenzen, China) em uma guia transvaginal (WTA, Cravinhos, SP, Brasil) e sistema de aspiração com agulha 18 G descartável (WTA, Cravinhos, SP, Brasil) conectado a um tubo de centrífuga de 50 mL estéril, acoplado a uma bomba de vácuo de fluxo contínuo (BV-003D, WTA, Cravinhos, SP, Brasil). Previamente ao procedimento, e com o animal em tronco de contenção, realizava-se o esvaziamento da ampola retal do animal, seguido da lavagem do períneo e genitália externa com água e sabão neutro. Realizava-se a tricotomia da região do espaço epidural sacrococcígeo (S5-Co1) e a antisepsia da região para a inserção de agulha hipodérmica 18 G no canal epidural, para posterior aplicação de 4 mL de cloridrato de lidocaína a 2% sem vasoconstritor, em epidural baixa (ISMAIL, 2016). Fixou-se a cauda lateralmente ao animal para manter a higiene do períneo e facilitar a realização do procedimento. A guia era posicionada no fundo de saco vaginal, e, por via transretal, os ovários eram posicionados individualmente contra o transdutor convexo, permitindo a visualização dos folículos a serem aspirados. Após inserir a agulha em cada folículo ≥ 5 mm, acionava-se a bomba de

vácuo ajustado para um fluxo de aspiração de 12 a 15 mL/min (ALLER *et al.*, 2010). O material descartável era substituído a cada fêmea manipulada. Após a OPU, um dispositivo intravaginal de 1 g de P4 (Sincrogest[®], Ourofino, Cravinhos, SP, Brasil) foi inserido em cada fêmea, com o dia da ablação folicular do grupo experimental (OPU) sendo considerado o Dia 0 (D0).

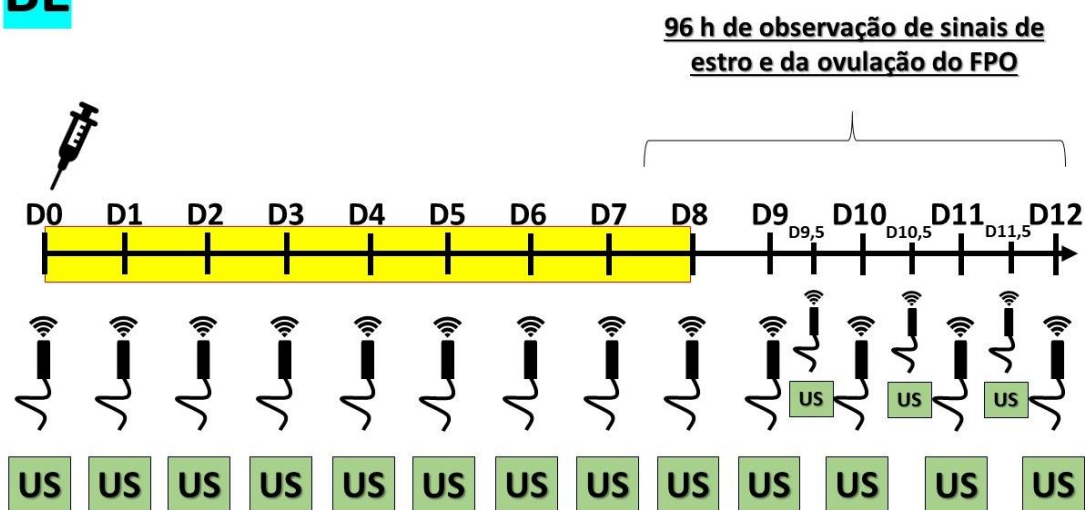
Nos Dias 8 (D8) e 6 (D6) após o início do protocolo (D0) nos grupos BE e OPU, respectivamente, removeu-se o inserto intravaginal de P4 e administrou-se uma dose via im de um agente luteolítico análogo sintético da PGF_{2α} (0,15 mg de D-cloprostenol; Prolise, ARSA S.R.L., Buenos Aires, Argentina) e uma dose via im de um hormônio indutor de ovulação (0,6 mg de cipionato de estradiol; E.C.P.[®], Zoetis, São Paulo, SP, Brasil). A diferença de dois dias na remoção da fonte externa de P4 entre os grupos BE e OPU é justificada, devido a diferença entre o intervalo da aplicação dos métodos e a emergência de uma nova onda (BERGFELT *et al.*, 1994; BÓ *et al.*, 1995b ; MAPLETOFT *et al.*, 2018), para que fosse proporcionado um período de 4 dias de crescimento desta nova onda, sob a ação da P4 oriunda do inserto.

4.4 Mapeamento ovariano e acompanhamento da dinâmica folicular por meio de ultrassonografia em tempo real

O mapeamento das estruturas dos ovários foi realizado a cada 24 h em todas as fêmeas até o D6 ou D8 nos Grupos OPU e BE, respectivamente (Figura 4), por meio de avaliação ultrassonográfica em tempo real (Mindray, DP 2200 Vet, Schenzen, China) utilizando-se um transdutor transretal linear com frequência de 7,5 MHz em escaneamento no Modo B. Na primeira avaliação do grupo experimental (OPU), devido ao procedimento de aspiração, foi utilizado o transdutor convexo de 7,5 MHz acoplado à guia transvaginal de aspiração para o mapeamento. A frequência de avaliações aumentou para 12 h de intervalo, a partir dos Dias 7 e 9 nos Grupos OPU e BE, respectivamente (Figura 4), com o objetivo

de melhor acompanhar o crescimento do FD e identificar o momento mais próximo da ovulação do folículo pré-ovulatório (FPO), em intervalos de 12 h, considerando-se a última identificação do FPO como o início do intervalo da ovulação, até a constatação da ausência do FPO no ovário na avaliação subsequente, com posterior confirmação de um CL maduro compatível com o início do diestro sete dias após.

BE



OPU

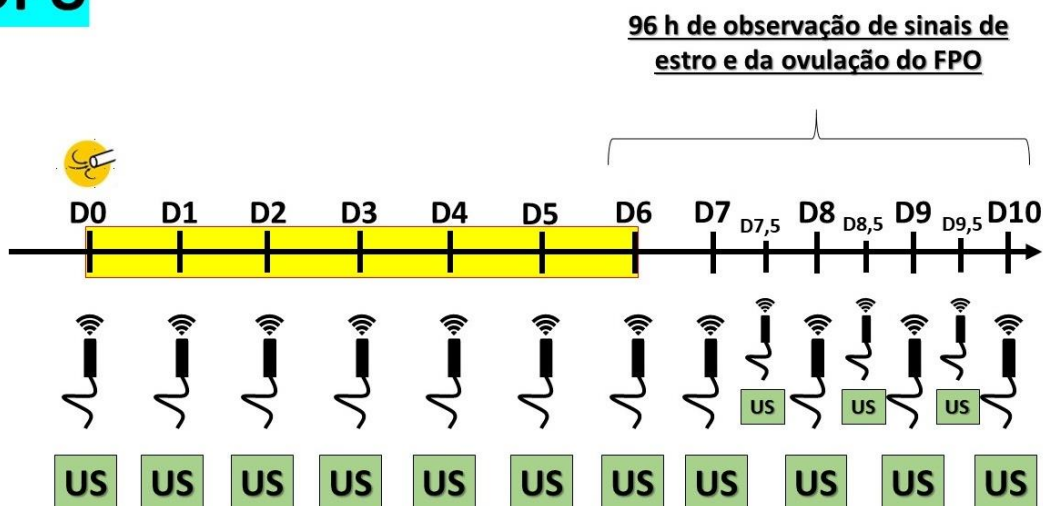


Figura 4. Monitoramento ultrassonográfico diário para o mapeamento e identificação de todas as estruturas ≥ 5 mm dos ovários nos grupos controle (BE) e tratamento (OPU) em fêmeas bovinas nulpáparas (Experimento 1) e múltíparas (Experimento 2) da raça Brangus (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*). A partir do sétimo dia de avaliação, o intervalo entre avaliações diminuiu para 12 h, com o intuito de identificar o momento da ovulação do FPO. FPO: folículo pré-ovulatório; US: avaliação ultrassonográfica transretal dos ovários.

As avaliações ultrassonográficas ocorreram por 10 e 12 dias consecutivos nos grupos OPU e BE, respectivamente, em ambos os experimentos. Como observação auxiliar e como constatação fisiológica, registravam-se a data e o horário do início dos sinais de estro, quando identificado. Realizava-se uma transposição das imagens das estruturas ≥ 5 mm para fichas individuais de cada fêmea, as quais foram topograficamente desenhadas nos locais homônimos em cada ovário. As estruturas < 5 mm de diâmetro foram contabilizadas quantitativamente em cada dia de avaliação. 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).

4.5 Organização, análise e interpretação dos dados

Os dados gerados a partir das observações ultrassonográficas diárias dos ovários permitiram a avaliação do sucesso da indução de nova onda folicular em cada fêmea, considerando o estado inicial da dinâmica folicular ao início do tratamento. Considerou-se a dinâmica da nova onda folicular ovariana, apontando, aproximadamente, todos os momentos (horas) dos seguintes eventos foliculares fisiológicos a partir do início dos protocolos hormonal ou físico: (i) recrutamento/emergência, (ii) seleção, (iii) início do desvio folicular (quando o futuro FD atingisse o tamanho de 8,5 mm), (iv) desvio aparente (primeira avaliação que constatou-se a diminuição do diâmetro do FS, havendo uma divergência entre os diâmetros foliculares), (v) dominância, e (vi) ovulação do FPO, (vii) além das observações das atresias foliculares. Devido ao rastreamento individual da maioria dos folículos de cada onda folicular, foi possível identificar os tamanhos diários (diâmetro folicular, em mm), e associar estes tamanhos aos eventos observados, além da categorização de todos os folículos identificados em cada avaliação em uma escala fisiológica, com a segregação de grupos de folículos em intervalos de $< 5,0$ mm, 5,0 a 8,5 mm, 8,5 a 10,0 mm

e >10,0 mm, baseado em características neuroendócrinas e morfofisiológicas foliculares descritas por Lucy *et al.* (1992), Gibbons *et al.* (1997) e Ginther (2016), e levando-se em conta os tamanhos de 8,5 mm como característicos do início do desvio folicular à dominância (GINTHER *et al.*, 1996; GINTHER, 2016), e de >10,0 mm como FD já potencialmente responsivos ao LH (GIMENES *et al.*, 2008; HUNTER *et al.*, 2004; SARTORI *et al.*, 2001).

Com os tamanhos diários, do início ao final da onda, pôde-se estimar uma taxa de crescimento diário para os FD identificados. Estes dados de tempo e tamanho possibilitaram a análise e a descrição da emergência e da dinâmica de crescimento da nova onda folicular, com vista a definir a janela biológica de maior probabilidade de recrutamento da nova onda a partir do protocolo hormonal ou físico. Observações adicionais foram realizadas, como a identificação do início dos sinais de estro, e posterior comparação com os intervalos de tempo entre os eventos fisiológicos do estro e da ovulação. O acompanhamento diário possibilitou a constatação da ocorrência de atresia do FD, que acarretou na falha de ovulação, ou um processo de retomada no crescimento diário do FD após a remoção do inserto de P4, que caracterizou um fenômeno que definimos como *estática folicular*. Este fenômeno foi caracterizado por um FD com crescimento contínuo, que entrou em estagnação no período que antecedeu a remoção da P4, para retomar o crescimento após a remoção da P4. Em adição, observaram-se os tempos da ovulação do FPO, que neste estudo foi considerada a não mais visualização do FPO em dois exames consecutivos a intervalo de 12 h, caracterizando a última avaliação com sua identificação como o início do intervalo da ovulação, com a confirmação de um CL sete dias após a data registrada como indução que resultou em ovulação.

As observações da função ovariana foram divididas em três intervalos de tempo, sob a percepção fisiológica da resposta aos protocolos de indução de nova onda folicular, com as observações dos intervalos de eventos sendo: (1) da indução da onda ao recrutamento

folicular; (2) do recrutamento folicular à remoção da P4; e (3) da remoção da P4 à ovulação (P4-O). Neste último intervalo, também foram definidos os intervalos entre a remoção da P4 e o início do estro (P4-E), e entre o início do estro e a ovulação (E-O). Os resultados de ambos os experimentos são apresentados em conjunto, porém devido à diferença cronológica de realização dos experimentos, não houve comparação estatística entre dados do Experimento 1, identificado por fêmeas nulíparas, e do Experimento 2, como fêmeas multíparas.

4.6 Análise estatística

Para a análise estatística, foram considerados apenas os dados quantitativos dos animais que ovularam o FPO da nova onda folicular induzida nos grupos BE e OPU nos Experimentos 1 e 2, sendo que falhas na indução da nova onda, atresia da nova onda folicular e a não ovulação do FD/FPO foram descritos como dados qualitativos. Devido à diferença de dias entre os eventos avaliados, para a comparação na análise estatística, os dados foram pareados no dia da remoção do inserto de P4 (remoção da P4 = Dia 0), uma vez que este momento foi um evento fixo em todas as fêmeas, de ambos os grupos e experimentos. Para as análises da distribuição dos tamanhos de folículos nos diferentes dias avaliados, que caracteriza a dinâmica folicular da onda, o pareamento foi realizado no dia do recrutamento/emergência da nova onda (emergência = Dia 0).

Os dados qualitativos obtidos relativos ao sucesso na indução da nova onda folicular, distribuições e variação do ECC, proporção de ciclicidade, luteólise, proporção de sinais de estro e ovulação, proporção das faixas de tamanho dos folículos no mesmo dia entre os grupos e proporção das diferentes faixas de folículos no mesmo dia foram analisados pelo teste do qui-quadrado (χ^2) ou pelo Teste Exato de Fisher, para $P < 0,05$. Os dados quantitativos relativos ao tempo dos eventos observados, ao diâmetro folicular, à taxa de crescimento folicular diário e à média do número de folículos de cada faixa de tamanho nos

diferentes dias foram avaliados pelo teste de normalidade de Anderson Darling, para serem então avaliados por análise de variância (ANOVA) e por fatorial pelo *General Linear Model* do Minitab (Minitab, EUA), considerando como fatores com efeitos fixos o dia da avaliação e os grupos experimentais (BE, OPU), com comparações pareadas pelo Teste de Tukey, para $P < 0,05$. Também foram incluídos nas análises os fatores relativos à presença de CL na remoção da P4 (sim, não), ao padrão de crescimento do FD (crescimento/estática folicular) e à manifestação de estro (sim, não), sendo considerados na análise principal, se significativos. Os dados também foram comparados pelo teste de correlação simples de Pearson, para $P < 0,05$. Por haver uma heterogeneidade quanto ao *status* da dinâmica folicular no início do experimento, este fator não foi incluído na análise quantitativa.

5. RESULTADOS

5.1 Observações gerais da função ovariana nas fêmeas

Cada experimento compreendeu exames ultrassonográficos diários, sendo 10 dias e 14 exames ultrassonográficos para o Grupo OPU e 12 dias e 16 exames para o Grupo BE. Um total de 21.992 folículos antrais foi visualizado cumulativamente nos dias de avaliação nas 34 fêmeas nulíparas (Experimento 1), em uma média de $43,1 \pm 3,6$ folículos/fêmea/avaliação, e 11.762 folículos antrais nas 22 fêmeas múltíparas (Experimento 2), em uma média de $35,6 \pm 2,8$ folículos/fêmea/avaliação. Do total de folículos, 94,6% (20.728/21.992) e 92,4% (10.867/11.762) foram folículos <5 mm de diâmetro nas nulíparas e nas múltíparas, respectivamente. No Experimento 1, foi registrado um total de 12.982 folículos antrais no grupo BE (n=17), em uma média de $47,7 \pm 3,3$ folículos/fêmea/avaliação e proporção de 94,8% (12.304/12.982) folículos <5 mm. No grupo OPU (n=17) foram observados 9.010 folículos antrais, em uma média de $37,9 \pm 3,5$ folículos/fêmea/avaliação e proporção de 93,5% (8.424/9.010) folículos <5 mm, sendo significativamente diferente entre grupos em números e proporção ($P < 0,05$). Já no Experimento 2, o número total de folículos antrais foi de 6.606 no grupo BE (n=11), em uma média de $37,5 \pm 3,5$ folículos/fêmea/avaliação e proporção de 93,9% (6.205/6.606) folículos <5 mm, e de 5.156 no grupo OPU (n=11), em uma média de $33,5 \pm 4,5$ folículos/fêmea/avaliação e proporção de 90,5% (4.662/5.156) folículos <5 mm, sendo semelhantes entre grupos quanto aos números médios, mas diferentes quanto à proporção de folículos <5 mm ($P < 0,05$).

No Experimento 1 (Nulíparas) foram visualizados 80 folículos ≥ 5 mm que foram induzidos à regressão por via hormonal (Grupo BE), de 17 fêmeas, em uma média de $4,7 \pm 0,1$ folículos/fêmea, variando de um a 10 folículos/nulípara. No grupo da OPU, foram aspirados 56 folículos ≥ 5 mm nas 17 fêmeas, em uma média de $3,3 \pm 0,1$ folículos/fêmea, variando de um a sete folículos/nulípara. Houve diferença estatística em relação ao sucesso

da indução de uma nova onda folicular, que foi de 71% (12/17) e 100% (17/17) para os grupos BE e OPU, respectivamente. No Experimento 2 (Multíparas) foram visualizados 46 folículos ≥ 5 mm induzidos à regressão hormonal (Grupo BE) em 11 fêmeas, em uma média de $5,8 \pm 1,4$ folículos/fêmea, variando de um a 12 folículos/fêmea. No grupo OPU (n = 11), foram aspirados 38 folículos ≥ 5 mm, em uma média de $4,8 \pm 1,3$ folículos/fêmea, variando de 0 a 11 folículos/fêmea. Todas as fêmeas multíparas (Experimento 2) em ambos os grupos iniciaram uma nova onda folicular após a indução no D0.

Não houve diferenças entre grupos experimentais quanto à taxa de manifestação de estro e de ovulação, e na distribuição do momento da ovulação após a remoção da P4 e indução da ovulação, tanto nas fêmeas nulíparas (Experimento 1), quanto nas multíparas (Experimento 2), conforme apresentado na Tabela 1. Em ambos os experimentos, as primeiras ovulações ocorreram no intervalo entre 48 e 60 h após a indução da ovulação. A maioria das nulíparas do grupo BE ovularam no período de até 72 h da indução da ovulação (9/10, 90%), enquanto cerca de dois terços ovularam no grupo OPU das nulíparas (7/11, 63,5%) e no grupo BE nas fêmeas multíparas (6/9, 66,7%), com menos da metade ovulando neste período no grupo OPU das fêmeas multíparas (4/9, 44,5%). Uma fêmea multípara do grupo BE apresentou codominância espontânea e dupla ovulação.

Tabela 1. Proporção de fêmeas nulíparas (novilhas, Experimento 1) e multíparas (vacas, Experimento 2) bovinas da raça Brangus (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*) com manifestação de estro e com ovulação por grupo experimental (BE, OPU) e por experimento, com intervalos de ovulação desde a remoção da progesterona e a indução da ovulação

Categoria animal (Experimento)	Grupo experimental	n	Estro*		Intervalo da remoção da P4 à ovulação*							
					Total		48-60 h		60-72 h		72-84 h	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Nulíparas (1)	BE	17	13	76,5	10	58,8	4	40,0	5	50,0	1	10,0
	OPU	17	11	64,7	11	64,7	5	45,5	2	18,2	4	36,4
Multíparas (2)	BE	11	8	72,7	9	81,8	0	0,0	6	66,7	3	33,3
	OPU	11	7	63,6	9	81,8	1	11,1	3	33,3	5	55,5

*Sem diferenças estatísticas entre grupos, em cada experimento ($P > 0,05$).

5.2 Observações das fêmeas responsivas à indução da ovulação

As respostas médias de desenvolvimento folicular em função do tempo (h) e do tamanho folicular (mm) nos diferentes eventos fisiológicos da dinâmica folicular nas nulíparas (Experimento 1) e múltíparas (Experimento 2), para as fêmeas que ovularam a nova onda induzida hormonalmente no grupo BE ou fisicamente no grupo OPU (Tabela 1), são apresentadas na Tabela 2 e nas Figuras 3 e 4.

Houve uma distribuição heterogênea das fêmeas nas diversas fases da dinâmica folicular por grupo, por experimento. Desta forma, não foi possível determinar o efeito da fase da dinâmica folicular no início dos experimentos sobre os resultados de indução da onda folicular, de crescimento e desenvolvimento folicular e de ovulação nas fêmeas de ambas as categorias animais, em cada grupo experimental.

5.2.1 Período do início do protocolo ao recrutamento/emergência da nova onda folicular

No grupo BE do Experimento 1 (fêmeas nulíparas), verificou-se que 30% (3/10) das fêmeas estavam em fase de seleção, com 70% (7/10) apresentando um folículo em dominância após a primeira avaliação ultrassonográfica (D0) e previamente à administração de BE. As avaliações subsequentes até o recrutamento demonstraram a ocorrência de uma regressão folicular e emergência de uma nova onda, entre 3 e 5 dias (Figura 5), em 90% (9/10) das fêmeas induzidas. Em uma fêmea (10%) houve a regressão do FD da onda anterior próximo ao 6º dia após a aplicação do BE, e a emergência da nova onda ocorrendo entre o 7º e 8º dia, próximo a remoção da P4. Uma fêmea apresentou um cisto folicular, que variou de 22,6 a 37,5 mm de diâmetro, que se tornou presente desde as primeiras avaliações ultrassonográficas até a conferência da presença do CL funcional sete dias após a ovulação, o que confirmou a não interferência no desenvolvimento da nova onda, uma vez que o FD/FPO ovulou ao final das avaliações.

Tabela 2. Desenvolvimento folicular em fêmeas nulíparas (Experimento 1) e múltíparas (Experimento 2) bovinas da raça Brangus (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*) com nova onda folicular induzida hormonalmente (Grupo BE) ou fisicamente (Grupo OPU), em função do tempo (h) e do tamanho folicular (mm) nos diferentes eventos fisiológicos da dinâmica folicular (somente fêmeas que ovularam a partir da nova onda induzida)

Evento fisiológico (Evento)	Nulíparas (Experimento 1)				Múltíparas (Experimento 2)			
	†Tempo (h)		Tamanho (mm)		†Tempo (h)		Tamanho (mm)	
	BE	OPU	BE	OPU	BE	OPU	BE	OPU
Indução Regressão	-189,8 ± 0,4 ^a	-144,8 ± 0,3 ^b	-	-	-192,2 ± 0,4 ^a	-145,9 ± 0,3 ^b	-	-
Recrutamento (a)	-99,6 ± 9,3 ^a	-96,2 ± 6,4 ^a	5,0	5,0	-98,1 ± 7,8 ^a	-108,7 ± 5,8 ^a	5,0	5,0
Início do desvio (b)	-39,8 ± 13,5 ^a	-45,2 ± 9,4 ^a	8,5	8,5	-23,6 ± 9,3 ^a	-35,8 ± 6,9 ^a	8,5	8,5
Remoção P4 (c)	0 ^a	0 ^a	11,0 ± 1,0 ^a	11,9 ± 0,7 ^a	0 ^a	0 ^a	9,3 ± 0,7 ^a	11,3 ± 0,5 ^b
Desvio aparente (d)	5,9 ± 12,8 ^a	18,9 ± 8,9 ^a	10,9 ± 0,7 ^a	13,2 ± 0,5 ^b	23,6 ± 6,6 ^a	15,0 ± 4,9 ^a	11,1 ± 0,7 ^a	11,8 ± 0,5 ^a
Dominância (e)	23,0 ± 9,0 ^{a*}	38,7 ± 6,3 ^{a*}	12,4 ± 1,0 ^a	14,1 ± 0,7 ^a	39,0 ± 7,1 ^a	39,3 ± 5,3 ^a	11,3 ± 0,8 ^a	12,4 ± 0,6 ^a
Estro (f)	35,9 ± 3,2 ^{a*}	44,4 ± 3,6 ^{a*}	13,0 ± 0,7 ^a	14,8 ± 1,6 ^a	42,0 ± 4,1 ^a	44,7 ± 4,7 ^a	12,1 ± 0,5 ^a	13,2 ± 0,5 ^a
Ovulação (g)	67,3 ± 3,8 ^a	69,2 ± 2,8 ^a	12,3 ± 1,0 ^{a*}	14,2 ± 0,7 ^{a*}	74,6 ± 2,4 ^a	75,0 ± 1,8 ^a	13,7 ± 1,0 ^a	13,9 ± 0,7 ^a

^{a,b}: Números seguidos de letras desiguais na linha, para cada mensuração (tempo ou tamanho), entre grupos do mesmo experimento, diferem estatisticamente, para P<0,05.

*Indica tendência para diferença estatística (P<0,1) para valores entre grupos no mesmo experimento.

†Tempo relativo ao momento da remoção do inserto intravaginal de progesterona (evento c), considerado t = 0 h, com os tempos dos eventos fisiológicos anteriores apresentando valores retrospectivamente negativos, e os posteriores, cronologicamente positivos

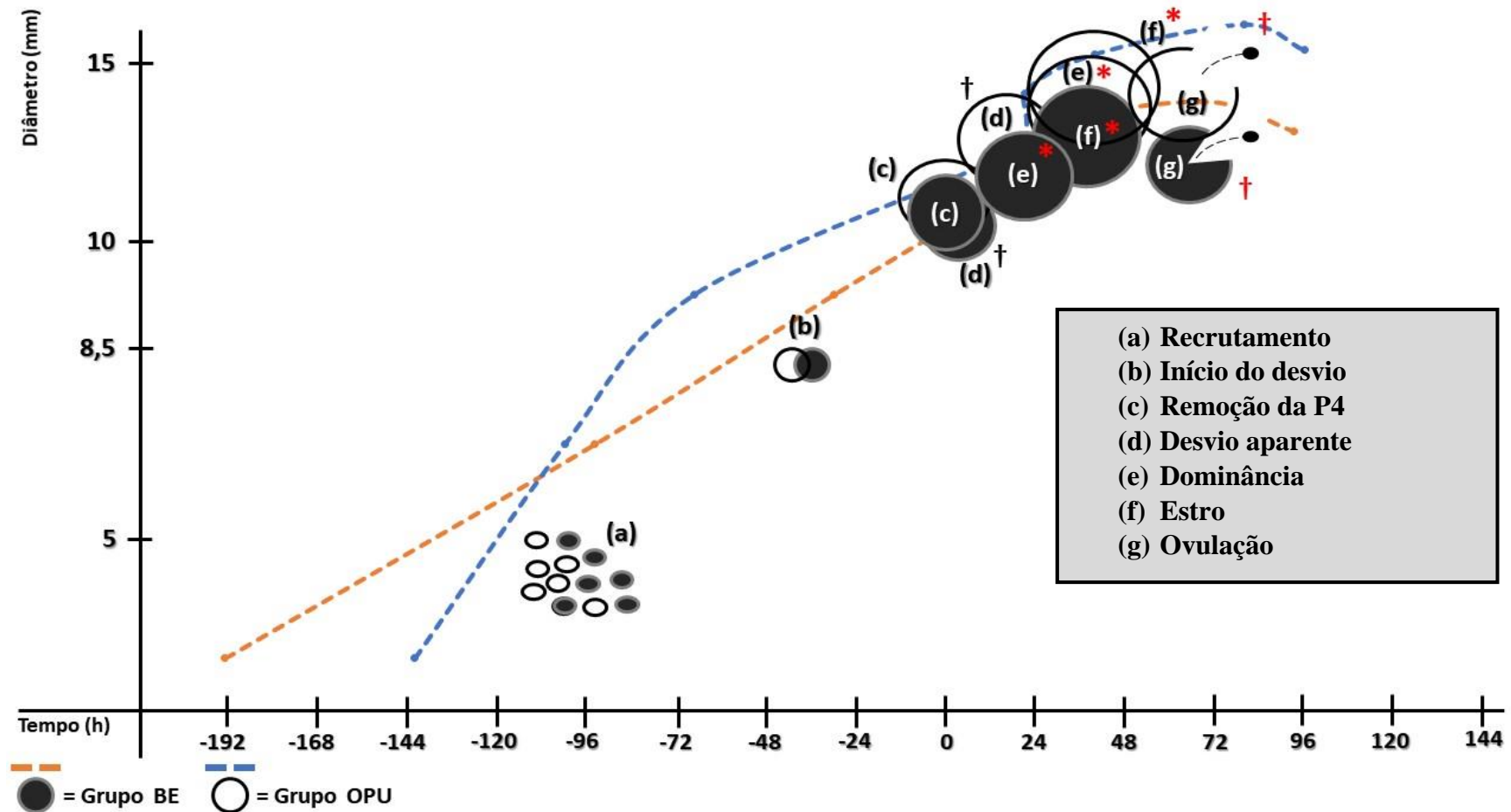


Figura 5. Tempos (h) e tamanho (mm) do folículo dominante (FD) nos diferentes eventos fisiológicos da dinâmica folicular após a indução da nova onda folicular por via hormonal (Grupo BE) e física (Grupo OPU) em fêmeas nulíparas (Experimento 1) bovinas da raça Brangus (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*), somente para fêmeas que ovularam a partir da nova onda induzida. (a) Recrutamento; (b) Início do desvio; (c) Remoção da P4; (d) Desvio aparente; (e) Dominância; (f) Estro; e (g) Ovulação. *Indica diferença significativa entre os grupos para os valores de tempo (h) entre os eventos observados ($P < 0,05$). *Indica tendência de diferença estatística entre os grupos para os valores de tempo (h) entre os eventos observados ($P < 0,1$). †Indica diferença estatística entre os grupos para os valores de tamanho (mm) do FD nos eventos observados ($P < 0,05$). †Indica diferença estatística entre os grupos para os valores de tamanho (mm) do FD nos eventos observados ($P < 0,1$).

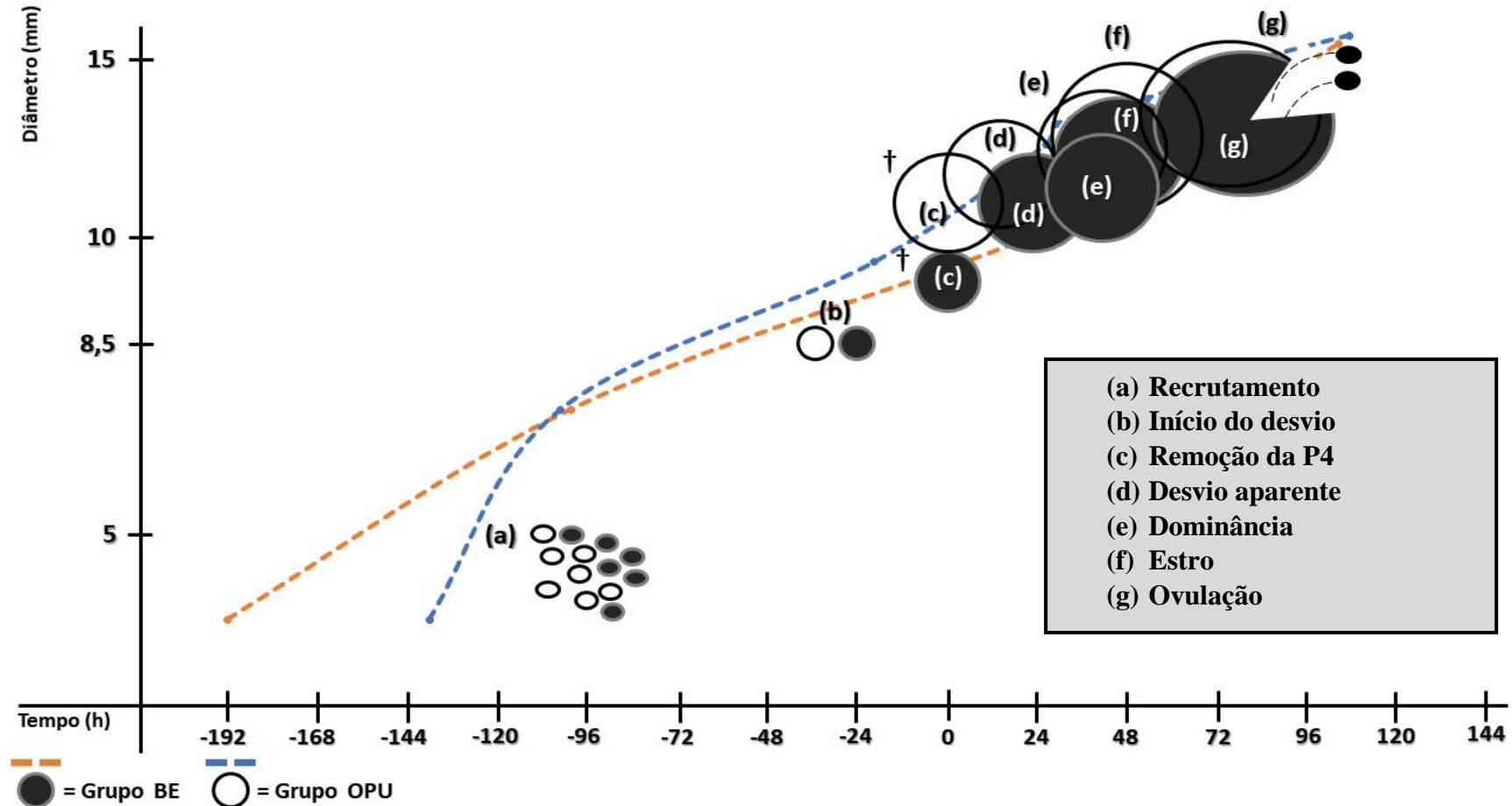


Figura 6. Tempos (h) e tamanho (mm) do folículo dominante (FD) nos diferentes eventos fisiológicos da dinâmica folicular após a indução da nova onda folicular por via hormonal (Grupo BE) e física (Grupo OPU) em fêmeas múltiparas (Experimento 2) bovinas da raça Brangus (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*), somente para fêmeas que ovularam a partir da nova onda induzida. (a) Recrutamento; (b) Início do desvio; (c) Remoção da P4; (d) Desvio aparente; (e) Dominância; (f) Estro; e (g) Ovulação. *Indica diferença significativa entre os grupos para os valores de tempo (h) entre os eventos observados ($P < 0,05$). *Indica tendência de diferença estatística entre os grupos para os valores de tempo (h) entre os eventos observados ($P < 0,1$). †Indica diferença estatística entre os grupos para os valores de tamanho (mm) do FD nos eventos observados ($P < 0,05$). †Indica diferença estatística entre os grupos para os valores de tamanho (mm) do FD nos eventos observados ($P < 0,1$).

No grupo OPU do Experimento 1 (fêmeas nulíparas), todas as fêmeas (11/11) se apresentavam em fase de dominância no início do experimento. Curiosamente, o procedimento de indução física pela OPU ocasionou a presença de estruturas semelhantes a corpos hemorrágicos nos ovários de todas as fêmeas mediante as observações ultrassonográficas diárias subsequentes, o que pareceu não interferir na emergência da nova onda nos animais. O desaparecimento destas estruturas antecedeu e ocorreu muito próximo ao recrutamento da nova onda. Este período foi marcado pela observação da presença destas estruturas hemorrágicas e a da emergência da nova onda com uma característica de flutuação da população dos folículos <5 mm similar à observada no grupo BE (Tabela 3). No Grupo BE do Experimento 2 (Fêmeas Multíparas), a dinâmica folicular inicial na primeira avaliação ultrassonográfica mostrou que 22% (2/9) das fêmeas estavam em fase de seleção e 78% (7/9) em dominância folicular. Após a indução da regressão hormonal com BE, observou-se a permanência de um ou mais folículos oriundos da onda em atresia durante as avaliações subsequentes diárias. Em 33% (3/9) das fêmeas, o folículo em regressão permaneceu após a emergência da nova onda, porém não pareceu interferir no crescimento da nova onda. O período da indução hormonal com BE e o recrutamento foi marcado pela regressão dos folículos presentes no dia zero, principalmente nos dois primeiros dias após a aplicação do BE e a inserção da P4 exógena, e da flutuação quantitativa da população dos folículos <5 mm na proximidade da emergência da nova onda (Tabela 4). Já no grupo OPU do Experimento 2 (Fêmeas Multíparas), 22% (2/9) das fêmeas estavam em fase de recrutamento, 22% (2/9) em fase de seleção e 66% (5/9) em fase de dominância folicular no início do experimento. Semelhante ao observado no Experimento 1, mas em menor frequência, o procedimento de indução física da onda folicular pela OPU ocasionou na presença de estruturas semelhantes a corpos hemorrágicos em 55% (5/9) das fêmeas, sem uma aparente interferência na emergência da nova onda. O desaparecimento destas

estruturas também precedeu e ocorreu muito próximo ao recrutamento da nova onda. Em uma fêmea (11%), houve a permanência ou retorno de um FD aspirado (folículo residual), permanecendo em formato irregular até além do início do recrutamento, mas que aparentemente não interferiu no desenvolvimento da nova onda folicular. Outra particularidade foi a observação do recrutamento/emergência da nova onda em um período mais curto, de aproximadamente 24 h após a aspiração, em uma fêmea sem folículos ≥ 5 mm a serem aspirados, e em outra com apenas um folículo de 6,4 mm. Para todas as fêmeas deste grupo, este período foi marcado pela observação da presença de estruturas hemorrágicas nos ovários e pela emergência da nova onda, com a mesma característica de flutuação da população dos folículos < 5 mm observada no grupo BE (Tabela 4).

O período da indução hormonal no grupo BE até o recrutamento foi em média de $90,2 \pm 7,6$ h ($3,8 \pm 0,3$ dias) nas nulíparas (Figura 5), variando de 70,3 a 143,0 h (2,9 a 6,0 dias), e de $93,3 \pm 5,2$ h ($3,9 \pm 0,2$ dias) nas múltíparas (Figura 6), variando de 72,0 a 120,0 h (3,0 a 5,0 dias). Já o período entre a OPU e o recrutamento foi de $48,6 \pm 2,5$ h ($2,0 \pm 0,1$ dias) nas nulíparas (Figura 5), variando de 34,6 a 60,0 h (1,4 a 2,5 dias), e de $35,7 \pm 3,6$ h ($1,5 \pm 0,2$ dias) nas múltíparas (Figura 6), variando de 23,5 a 59,0 h. (1,0 a 2,5 dias).

Houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tempos de indução hormonal de regressão folicular/OPU e a remoção da P4 e indução de ovulação entre os grupos em ambos os experimentos (Tabela 2), ocorrendo uma diferença média de 45,0 h (1,9 dias) e de 46,3 h (1,9 dias) entre os grupos experimentais para a indução de início da nova onda folicular nos Experimentos 1 e 2, respectivamente (Figuras 5 e 6).

A quantificação da população folicular ovariana na fêmeas nulíparas (Experimento 1) e múltíparas (Experimento 2) pode ser visualizada nas Tabelas 3 e 4, onde se observa a distribuição das médias das contagens dos folículos nas quatro diferentes faixas de tamanho das estruturas ovarianas, na escala fisiológica. As contagens diárias dos folículos foram

pareadas entre os grupos no dia do recrutamento da nova onda, para que houvesse coincidência fisiológica entre os dias e assim fossem comparados estatisticamente os valores médios. As observações da regressão até a emergência da nova onda, para ambos os grupos, em ambos os experimentos, são representadas nos Dias de -2 a 0. Fica evidente a transição da redução gradual do número de folículos ≥ 5 mm até o recrutamento da nova onda (Dia 0), onde há aumento de forma gradual no número de folículos $< 5,0$ mm e de 5,0 a 8,5 mm da nova onda, em ambos os grupos, em ambos os experimentos.

A distribuição diária da população folicular total ativa durante a onda induzida após o início dos protocolos (folículos ≥ 5 mm), para cada grupo experimental e para cada categoria animal (Experimentos 1 e 2), durante as observações diárias, com a contagem e mensuração das estruturas foliculares, são apresentadas na Figura 7. Percebe-se uma aparente maior variação na distribuição da população de folículos recrutados no Grupo BE em comparação ao Grupo OPU, em ambas as categorias animais, em especial nas novilhas.

5.2.2 Período do recrutamento/emergência folicular à remoção do inserto intravaginal de progesterona e luteólise

Os tempos médios do recrutamento à remoção do inserto de P4/aplicação de agente luteolítico, e da divergência à remoção da P4 foram semelhantes entre os grupos experimentais, conforme a Tabela 2. Os tempos médios do recrutamento ao início do desvio do FD da nova onda foram de $58,8 \pm 6,6$ h ($2,5 \pm 0,3$ dias) nas nulíparas (Figura 5) e $71,1 \pm 8,6$ ($3,0 \pm 0,4$ dias) nas multíparas (Figura 6) nos Grupos BE, e de $50,2 \pm 4,7$ h ($2,0 \pm 0,2$ dias) nas nulíparas (Figura 5) e $66,2 \pm 8,8$ h ($2,8 \pm 0,4$ dias) nas multíparas (Figura 6) nos Grupos OPU, sendo semelhantes entre os grupos BE e OPU para cada categoria animal. Não houve diferença significativa entre grupos experimentais quanto ao tamanho dos folículos, em mm, em fêmeas nulíparas (Experimento 1) ou multíparas (Experimento 2) à remoção da P4 (Tabela 2). Porém, observou-se uma diferença significativa ($P < 0,05$) no tamanho do FD

no momento da remoção da P4 entre o grupo BE e o grupo OPU no Experimento 2 (Tabela 2), com os valores mínimo e máximo do tamanho do FD na remoção da P4 no Grupo BE sendo de 7,6 e 16,8 mm nas nulíparas e 7,2 a 11,2 mm nas múltíparas, e no Grupo OPU de 9,4 e 14,6 mm nas nulíparas e 8,5 a 15,6 mm nas múltíparas.

As taxas de crescimento do FD nas fêmeas nulíparas (Experimento 1), do recrutamento ao início do desvio, e do recrutamento à remoção da P4, foram maiores no grupo OPU ($1,4 \pm 0,1$ mm/dia e $1,4 \pm 0,1$ mm/dia, respectivamente) em comparação ao grupo BE ($0,9 \pm 0,2$ mm/dia e $1,1 \pm 0,1$ mm/dia, respectivamente; Figura 8; $P < 0,05$). Para as fêmeas múltíparas (Experimento 2), não foram observadas diferenças nas taxas de crescimento do FD do recrutamento ao início do desvio, sendo de $1,2 \pm 0,2$ mm/dia no grupo BE e de $1,3 \pm 0,1$ mm/dia no grupo OPU. Já do recrutamento à remoção da P4, as taxas de crescimento do FD nas vacas do Grupo OPU foram maiores ($1,3 \pm 0,1$ mm/dia) do que no Grupo BE ($1,0 \pm 0,1$ mm/dia; Figura 8; $P < 0,05$).

Houve um aumento da população de folículos entre 5,0 e 8,5 mm de diâmetro do Dia 0 ao Dia 3 no Grupo BE das nulíparas e múltíparas, e do Dia 0 ao Dia 2,5 e Dia 0 ao Dia 2 no Grupo OPU nas nulíparas e múltíparas, respectivamente (Tabelas 3 e 4, Figura 7). Após o 2º dia nas nulíparas, e após o 1º dia no grupo OPU e o 2º dia no grupo BE, ocorreu um pequeno aumento na população de folículos $\geq 8,5$ mm em ambos os grupos experimentais. A contagem e mensuração de folículos em regressão nas fêmeas no grupo BE nos primeiros dois dias após a administração de BE, independente do experimento, pode ter interferido na quantificação da população de folículos no período inicial da nova onda folicular.

Tabela 3. Número médio de folículos nas diferentes categorias por tamanho, na escala fisiológica, em relação ao dia da avaliação de fêmeas nulíparas bovinas (Experimento 1) da raça Brangus (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*), somente para as fêmeas que ovularam a nova onda induzida

Dia ^{&}	<5 mm		5-8,5 mm		8,5-10 mm		>10 mm	
	BE	OPU	BE	OPU	BE	OPU	BE	OPU
-2	53,0 ± 6,5 ^{aA}	24,7 ± 6,2 ^{aA}	0,6 ± 0,8 ^{cB}	1,5 ± 0,8 ^{abB}	0,0 ± 0,1 ^{aB}	0,6 ± 0,1 ^{aB}	0,0 ± 0,1 ^{cB*}	1,0 ± 0,1 ^{ab*}
-1	63,5 ± 6,5 ^{aA}	36,3 ± 6,2 ^{aA}	0,8 ± 0,8 ^{cB}	0,2 ± 0,8 ^{bbB}	0,0 ± 0,1 ^{aB}	0,0 ± 0,1 ^{aB}	0,0 ± 0,1 ^{cB}	0,0 ± 0,1 ^{cB}
0	57,4 ± 6,9 ^{aA}	33,0 ± 6,2 ^{aA}	4,1 ± 0,9 ^{abcB}	0,4 ± 0,8 ^{abB}	0,0 ± 0,1 ^{aC}	0,0 ± 0,1 ^{aB}	0,0 ± 0,1 ^{cC}	0,0 ± 0,1 ^{cB}
1	55,4 ± 6,5 ^{aA}	38,5 ± 6,2 ^{aA}	4,7 ± 0,8 ^{abB}	2,2 ± 0,8 ^{abB}	0,3 ± 0,1 ^{aC}	0,1 ± 0,1 ^{aC}	0,0 ± 0,1 ^{cC}	0,0 ± 0,1 ^{cC}
2	61,1 ± 6,5 ^{aA}	33,4 ± 6,2 ^{aA}	4,8 ± 0,8 ^{abB}	4,0 ± 0,8 ^{aB}	0,1 ± 0,1 ^{aC}	0,5 ± 0,1 ^{aC}	0,3 ± 0,1 ^{abcC}	0,1 ± 0,1 ^{bcC}
3	62,9 ± 6,5 ^{aA}	37,1 ± 6,2 ^{aA}	5,3 ± 0,8 ^{aB}	3,5 ± 0,8 ^{abB}	0,0 ± 0,1 ^{aC}	0,5 ± 0,1 ^{aC}	0,5 ± 0,1 ^{abcC}	0,6 ± 0,1 ^{abC}
4	62,8 ± 6,5 ^{aA}	37,6 ± 6,2 ^{aA}	4,3 ± 0,8 ^{abcB}	2,9 ± 0,8 ^{abB}	0,3 ± 0,1 ^{aC}	0,5 ± 0,1 ^{aC}	0,7 ± 0,1 ^{abC}	0,7 ± 0,1 ^{abC}
5	66,5 ± 6,5 ^{aA}	44,6 ± 6,2 ^{aA}	2,7 ± 0,8 ^{abcB}	1,1 ± 0,8 ^{abB}	0,1 ± 0,1 ^{aB}	0,3 ± 0,1 ^{aB}	0,8 ± 0,1 ^{aC}	1,0 ± 0,1 ^{aB}
6	58,3 ± 6,5 ^{aA}	47,2 ± 6,2 ^{aA}	1,1 ± 0,8 ^{bcB}	0,6 ± 0,8 ^{abB}	0,2 ± 0,1 ^{aB}	0,2 ± 0,1 ^{aB}	0,7 ± 0,1 ^{abC}	1,0 ± 0,1 ^{aB}
7	56,5 ± 8,4 ^{aA}	44,3 ± 8,4 ^{aA}	3,2 ± 1,0 ^{abcB}	0,7 ± 1,1 ^{abB}	0,3 ± 0,2 ^{aC}	0,0 ± 0,2 ^{aB}	0,2 ± 0,1 ^{bcC}	0,7 ± 0,1 ^{abB}

^{a,b,c}: Números seguidos de letras desiguais na mesma coluna diferem estatisticamente, para $P < 0,05$.

^{A,B,C}: Números seguidos de letras desiguais na mesma linha, dentro do mesmo grupo (BE ou OPU), diferem estatisticamente, para $P < 0,05$.

*Indica diferença estatística para a comparação do número médio de folículos entre os grupos (BE vs OPU), para os mesmos dias e categorias de tamanhos de folículos avaliadas, para $P < 0,5$.

[&]O pareamento das contagens entre animais e grupos foi baseada no início da emergência/recrutamento em cada fêmea. Excluíram-se os dias -3 e -4 relativos somente ao Grupo BE, que são os dois primeiros dias após a indução hormonal da nova onda com BE.

Tabela 4. Número médio de folículos nas diferentes categorias por tamanho, na escala fisiológica, em relação ao dia da avaliação de fêmeas multíparas bovinas (Experimento 2) da raça Brangus (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*), somente para as fêmeas que ovularam a nova onda induzida

Dias	<5 mm		5-8,5 mm		8,5-10 mm		>10 mm	
	BE	OPU	BE	OPU	BE	OPU	BE	OPU
-2	45,9 ± 7,1 ^{aA}	26,1 ± 7,1 ^{aA}	0,2 ± 0,8 ^{cB}	2,6 ± 0,8 ^{cB}	0,0 ± 0,2 ^{aB}	0,2 ± 0,2 ^{aC}	0,0 ± 0,1 ^{cB}	0,6 ± 0,1 ^{bC}
-1	51,1 ± 7,1 ^{aA}	37,8 ± 7,1 ^{aA}	1,0 ± 0,8 ^{cB}	0,8 ± 0,8 ^{cB}	0,0 ± 0,2 ^{aB}	0,0 ± 0,2 ^{aB}	0,0 ± 0,1 ^{cB}	0,0 ± 0,1 ^{bB}
0	46,4 ± 7,1 ^{aA}	38,0 ± 7,1 ^{aA}	1,3 ± 0,8 ^{cB}	2,8 ± 0,8 ^{cB}	0,0 ± 0,2 ^{aB}	0,0 ± 0,2 ^{aC}	0,0 ± 0,1 ^{cB}	0,0 ± 0,1 ^{bC}
1	50,1 ± 7,1 ^{aA}	37,2 ± 7,1 ^{aA}	3,6 ± 0,8 ^{abcB}	3,7 ± 0,8 ^{bcB}	0,0 ± 0,2 ^{aC}	0,3 ± 0,2 ^{aC}	0,0 ± 0,1 ^{cC}	0,0 ± 0,1 ^{bC}
2	47,0 ± 7,1 ^{aA}	38,6 ± 7,1 ^{aA}	5,0 ± 0,8 ^{abB}	8,1 ± 0,8 ^{aB}	0,4 ± 0,2 ^{aC}	0,7 ± 0,2 ^{aC}	0,0 ± 0,1 ^{cC}	0,3 ± 0,1 ^{abC}
3	41,4 ± 7,1 ^{aA}	44,6 ± 7,1 ^{aA}	5,3 ± 0,8 ^{aB}	7,2 ± 0,8 ^{abB}	0,3 ± 0,2 ^{aC}	0,6 ± 0,2 ^{aC}	0,1 ± 0,1 ^{cC}	0,7 ± 0,1 ^{abC}
4	33,9 ± 7,1 ^{aA}	44,7 ± 7,1 ^{aA}	2,7 ± 0,8 ^{abcB}	3,4 ± 0,8 ^{bcB}	0,7 ± 0,2 ^{abcB}	0,6 ± 0,2 ^{aC}	0,4 ± 0,1 ^{bcB}	0,8 ± 0,1 ^{abC}
5	38,1 ± 7,1 ^{aA}	47,9 ± 7,1 ^{aA}	1,6 ± 0,8 ^{bcB}	1,8 ± 0,8 ^{cB}	0,4 ± 0,2 ^{aB}	0,3 ± 0,2 ^{aB}	0,9 ± 0,1 ^{abB}	0,9 ± 0,1 ^{aB}
6	39,6 ± 7,1 ^{aA}	40,8 ± 7,1 ^{aA}	1,1 ± 0,8 ^{cB}	1,1 ± 0,8 ^{cB}	0,2 ± 0,2 ^{aB}	0,1 ± 0,2 ^{aB}	1,3 ± 0,1 ^{aB}	1,0 ± 0,1 ^{aB}
7	41,0 ± 7,1 ^{aA}	41,6 ± 7,6 ^{aA}	0,7 ± 0,8 ^{cB}	0,5 ± 0,8 ^{cB}	0,2 ± 0,2 ^{aB}	0,0 ± 0,2 ^{aB}	1,0 ± 0,1 ^{abB}	1,0 ± 0,2 ^{aB}

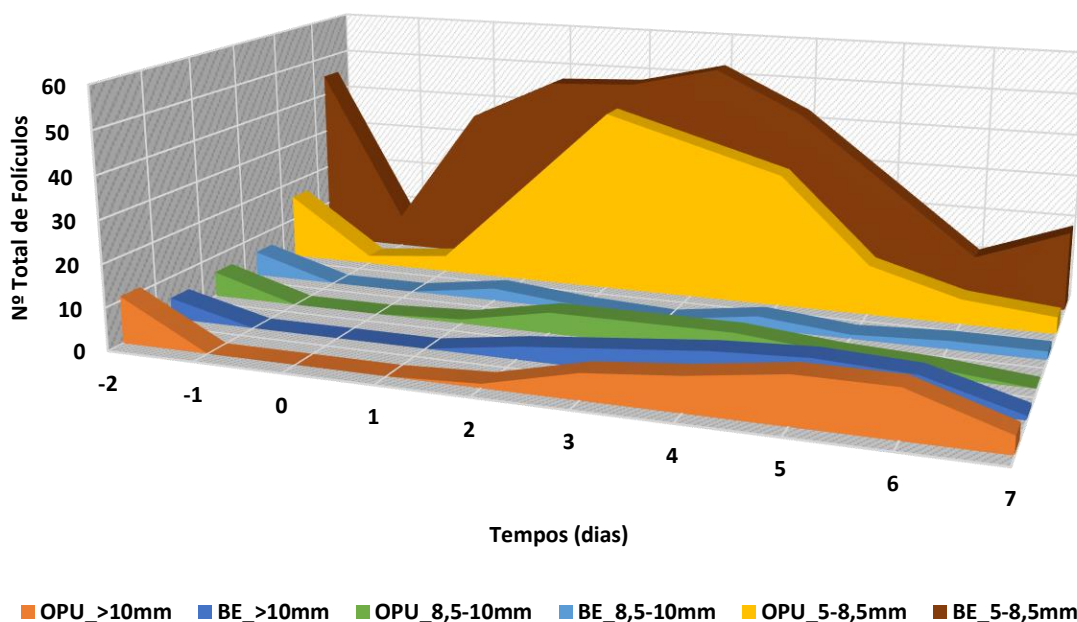
^{a,b,c}: Números seguidos de letras desiguais na mesma coluna diferem estatisticamente, para $P < 0,05$.

^{A,B,C}: Números seguidos de letras desiguais na mesma linha, dentro do mesmo grupo (BE ou OPU), diferem estatisticamente, para $P < 0,05$.

*Indica diferença estatística para a comparação do número médio de folículos entre os grupos (BE vs OPU), para os mesmos dias e categorias de tamanhos de folículos avaliadas, para $P < 0,5$.

&O pareamento das contagens entre animais e grupos foi baseada no início da emergência/recrutamento em cada fêmea. Excluíram-se os dias -3 e -4 relativos somente ao Grupo BE, que são os dois primeiros dias após a indução hormonal da nova onda com BE.

Nulíparas (Experimento 1) - Escala Fisiológica



Multíparas (Experimento 2) - Escala Fisiológica

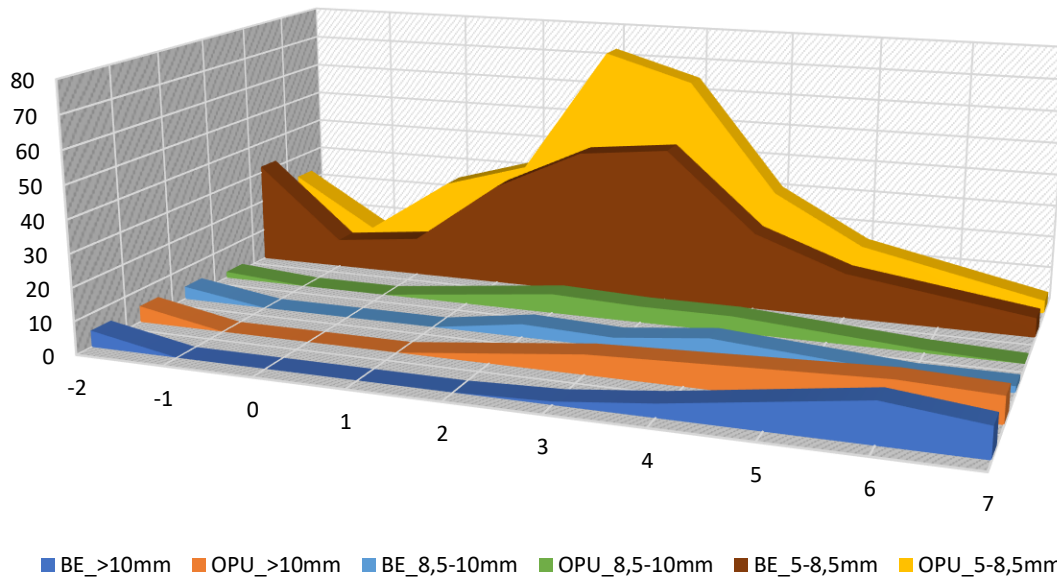


Figura 7. Distribuição das faixas de tamanhos dos folículos nos diferentes dias de avaliação ovariana, comparando a população folicular entre os grupos controle (BE) e tratamento (OPU) de fêmeas bovinas nulíparas (Experimento 1) e múltiparas (Experimento 2) da raça Brangus (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*), somente para as fêmeas que ovularam a nova onda induzida. Pareamento dos dias, para fins comparativos entre grupos, realizado no Dia 0, equivalente à emergência da nova onda folicular.

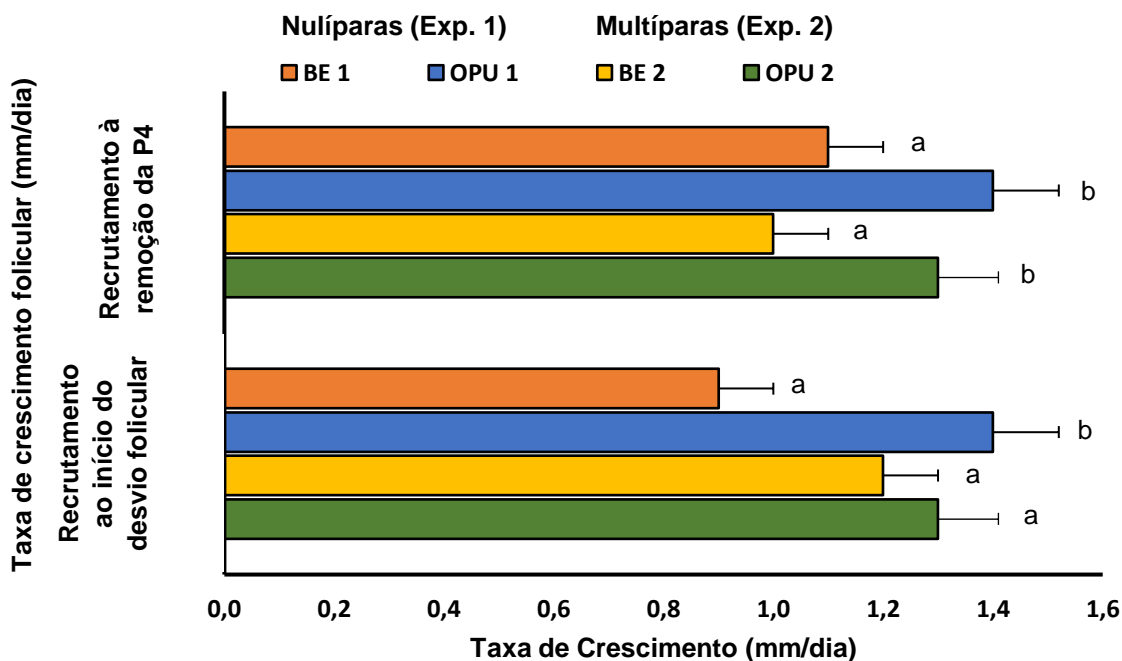


Figura 8. Taxa média de crescimento do folículo dominante (FD, mm/dia) do recrutamento ao início do desvio folicular ou à remoção da P4 entre os grupos controle (BE) e tratamento (OPU) de fêmeas bovinas nulíparas (Experimento 1) e multíparas (Experimento 2) da raça Brangus (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*), somente para as fêmeas que ovularam a nova onda induzida. ^{a,b} Barras seguidas de letras desiguais, entre grupos do mesmo experimento, diferem estatisticamente, para $P < 0,05$.

5.2.3 Período da remoção da fonte de progesterona exógena e endógena à ovulação

Os eventos observados após a remoção das fontes endógena e exógena de P4, juntamente com a aplicação do cipionato de estradiol, constituíram-se no desvio aparente, dominância folicular, estro e ovulação, conforme apresentados na Tabela 2. Nas fêmeas nulíparas (Experimento 1), os tempos médios da remoção da P4 ($t = 0$ h) ao desvio aparente foram semelhantes entre os grupos, variando de -47,0 a 36,7 h (-2,0 a 1,5 dias) para o grupo BE e de -23,8 a 38,6 h (-2,0 a 1,6 dias) para o Grupo OPU (Figura 5). Houve uma tendência de diferença ($P < 0,1$) dos tempos médios da remoção da P4 à dominância do FD e da remoção da P4 ao estro entre os grupos BE e OPU (Tabela 2 e Figura 5), variando de -24,2 a 36,7 h (-1,0 a 1,5 dias) e de 21,1 a 58,6 h (0,9 a 2,4 dias) para o grupo BE, respectivamente, e de 0,0 a 61,7 h (0 a 1,5 dias) e de 36,2 a 61,0 h (1,5 a 2,5 dias) para o grupo OPU,

respectivamente. Não houve diferença entre grupos experimentais quanto ao tempo da remoção da P4 à ovulação entre os grupos BE e OPU (Tabela 2), variando de 41,5 a 76,8 h (1,7 a 3,2 dias) para o grupo BE e de 55,9 a 79,9 h (2,3 a 3,3 dias) para o grupo OPU. Nas fêmeas multíparas (Experimento 2, Tabela 2 e Figura 6), os tempos médios entre os Grupos BE e OPU foram semelhantes (a) da remoção da P4 ao desvio aparente, variando de 0,0 a 36,0 h (0 a 1,5 dias) no grupo BE e de -26,6 a 36,7 h (-1,0 a 1,5 dias) no grupo OPU, (b) da remoção da P4 à dominância do FD, variando de 0,0 a 48,0 h (0 a 2,0 dias) no grupo BE e de 0,0 a 61,0 h (0 a 2,5 dias) no grupo OPU, (c) da remoção da P4 ao estro, variando de 36,0 a 60,0 h (1,5 a 2,5 dias) no grupo BE e de 36,0 a 60,7 h (1,5 a 2,5 dias) no grupo OPU, e (d) da remoção da P4 à ovulação, variando de 66,0 a 78,0 h (2,8 a 3,3 dias) no grupo BE e de 55,4 a 79,0 h (2,3 a 3,3 dias) no grupo OPU.

Os intervalos entre a remoção da P4 e o estro (P4-E), entre o estro e a ovulação (E-O), e entre a remoção da P4 e a ovulação (P4-O) foram semelhantes entre os grupos experimentais BE e OPU, para ambas as categorias animais (Experimentos 1 e 2), conforme a Figura 9. Nas fêmeas nulíparas (Experimento 1), os tempos P4-O foram de $58,8 \pm 3,4$ h ($2,5 \pm 0,1$ dias) e $65,0 \pm 3,9$ h ($2,7 \pm 0,2$ dias) para os grupos BE e OPU, respectivamente. Nas fêmeas multíparas (Experimento 2), os tempos P4-O foram de $70,6 \pm 2,4$ h ($2,9 \pm 0,1$ dias) e $68,8 \pm 2,8$ h ($2,9 \pm 0,1$ dias) para os Grupos BE e OPU, respectivamente (Figura 9).

Os tamanhos do FD no momento do desvio aparente ($P < 0,05$) e do FPO no momento da ovulação ($P < 0,1$) foram maiores nas fêmeas nulíparas (Experimento 1, Figura 5) no Grupo OPU ($13,2 \pm 0,5$ mm, variando de 9,8 a 17,0 mm, e $14,2 \pm 0,7$ mm, variando de 12,0 a 16,3 mm, respectivamente) do que no Grupo BE ($10,9 \pm 0,7$ mm, variando de 8,9 a 11,4 mm, e $12,3 \pm 1,0$ mm, variando de 8,3 a 15,6 mm, respectivamente), não havendo diferença do tamanho à dominância e no momento do estro, conforme a Tabela 2. Já nas fêmeas multíparas (Experimento 2, Figura 6), não houve diferença quanto ao tamanho do FD no

desvio aparente e na dominância, e do tamanho do FPO no momento do estro e prévio à ovulação, conforme a Tabela 2.

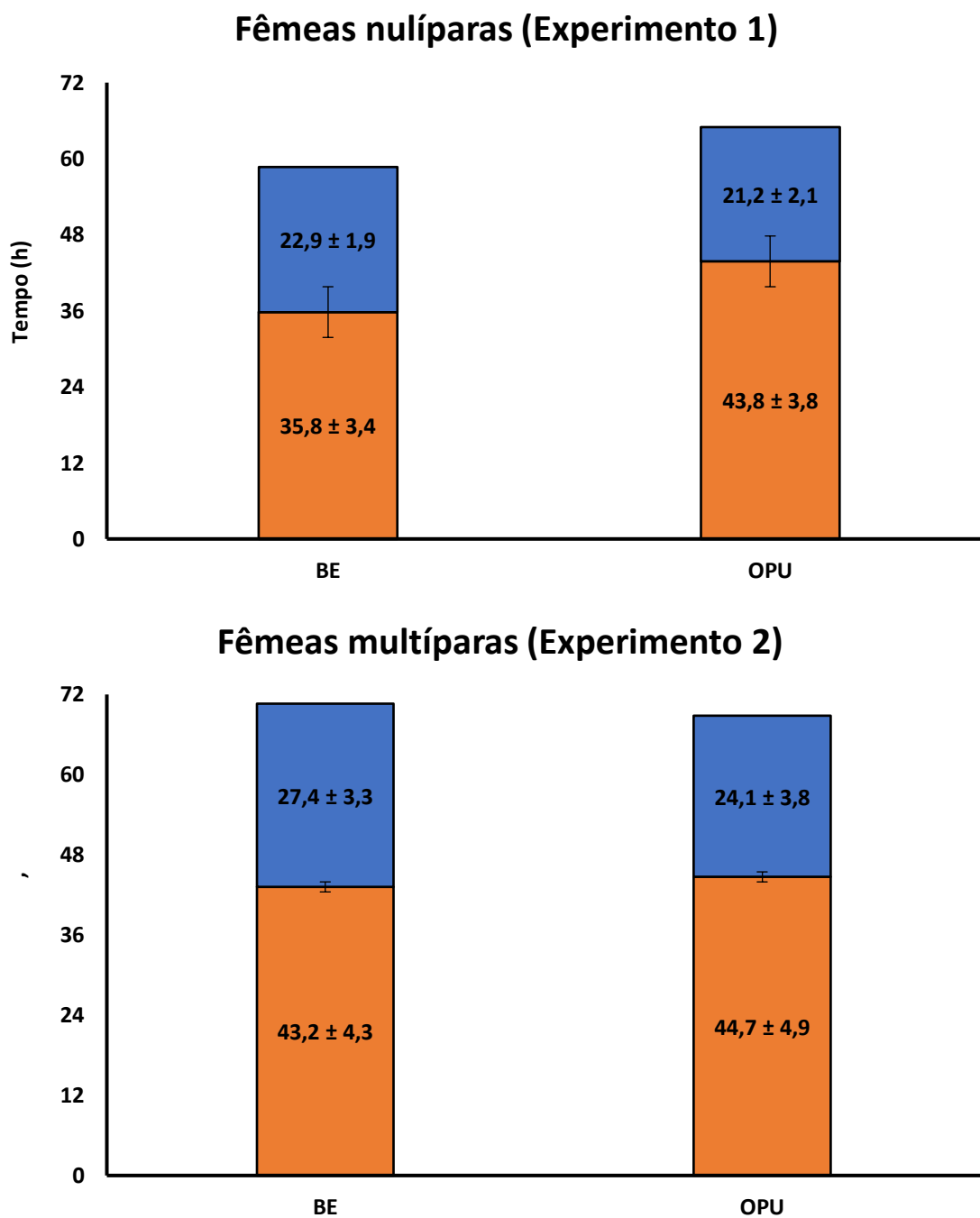


Figura 9. Intervalos de tempo desde a remoção da progesterona (t=0) ao estro (barras laranjas), do estro à ovulação (barras azuis) e da remoção da progesterona (t=0) à ovulação (barras laranja + azul) entre os grupos controle (BE) e tratamento (OPU) em fêmeas bovinas nulíparas (Experimento 1) e múltíparas (Experimento 2) da raça Brangus (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*).

As taxas de crescimento do FD, do recrutamento ao desvio aparente, foram maiores ($P < 0,05$) no Grupo OPU ($1,4 \pm 0,1$ mm/dia) do que no Grupo BE ($1,0 \pm 0,12$ mm/dia) nas nulíparas (Experimento 1), mas não nas fêmeas múltíparas (Experimento 2; $1,1 \pm 0,1$ e $1,2 \pm 0,1$ mm/dia para os grupos BE e OPU, respectivamente), conforme a Figura 10. Houve uma tendência ($P < 0,1$) à diferença na taxa de crescimento do FD do recrutamento à dominância entre o Grupo BE ($1,1 \pm 0,1$ mm/dia) e o Grupo OPU ($1,4 \pm 0,1$ mm/dia) nas nulíparas, sem diferenças detectadas nas fêmeas múltíparas ($1,0 \pm 0,1$ e $1,1 \pm 0,1$ mm/dia nos grupos BE e OPU, respectivamente). Não houve diferenças entre os grupos BE e OPU nas taxas de crescimento do FD/FPO do desvio folicular e da remoção da P4 à ovulação, nas nulíparas (Grupo BE, $0,4 \pm 0,3$ mm/dia e $0,6 \pm 0,2$ mm/dia; Grupo OPU, $0,4 \pm 0,2$ e $0,7 \pm 0,2$, respectivamente) e nas múltíparas (Grupo BE, $0,5 \pm 0,2$ mm/dia e $0,8 \pm 0,2$ mm/dia; Grupo OPU, $0,7 \pm 0,1$ mm/dia e $0,8 \pm 0,2$ mm/dia, respectivamente).

Nas nulíparas (Experimento 1), a taxa de crescimento total do FD, do recrutamento à ovulação, foi maior ($P < 0,05$) no grupo OPU ($1,2 \pm 0,1$ mm/dia) do que no grupo BE ($0,9 \pm 0,1$ mm/dia) conforme a Figura 11. Não houve diferença entre grupos nas fêmeas múltíparas (Experimento 2), com a taxa de crescimento total do FD sendo de $0,9 \pm 0,1$ mm/dia para ambos os grupos (Figura 11). Houve o aumento da população de folículos >10 mm em fêmeas nulíparas (Experimento 1) e múltíparas (Experimento 2), conforme evidenciado na Tabela 3 e 4, e na Figura 7. A redução das populações <10 mm foi gradual com o passar das avaliações, até a proximidade de uma nova onda folicular.

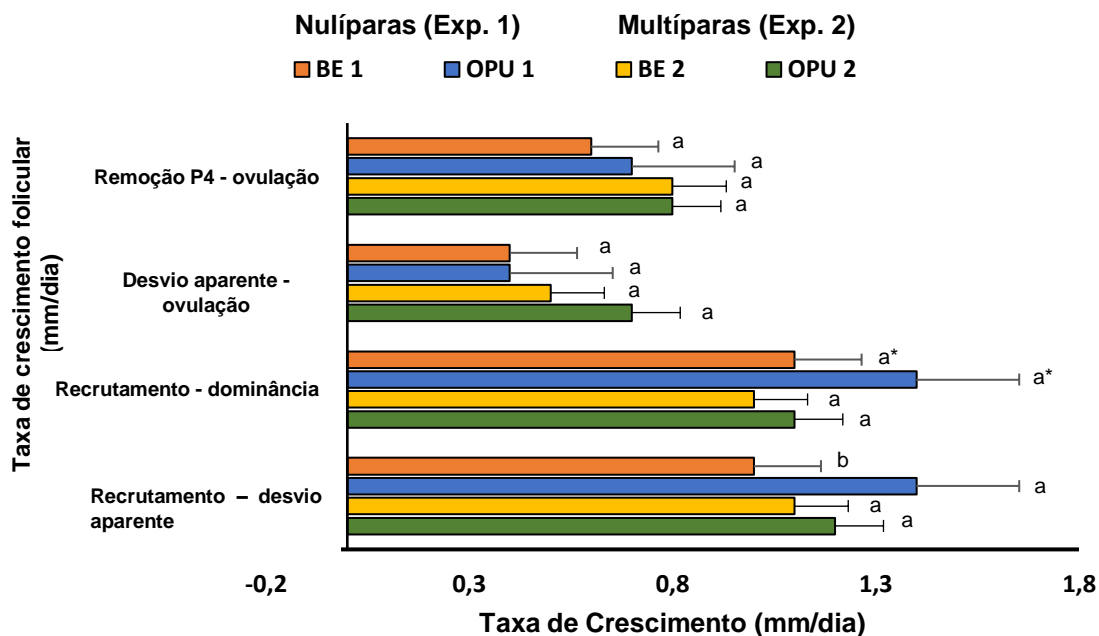


Figura 10. Taxa de crescimento média do folículo dominante (FD, mm/dia) do recrutamento ao desvio aparente, do recrutamento à dominância folicular, da remoção da P4 à ovulação e do desvio aparente à ovulação entre os grupos controle (BE) e tratamento (OPU) em fêmeas bovinas nulíparas (Experimento 1) e multíparas (Experimento 2) da raça Brangus (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*). ^{a,b} Barras seguidas de letras desiguais, entre grupos do mesmo experimento, diferem estatisticamente, para $P < 0,05$. *Indica tendência a diferença estatística ($P < 0,1$) entre valores dos grupos do mesmo experimento.

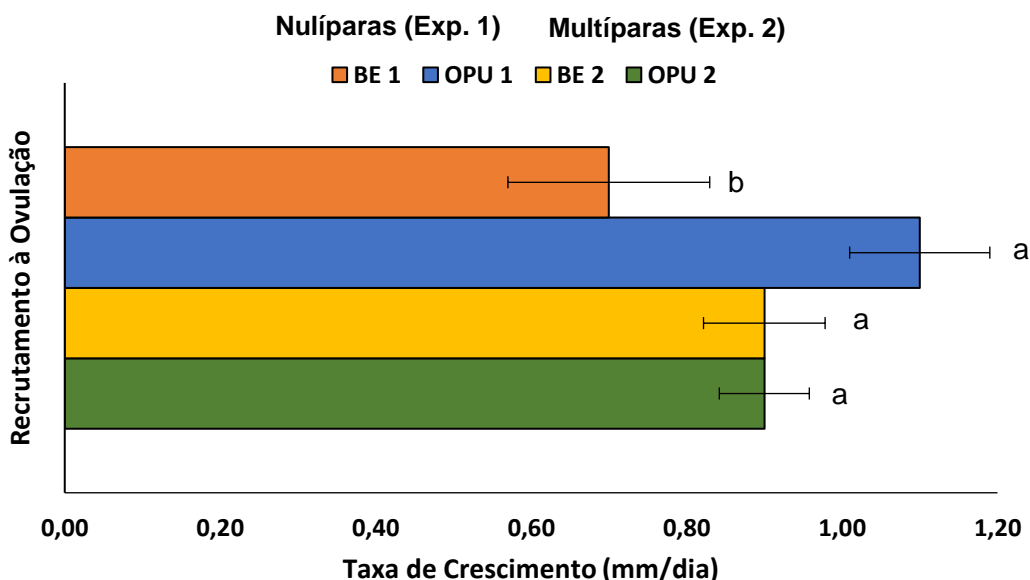


Figura 11. Taxa de crescimento médio (mm/dia) do folículo dominante (FD) do recrutamento à ovulação entre os grupos controle (BE) e tratamento (OPU) em fêmeas bovinas nulíparas (Experimento 1) e multíparas (Experimento 2) da raça Brangus (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*). ^{a,b} Colunas com letras desiguais, entre grupos do mesmo experimento, diferem estatisticamente, para $P < 0,05$.

5.2.4 Eventos excepcionais de relevância fisiológica

O acompanhamento diário possibilitou a constatação da ocorrência de eventos próximos da remoção da fonte de P4 e posterior ovulação do FD/FPO que tiveram influência no sucesso da ovulação, portanto possuíram relevância fisiológica neste trabalho. Pôde-se observar (a) o fenômeno de atresia do FD, que acarretou a não ovulação, (b) a estática folicular do FD, um processo de retomada no crescimento diário do FD após a remoção da P4 (PIERSON & ADAMS, 1999; QUIRK *et al.*, 2004), e (c) ovulação tardia, um processo de atraso na ovulação após a remoção de P4 e a aplicação do indutor de ovulação (CE). Este atraso na ovulação foi considerado regular quando ocorreu dentro da faixa de 48 h a 72 h após a indução da ovulação, com todas as ovulações após 72 h da indução sendo consideradas tardias (SALES *et al.*, 2012; TORRES-JÚNIOR *et al.*, 2014; USLENGHI *et al.*, 2014).

(i) Estática folicular. Na avaliação ultrassonográfica, percebeu-se um comportamento de estática folicular do FD em algumas nulíparas (Experimento 1) em cada grupo experimental, antes e depois da remoção da progesterona, caracterizado por um crescimento folicular que passou a ficar relativamente estático antes da remoção da P4, para retomar o crescimento posteriormente. Sob a ótica deste fator de estática folicular do FD, o tempo desde o recrutamento da nova onda à remoção da P4 foi maior para as nulíparas que observamos este evento, sendo em média de $-102,2 \pm 5,9$ h (Grupo BE, $-105,9 \pm 11,0$ h; Grupo OPU, $-91,3 \pm 8,9$ h), do que as fêmeas que não sofreram nenhum sinal de estática no crescimento ou atresia folicular, sendo em média de $-92,9 \pm 6,6$ h (Grupo BE, $-88,4 \pm 10,4$ h; Grupo OPU, $-100,4 \pm 8,3$ h), ou seja, quase 10 h a mais. Tal característica qualitativa do FD também foi observada nas múltiparas (Experimento 2), porém não houve diferença nos intervalos de tempo do recrutamento à remoção da P4, sendo de $-105,1 \pm 5,6$ h (Grupo BE, $-97,9 \pm 9,6$ h; Grupo OPU, $-112,0 \pm 6,6$ h) nas fêmeas em que houve a estática folicular do FD em

comparação àquelas que não manifestaram diferenças no crescimento e comportamento do FD, sendo em média de $-101,1 \pm 6,4$ h (Grupo BE, $-98,6 \pm 10,8$ h; Grupo OPU, $-104,4 \pm 9,9$ h). Já considerando o tempo desde a observação do início do desvio folicular (8,5 mm) até a remoção da P4, foi observada uma tendência ($P < 0,1$) de diferença significativa entre as nulíparas, havendo diferença significativa ($P < 0,05$) entre as multíparas com e sem a manifestação da estática folicular, com valores médios de $-55,1 \pm 8,8$ h (Grupo BE, $-54,3 \pm 16,8$ h; Grupo OPU, $-49,1 \pm 13,6$ h) para nulíparas e de $-51,8 \pm 6,6$ h (Grupo BE, $-38,0 \pm 11,3$ h; Grupo OPU, $-56,1 \pm 7,81$ h) para multíparas com estática folicular, e de $-28,9 \pm 9,9$ h (Grupo BE, $-20,7 \pm 15,9$ h; Grupo OPU, $-40,6 \pm 12,7$ h) para nulíparas e de $-17,8 \pm 7,6$ h (Grupo BE, $-9,6 \pm 12,8$ h; Grupo OPU, $-13,6 \pm 11,7$ h) para multíparas sem alteração no FD, ou seja, cerca de 26 h e 34 h de diferença, respectivamente.

Não houve diferença no tamanho do FD à remoção da P4 entre as nulíparas que apresentaram uma estática folicular do FD ($12,1 \pm 0,7$ mm; Grupo BE, $11,5 \pm 1,3$ mm; Grupo OPU, $12,1 \pm 1,1$ mm) e as que não manifestaram tal característica no FD ($10,9 \pm 0,8$ mm; Grupo BE, $10,3 \pm 1,2$ mm; Grupo OPU; $11,6 \pm 1,0$ mm). No entanto, houve diferença ($P < 0,05$) no tamanho do FD à remoção da P4 entre as multíparas que manifestaram uma estática folicular ($12,1 \pm 0,6$ mm; Grupo BE, $10,5 \pm 0,8$ mm; Grupo OPU, $13,3 \pm 0,5$ mm) e as que não manifestaram tal característica no FD ($9,5 \pm 0,7$ mm; Grupo BE, $8,3 \pm 0,9$ mm; Grupo OPU, $9,2 \pm 0,8$ mm).

Das fêmeas nulíparas que manifestaram o fenômeno de estática folicular, não houve diferença estatística em comparação às fêmeas sem tal manifestação em relação a taxa de crescimento do FD do recrutamento e do início do desvio à remoção da P4. Porém, os valores médios das taxas de crescimento folicular do recrutamento ao início do desvio e do recrutamento à remoção da P4 foram maiores para as nulíparas que manifestaram o comportamento de estática folicular ($1,4 \pm 0,1$ mm/dia e $1,4 \pm 0,1$ mm/dia, respectivamente)

em comparação às nulíparas ($1,2 \pm 0,1$ mm/dia e $1,2 \pm 0,1$ mm/dia, respectivamente) sem a manifestação de tal fenômeno. Nas fêmeas múltíparas, houve diferença estatística ($P < 0,05$) nas taxas de crescimento folicular do recrutamento ao início do desvio e do recrutamento à remoção da P4, sendo maiores para as vacas que manifestaram o fenômeno de estática folicular ($1,4 \pm 0,1$ mm/dia e $1,4 \pm 0,1$ mm/dia, respectivamente) em comparação às fêmeas sem a manifestação deste fenômeno ($0,9 \pm 0,2$ mm/dia e $0,8 \pm 0,1$ mm/dia, respectivamente).

Ao se observar o tempo dos eventos após a remoção da fonte de P4 (desvio aparente, dominância, estro e ovulação), não foram observadas diferenças quanto à condição de estática folicular do FD entre as nulíparas (Experimento 1) dos grupos experimentais BE e OPU. Porém, as fêmeas múltíparas (Experimento 2) com manifestações de comportamento de estática folicular do FD apresentaram tempos significativamente menores do que as fêmeas sem manifestações deste fenômeno (a) do desvio aparente à remoção da P4 ($-3,3 \pm 4,5$ h vs. $20,2 \pm 5,2$ h; $P < 0,05$), (b) da dominância à remoção da P4 ($14,3 \pm 4,4$ h vs. $34,5 \pm 5,1$ h; $P < 0,05$), (c) da remoção da P4 ao estro ($36,4 \pm 2,9$ h vs. $52,2 \pm 3,3$ h; $P < 0,05$), e (d) da remoção da P4 à ovulação ($65,1 \pm 1,6$ vs. $76,4 \pm 1,8$ h; $P < 0,05$), respectivamente.

As fêmeas múltíparas (Experimento 2) que apresentaram o fenômeno de estática folicular apresentaram um intervalo menor de tempo ($P < 0,05$) da remoção da P4 ao estro ($36,7 \pm 2,9$ h; Grupo BE, $36,4 \pm 5,3$ h; Grupo OPU, $35,9 \pm 5,3$ h) e da remoção da P4 à ovulação ($66,2 \pm 1,8$ h; Grupo BE, $74,7 \pm 2,4$ h; Grupo OPU, $71,4 \pm 1,7$ h) do que as fêmeas sem manifestação do fenômeno ($53,4 \pm 3,3$ h; Grupo BE, $49,5 \pm 4,1$ h; Grupo OPU, $61,3 \pm 5,8$ h, e $74,8 \pm 2,1$ h; Grupo BE, $75,2 \pm 2,8$ h; Grupo OPU, $79,0 \pm 2,5$ h, respectivamente). O intervalo estro-ovulação foi semelhante entre as fêmeas que manifestaram o comportamento de estática folicular ($29,5 \pm 3,0$ h; Grupo BE, $35,6 \pm 5,6$ h; Grupo OPU, $32,0 \pm 5,6$ h) e as fêmeas que não demonstraram este comportamento do FD ($21,4 \pm 3,5$ h; Grupo BE, $23,5 \pm 4,3$ h; Grupo OPU, $17,0 \pm 6,1$ h). Não houve diferença estatística nestes intervalos

de tempo entre fêmeas nulíparas (Experimento 1) com e sem manifestação de estática folicular do FD.

Não houve diferença estatística entre as médias do tamanho do FD, em nenhum dos eventos observados, quando comparadas às nulíparas (Experimento 1) que apresentaram o comportamento de estática folicular ou de atresia do FD. Porém nas múltíparas (Experimento 2), houve diferença estatística ($P < 0,05$) do tamanho do FD na remoção da P4, quando comparadas as fêmeas que não sofreram atresia ($8,7 \pm 0,7$ mm) com as que apresentaram o fenômeno de estática folicular do FD ($11,9 \pm 0,5$ mm). Uma tendência de diferença estatística ($P < 0,1$) foi observada entre as médias do tamanho do FD na dominância entre as múltíparas que não sofreram a atresia e que apresentaram o comportamento de estática folicular do FD ($10,9 \pm 0,9$ e $12,9 \pm 0,7$ mm, respectivamente).

Quanto à taxa de crescimento do FD, não houve diferença significativa entre fêmeas nulíparas (Experimento 1) que apresentaram características de estática folicular do FD e nulíparas sem tal fenômeno, sendo de $1,2 \pm 0,1$ e $1,2 \pm 0,1$ mm/dia do recrutamento ao desvio aparente, de $1,2 \pm 0,1$ e $1,2 \pm 0,1$ mm/dia do recrutamento à dominância, de $0,5 \pm 0,3$ mm/dia e $0,3 \pm 0,3$ mm/dia do desvio aparente à ovulação, de $0,7 \pm 0,2$ mm/dia e $0,6 \pm 0,2$ mm/dia da remoção da P4 à ovulação, e de $0,9 \pm 0,1$ mm/dia e $0,9 \pm 0,1$ mm/dia do recrutamento à ovulação, respectivamente. Já nas fêmeas múltíparas (Experimento 2), houve diferença significativa nas taxas de crescimento do FD do recrutamento ao desvio aparente ($1,0 \pm 0,1$ e $1,3 \pm 0,1$ mm/dia) e do recrutamento à dominância ($0,9 \pm 0,1$ e $1,2 \pm 0,1$ mm/dia) para as fêmeas que não e para as que demonstraram o fenômeno de estática folicular do FD, respectivamente. Não houve diferença estatística na taxa de crescimento do desvio aparente à ovulação ($0,7 \pm 0,2$ e $0,5 \pm 0,2$), da remoção da P4 à ovulação ($1,0 \pm 0,2$ e $0,6 \pm 0,2$), e do recrutamento à ovulação ($0,9 \pm 0,1$ mm/dia e $0,9 \pm 0,1$ mm/dia), respectivamente.

(ii) **Atraso na ovulação.** Sob a perspectiva do momento da ovulação, sendo regular ou tardia, os tempos dos intervalos entre a remoção da fonte de P4, os sinais de estro e por fim da ovulação apresentaram diferenças (Figura 12). Nas fêmeas nulíparas (Experimento 1), houve diferença ($P < 0,05$) no intervalo da remoção da P4 ao estro (P4-E) para as nulíparas que ovularam em tempo esperado ($35,2 \pm 1,6$ h) em comparação às fêmeas que ovularam tardiamente ($60,2 \pm 3,0$ h). O intervalo estro-ovulação (E-O) não apresentou diferença entre as nulíparas regulares e tardias, sendo de $22,9 \pm 1,5$ h e $18,5 \pm 3,4$ h, respectivamente. Assim como o P4-E, o intervalo entre a remoção da P4 à ovulação (P4-O) apresentou diferença estatística ($P < 0,05$) entre as nulíparas regulares ($58,1 \pm 2,1$ h) e as tardias ($78,7 \pm 4,6$ h). Nas Multíparas (Experimento 2), não houve diferença estatística para os intervalos da remoção da P4 até os sinais de estro (P4-E) e dos sinais de estro até à ovulação (E-O) entre os tempos médios das multíparas com ovulação em tempo regular ($41,4 \pm 3,2$ e $26,1 \pm 2,9$ h, respectivamente) e tardias ($52,9 \pm 6,3$ e $25,7 \pm 5,5$ h, respectivamente). Já no intervalo da remoção da P4 à ovulação (P4-O), houve diferença estatística ($P < 0,05$) no tempo médio entre as fêmeas com ovulação em tempo esperado ($67,6 \pm 1,8$ h) e as fêmeas tardias ($78,4 \pm 3,4$ h).

Não houve diferença estatística no Experimento 1 (Nulíparas) para o tamanho do FD na remoção de P4, com as nulíparas que ovularam no tempo esperado apresentando o tamanho médio de $12,5 \pm 0,8$ mm, e as fêmeas que atrasaram a ovulação de $10,4 \pm 1,1$ mm. Em contrapartida, comparando as médias dos tamanhos do FD no desvio, observou-se diferença estatística ($P < 0,05$) entre nulíparas que ovularam em tempo esperado ($13,0 \pm 0,6$ mm) e tardiamente ($11,0 \pm 0,7$ mm). Quanto ao tamanho do FD na dominância, observou-se uma tendência de diferença estatística ($P < 0,1$) entre fêmeas de ovulação regular e tardia, sendo as médias de $14,5 \pm 0,8$ e $11,9 \pm 1,1$ mm, respectivamente. Na mesma segregação de fêmeas quanto à regularidade ou atraso da ovulação, houve uma tendência a uma diferença

estatística ($P < 0,1$) no Experimento 2 (Multíparas) para o tamanho do FD no desvio aparente e no estro, comparando as médias dos tamanhos das fêmeas que ovularam no tempo esperado ($11,4 \pm 0,3$ e $12,9 \pm 0,4$ mm, respectivamente).

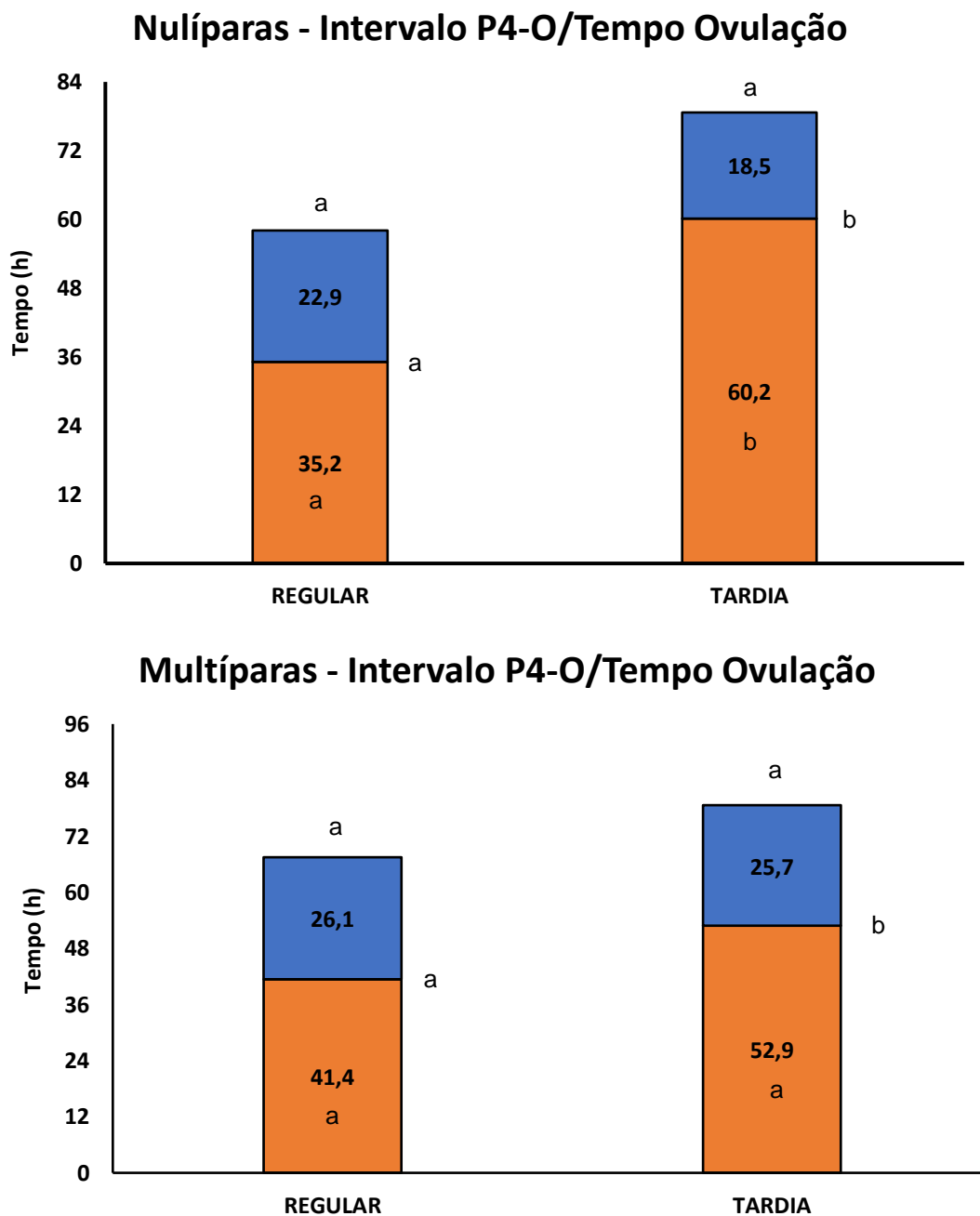


Figura 12. Média dos Intervalos de tempos (h) da remoção da progesterona ($t=0$) à ovulação (P4-O), da remoção da P4 aos sinais de estro (P4-E) e dos sinais de estro à ovulação (E-O) para fêmeas nulíparas (Experimento 1) ou multíparas (Experimento 2) da raça Brangus (*Bos taurus taurus* vs. *Bos taurus indicus*) que ovularam em um período regular esperado e que ovularam tardiamente. ^{a,b}: Colunas com letras designuais, entre intervalos de tempo, diferem estatisticamente, para $P < 0,05$.

As taxas de crescimento folicular foram semelhantes entre as fêmeas nulíparas (Experimento 1) com ovulação regular ou tardia, com as taxas de crescimento do FD do recrutamento ao desvio aparente de $1,3 \pm 0,1$ e $1,1 \pm 0,1$ mm/dia para as fêmeas que ovularam regularmente ou tardiamente, respectivamente. Do recrutamento à dominância, as taxas de crescimento foram de $1,4 \pm 0,1$ e $1,1 \pm 0,2$ mm/dia para as nulíparas com ovulação regular e tardia, respectivamente. Do desvio aparente à ovulação, nulíparas com ovulação regular tiveram uma taxa de crescimento médio $0,5 \pm 0,3$ mm/dia, e as tardias de $0,3 \pm 0,3$ mm/dia. As fêmeas que ovularam regularmente apresentaram uma taxa de crescimento do FD da remoção da P4 até a ovulação de $0,7 \pm 0,2$ mm/dia, e as tardias de $0,6 \pm 0,2$ mm/dia. A taxa de crescimento do recrutamento à ovulação foi de $1,0 \pm 0,1$ e $0,8 \pm 0,1$ mm/dia para nulíparas com ovulação regular e tardia, respectivamente. Porém, nas fêmeas múltíparas (Experimento 2), houve diferença significativa ($P < 0,05$) na taxa de crescimento do recrutamento ao desvio aparente, sendo de $1,3 \pm 0,1$ e $1,0 \pm 0,1$ mm/dia para as fêmeas que ovularam regularmente ou tardiamente, respectivamente. Também houve diferença da taxa de crescimento do recrutamento à ovulação, sendo de $1,0 \pm 0,1$ e $0,7 \pm 0,1$ mm/dia para múltíparas com ovulação regular e tardia, respectivamente. Não houve diferença na taxa de crescimento do recrutamento à dominância ($1,1 \pm 0,1$ e $1,0 \pm 0,1$ mm/dia para múltíparas regulares e tardias, respectivamente), do desvio aparente à ovulação ($0,7 \pm 0,3$ mm/dia e $0,5 \pm 0,2$ mm/dia para vacas regulares e tardias, respectivamente), e da remoção da P4 até a ovulação ($0,9 \pm 0,3$ mm/dia para as múltíparas regulares, e $0,6 \pm 0,2$ mm/dia para as tardias).

5.3 Observações das fêmeas não responsivas à indução de uma nova onda folicular e/ou à ovulação

No Experimento 1, 41,1% (7/17) das fêmeas do grupo BE e 35,3% (6/17) das fêmeas do grupo OPU falharam em induzir uma nova onda folicular e/ou em ovular um FD/FPO oriundo desta onda emergente. A distribuição da fase da dinâmica folicular inicial das

nulíparas não responsivas do grupo BE foi de 14% (1/7) em seleção e 86% (6/7) em dominância, enquanto no grupo OPU a proporção foi de 100% (6/6) em dominância. Das cinco nulíparas no grupo BE que falharam a indução de uma nova onda folicular, em três houve a atresia dos folículos recém recrutados, sendo duas de forma extremamente precoce (entre os Dias 4 e 5), levando à identificação de uma segunda nova onda folicular recrutada três a quatro dias após, que ovulou após o período esperado para aquelas em que uma nova primeira onda emergiu e permaneceu síncrona. Na terceira nulípara, houve a atresia dos folículos recrutados (entre os Dias 7 e 8) devido à permanência do FD oriundo da onda anterior, havendo a emergência de uma segunda onda após a remoção da P4 e a ovulação deste FPO ocorrendo além da janela considerada ideal para as ondas que emergiram regularmente. Em todas estas nulíparas, a ovulação foi confirmada sete dias após o término das avaliações, mediante a identificação de um CL à palpação e no exame ultrassonográfico. As outras duas fêmeas falharam em induzir uma nova onda folicular pelo não crescimento e desenvolvimento de um FD, uma vez que os folículos não ultrapassaram o tamanho esperado do futuro FD no início do desvio folicular (8,5 mm; GINTHER, 2016), com a emergência de folículos pequenos sendo próxima ao dia da remoção da P4, entre o 6º e o 7º dia. Em ambas, a permanência do FD em atresia oriundo da onda folicular anterior perdurou por mais tempo nas avaliações iniciais, permanecendo do 6º ao 8º dia das avaliações. Sete dias após o término das avaliações não foi constatada a presença de CL na avaliação ultrassonográfica, com as fêmeas que apresentavam uma dinâmica folicular de seleção e dominância evidenciando a regressão folicular e o recrutamento de uma nova onda ao final das observações. As duas nulíparas restantes falharam em ovular ao final das avaliações, portanto não foi identificado, no 7º dia após o término das observações, nenhum CL ao exame ultrassonográfico, ficando evidente, pela dinâmica folicular observada (recrutamento

e transição de seleção para dominância), que uma nova onda havia iniciado ao final dos dias avaliados.

No Experimento 2, todas as fêmeas (22/22, 100%) iniciaram uma nova onda após a indução hormonal ou física, mas quatro falharam em ovular o FD/FPO oriundo da nova onda folicular sincronizada, duas (18,2%) em cada grupo. A distribuição da fase da dinâmica folicular inicial nas múltíparas do grupo BE foi de 100% (2/2) em seleção, e no grupo OPU, de 100% (2/2) em dominância. Diferentemente das fêmeas nulíparas, não houve insucessos na indução de uma nova onda folicular nas fêmeas múltíparas (Experimento 2), em nenhum dos dois grupos, ou seja, todas as fêmeas apresentaram uma nova onda folicular após a indução hormonal e física. Porém, houve a falha da ovulação do FD/FPO em quatro fêmeas, duas em cada grupo, onde se identificou uma nova onda, e acompanhou-se o crescimento deste futuro FD até o período esperado da ovulação. Em três destas fêmeas este folículo sofreu a atresia próximo do dia da remoção da P4. A confirmação da falha da ovulação foi realizada sete dias após o término das observações, onde não se identificou a presença de um CL em nenhuma das múltíparas, e pôde-se observar que, pela dinâmica visualizada nesta avaliação (seleção e dominância), em todas as fêmeas uma nova onda havia iniciado após o acompanhamento diário do período experimental.

6. DISCUSSÃO

A eficiência e a eficácia de aplicação das diferentes biotécnicas da reprodução animal, como a IATF, a TETF, e a MOET/SOV, dependem da sincronização do estro e da ovulação, que por sua vez, dependem do sucesso na indução e na sincronização de uma nova onda folicular no início dos protocolos hormonais, tanto no tempo quanto no espaço (BARUSELLI *et al.*, 2011; BÓ *et al.*, 2012; DISKIN *et al.*, 2002; MADUREIRA *et al.*, 2020; MAPLETOFT *et al.*, 2018). As variações quantitativas e qualitativas da manipulação do ciclo estral e do desenvolvimento folicular irão determinar a eficácia do processo como um todo, sendo que ao final desejamos que o maior número de fêmeas sincronize a nova onda e ovule oócitos viáveis em uma janela de tempo esperado (BARUSELLI *et al.*, 2012). Assim, o sucesso da indução e da sincronização da nova onda folicular é, invariavelmente, primordial para a eficiência e eficácia de aplicação das biotécnicas reprodutivas acima. Estudos que revisem tais processos fisiológicos na reprodução de fêmeas bovinas podem impactar diretamente no uso e na aplicação de tais biotécnicas, tendo este estudo sido enfocado na indução de uma nova onda folicular em bovinos, com o monitoramento temporal e espacial subsequente dos eventos da dinâmica folicular ovariana, de comportamento de estro e da ovulação.

Métodos hormonais de sincronização do ciclo estral bovino são estudados desde a década de 1940 (STEVENSON & BRITT, 2017). Com a evolução do conhecimento sobre a fisiologia ovariana, novos protocolos hormonais de sincronização e ovulação de uma nova onda folicular induzida foram propostos já próximo à virada do milênio, primariamente em bovinos de leite, a partir do protocolo OvSynch (PURSLEY *et al.*, 1995). Desde então, relataram-se diferentes respostas às inúmeras variações de protocolos, em bovinos de corte e de leite (BARUSELLI *et al.*, 2012; BÓ & MAPLETOFT, 2014; BÓ *et al.*, 2016; LAMB & MARCADANTE, 2016; MAPLETOFT *et al.*, 2018; STEVENSON & BRITT, 2017), pois

ao se tratar de fisiologia reprodutiva das fêmeas, existem diversas variáveis que contribuem para o sucesso ou não do método aplicado (BARUSELLI *et al.*, 2007; BARUSELLI *et al.*, 2012; BARUSELLI *et al.*, 2016; BARUSELLI *et al.*, 2017a; D'OCCHIO *et al.*, 2019; MEIKLE *et al.*, 2018; MONNIAUX, 2018; SARTORI *et al.*, 2016). No Brasil e na América do Sul, o método hormonal amplamente utilizado na maioria dos protocolos de sincronização do ciclo estral em bovinos de corte com vistas primariamente à IATF é composto pela aplicação de 2 mg de BE concomitante à inserção de um dispositivo intravaginal bovino de liberação lenta de P4. Bó *et al.* (1995a) e MacMillan *et al.* (1993) propuseram esta metodologia como uma alternativa ao Ovsynch (PURSLEY *et al.*, 1995), que até então era o método de sincronização amplamente utilizado, principalmente nos EUA, e que, diferentemente dos protocolos com uma aplicação de GnRH, em estágios aleatórios do ciclo estral das fêmeas, como indutor de uma nova onda folicular, teria o benefício de não necessitar a presença de um FD ao início do tratamento, podendo-se aplicar em todas as fêmeas independentemente da ciclicidade, do estágio do ciclo estral e da dinâmica folicular (BÓ *et al.*, 2018; STEVENSON & BRITT, 2017). Por ter um impacto maior no sucesso da aplicação das diferentes biotécnicas, o foco principal deste trabalho foi observar a resposta fisiológica de duas categorias distintas de fêmeas, nulíparas e múltíparas, frente a duas metodologias de indução e sincronização de uma nova onda folicular. Em segundo plano observou-se a ocorrência ou não do estro e da ovulação, em uma janela biológica adequada à fecundação, a partir do FD oriundo da nova onda induzida.

Neste estudo, observou-se uma menor eficiência (71%) na indução de uma nova onda folicular no grupo controle (BE) em novilhas, em comparação ao grupo OPU (100%), apesar de também ter sido de 100% em ambos os grupos na categoria de fêmeas múltíparas. A porcentagem de fêmeas que respondeu à indução hormonal de uma nova onda esteve dentro de valores também já relatados na literatura (BRIDGES *et al.*, 1999; BURKE *et al.*, 2001;

CARVALHO *et al.*, 2008; MADUREIRA *et al.*, 2020; MARTÍNEZ *et al.*, 2005), com exceção das nulíparas do Grupo BE, o qual evidenciou resultados abaixo dos citados na literatura. Em geral, os autores de distintos trabalhos afirmaram que as falhas de indução de uma nova onda folicular deveram-se à eminência da ovulação ou à atresia do FD no momento da aplicação do éster de estradiol (BÓ *et al.*, 1995b; BRIDGES *et al.*, 1999; BURKE *et al.*, 2001; DISKIN *et al.*, 2002), condição em que três das cinco nulíparas que falharam neste estudo poderiam estar no momento da indução, já que apresentavam um FD ao início do tratamento. Em nosso estudo, as observações de falha na indução foram associadas à atresia precoce dos folículos recrutados (3/5 nulíparas) e ao não crescimento/desenvolvimento dos folículos recrutados (2/5 nulíparas) até o tamanho característico do início do desvio folicular de um futuro FD (8,5 mm) em relação aos subordinados. A permanência do FD em atresia da onda folicular anterior, observado nas duas nulíparas que não demonstraram crescimento folicular, poderia ter influenciado no desenvolvimento da nova onda, uma vez que a atresia incompleta do FD anterior pode interferir nos níveis séricos de FSH que induz o recrutamento folicular nas fêmeas (DISKIN *et al.*, 2002; MADUREIRA *et al.*, 2020; MARTÍNEZ *et al.*, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2015). No grupo BE, após a aplicação do hormônio, foi possível constatar em boa parte das fêmeas o processo de atresia dos folículos presentes no momento da indução. Por meio de imagens ultrassonográficas, evidenciou-se uma alteração de formato e irregularidades nos bordos do antro dos folículos, até o completo desaparecimento próximo à emergência da nova onda folicular. Existem trabalhos que já descreveram estes fenômenos de atresia em detalhes, entre outros, por meio de avaliações ultrassonográficas e análise das imagens geradas a partir das diferenças de ecogenicidade das estruturas (PIERSON & ADAMS, 1999; VASSENA *et al.*, 2003).

A metodologia física de indução de uma nova onda folicular por meio da aspiração de todos os folículos ≥ 5 mm mostrou-se mais efetiva em induzir uma nova onda folicular do que o BE, já que em 100% das fêmeas de ambos os Experimentos (1 e 2) ocorreu o recrutamento de uma nova onda em ± 48 h após o procedimento. Estes valores corroboram com os achados de Bergfelt *et al.* (1994) e de outros estudos no uso desta estratégia (AMIRIDIS *et al.*, 2006; BARACALDO *et al.*, 2000; BERGFELT *et al.*, 1997a; GARCIA & SALAHEDDINE, 1998; KIM *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2007). A maioria destes estudos não relatam falhas na indução de uma nova onda, porém percebe-se que há uma deficiência de observações mais minuciosas nos períodos pós-ablação que poderiam evidenciar possíveis imprecisões da metodologia. O processo de ablação folicular por aspiração ocasiona no colapso do folículo, com o desaparecimento do lúmen folicular ou antro, havendo a expectativa da atresia do folículo por apoptose das células da parede folicular. Porém, estudos indicam ser possível o retorno à funcionalidade de alguns folículos após a ablação, com a denominação de tais estruturas de folículos residuais (GHETTI *et al.*, 2016; VIANA *et al.*, 2013). Normalmente, os estudos que aplicam a técnica de ablação folicular por OPU não realizam o acompanhamento ultrassonográfico imediato, portanto este fenômeno muitas vezes não é identificado. No entanto, os estudos pioneiros de Bergfelt *et al.* (1994) nesta técnica já descreviam à época a detecção de supostos corpos hemorrágicos (CHs) nos dias subsequentes à ablação, a exemplo do que observamos neste estudo, geralmente atribuídos à aspiração de folículos >11 mm. Ginther *et al.* (1999) foram aparentemente os primeiros autores a constatarem o retorno do conteúdo folicular após a aspiração em alguns folículos, levantando a hipótese de não haver o comprometimento completo das estruturas foliculares após a OPU, o que permitiria uma retomada parcial ou total da funcionalidade destes folículo. No presente estudo, pôde-se observar estruturas irregulares nos dias posteriores à ablação folicular, podendo ser CHs, conforme Bergfelt *et*

al. (1994), ou mesmo folículos residuais, conforme Ginther *et al.* (1999). Tanto fêmeas nulíparas quanto múltiparas apresentaram estas estruturas subsequentes à OPU. Como a maioria das fêmeas que ovularam apresentaram este fenômeno, e mesmo não sendo possível definirmos que tipo exato de estrutura esteve presente nos ovários, presumimos serem estruturas não funcionais, não tendo havido interferência no desenvolvimento da nova onda folicular subsequente e da ovulação.

O número total de folículos antrais observados, a média de folículos/fêmea/avaliação e a proporção de folículos <5 mm diferiram entre os grupos experimentais nas nulíparas (Experimento 1). Já nas fêmeas múltiparas (Experimento 2) se observou apenas uma diferença na proporção de folículos <5 mm entre os grupos. Outros trabalhos da literatura citam a ocorrência de problemas ou não na observação ovariana diária, porém a grande maioria descreve complicações durante estas complexas avaliações diárias, das quais podem ocorrer algumas imprecisões em vários pontos (KO *et al.*, 1991; KULICK *et al.*, 1999). Provavelmente, os resultados neste estudo não denotam diferenças fisiológicas entre tratamentos, havendo pelo menos três possibilidades que poderiam justificar tais achados: (a) diferença ao acaso, devido à variação nos folículos <5 mm, que possuem uma elevada proporção dentro da população total observada, onde a variação da contagem destes folículos pode ter ocorrido por fatores individuais das fêmeas ou por efeito técnico na contagem; (b) diferença causada pela contagem diária de folículos em atresia no grupo BE, e eliminação de folículos >5 mm no grupo OPU, o que, pelo número de fêmeas por grupo, e por um determinado número de exames, causa um aumento no número de folículos contados no grupo BE e uma redução no OPU; e (c) acúmulo da pequena diferença existente, que diariamente, vai aumentando.

Conforme já descrito em estudos anteriores, há uma boa possibilidade de uma pequena parcela das fêmeas não responder ao BE, dependendo da fase da dinâmica inicial

em que estas se encontram (BÓ *et al.*, 1995b; BRIDGES *et al.*, 1999; BURKE *et al.*, 2001; DISKIN *et al.*, 2002). No Experimento 1, o padrão de dinâmica folicular inicial das nulíparas era distinto entre os grupos, com fêmeas em seleção e dominância no Grupo BE, e somente em dominância no Grupo OPU. A variabilidade da resposta de indução de uma nova onda folicular, na média, foi menor no grupo OPU do que no BE. Esta particularidade ainda não foi descrita em trabalhos que utilizam a ablação folicular como método de indução de uma nova onda. Outro possível fator que pode influenciar é o fato das fêmeas induzidas hormonalmente passarem por um intervalo maior de tempo da indução até o recrutamento da nova onda, devido à depuração dos níveis de estradiol (MAPLETOFT *et al.*, 2002; MARTÍNEZ *et al.*, 2005; O'ROURKE *et al.*, 2000). Este período permite uma maior expressão de fatores individuais, como diferenças na metabolização deste hormônio e taxas de crescimento folicular distintas, que conseqüentemente causarão a maior dispersão das ondas foliculares (BARUSELLI *et al.*, 2017a). Já no Experimento 2, houve uma menor diferença no padrão de dinâmica folicular inicial entre os grupos BE e OPU, o que pode ter levado a uma menor variabilidade entre as respostas das fêmeas aos dois protocolos de indução de nova onda folicular. Duas observações particulares ocorreram no Grupo OPU, onde uma fêmea apresentou o reenchimento do folículo aspirado, em suposto folículo residual, contudo sem evidências de interferência na nova onda e na ovulação do FD/FPO (GHETTI *et al.*, 2016; VIANA *et al.*, 2013). A segunda particularidade foi a ausência de estruturas aspiráveis (≥ 5 mm) e a aspiração de um folículo pequeno (6,4 mm) no dia da ablação folicular, que levou ao aparecimento de estruturas maiores (recrutamento) em menos de 24 h. Inferimos que a emergência de uma nova onda ocorreria ou estava por ocorrer de forma fisiológica em continuidade à dinâmica folicular, independente da ablação, porém não evidenciamos relatos na literatura que permitam a comparação aos casos observados neste estudo.

A diferença entre os tempos de indução hormonal de regressão folicular/OPU e a remoção da P4 e indução de ovulação (D0) entre os grupos em ambos os experimentos (Tabela 2, Figuras 5 e 6) era esperada, pois o intervalo médio do processo de indução à emergência da nova onda folicular observada neste trabalho, em ambos os grupos e experimentos, corrobora com o que se observa em média na literatura (BERGFELT *et al.*, 1994; MAPLETOFT *et al.*, 2018; MARTÍNEZ *et al.*, 2005). O conhecimento do exato momento da emergência folicular é de importância para a aplicação em protocolos de MOET (SOV), pois almeja-se iniciar o protocolo de superestimulação hormonal das doadoras o mais próximo possível deste evento, para que seja recrutado o maior número possível de folículos antrais responsivos ao FSH (BÓ & MAPLETOFT, 2014; BÓ *et al.*, 2019). Conforme citado anteriormente, o tempo médio do recrutamento da nova onda, após a aplicação do BE, foi de 4 a 5 dias, o que esteve de acordo com a maioria dos protocolos de SOV de doadoras que utilizaram a associação de BE com um inserto vaginal de P4 no início do tratamento para sincronizar as fêmeas, com as aplicações de FSH exógeno iniciando entre o 4º e 5º dias. No grupo OPU a lógica não é diferente, uma vez que estudos anteriores que utilizaram a ablação folicular para a sincronização de uma nova onda folicular iniciaram o protocolo de aplicação do FSH, em média, entre o 1º e o 2º dias após a ablação dos folículos (BERGFELT *et al.*, 1997a; BÓ *et al.*, 2019; CIRIT *et al.*, 2019; SURJUS *et al.*, 2014), corroborando com as médias observadas nos Grupos OPU, de ambos os experimentos, do nosso trabalho.

Após a emergência da nova onda, o desenvolvimento do FD entre os grupos em ambos os experimentos não diferiu entre si, apesar de que o Grupo OPU, tanto nas nulíparas como nas múltíparas, apresentou um crescimento diário maior (Figura 8), conseqüentemente o FD destas fêmeas atingiu o tamanho do início do desvio (8,5 mm) mais precocemente do que as do Grupo BE (Tabela 2, Figuras 5 e 6). A diferença média de 2,5 a 3,0 dias do recrutamento ao início do desvio do FD foi semelhante aos valores descritos primeiramente

por Ginther *et al.* (1997), e consolidado por Ginther (2016). As observações diárias nos permitiram identificar o recrutamento do FD, juntamente com um grupo de FS que o acompanharam durante as próximas avaliações. Com o passar das avaliações, pôde-se observar a emergência de novos folículos, porém eram poucos que acompanhavam o crescimento em conjunto com o FD, permanecendo com uma população estável durante a fase de crescimento folicular comum até o momento próximo do início do desvio folicular, em que pôde-se observar o início da seleção folicular, que posteriormente avançou para o desvio aparente do diâmetro folicular entre FD e FS e por fim, à dominância folicular (Tabelas 3 e 4, Figura 7). Os padrões referentes à flutuação da população e à dinâmica folicular observados neste estudo corroboram com demais estudos (GINTHER *et al.*, 1989a; GINTHER *et al.*, 1989b; GINTHER *et al.*, 2001a; IRELAND *et al.*, 2007; JAISWAL *et al.*, 2004; JAISWAL *et al.*, 2009; SAVIO *et al.*, 1988).

Foi observada a atresia do FD próximo da remoção da P4 em 35% (6/17) das nulíparas, e em 18% (2/11) das múltíparas do Grupo OPU dos Experimentos 1 e 2, respectivamente. Nas múltíparas do Grupo BE não se observou nenhuma atresia do FD, porém nas nulíparas a atresia foi observada em uma fêmea próximo à remoção da P4 externa. O processo de estática folicular observado em ambos os experimentos, mas em maior intensidade no Experimento 1 (nulíparas), evidencia que a maior parte dos FD se desenvolveu rapidamente após a indução da nova onda folicular, com uma alta taxa de crescimento diária, que ficou evidente a partir da observação dos tempos e do tamanho do futuro FD nos eventos anteriores à remoção, que foram mais precoces, em tempo, e com futuros FDs maiores nas fêmeas demonstraram um comportamento de estática folicular. Este fenômeno foi mais presente nos Grupos OPU de ambos os experimentos, porém nas nulíparas com maior proporção, e possivelmente em maior intensidade, pois fêmeas do Grupo BE também apresentaram o mesmo fenômeno. A possível causa para este fato é que

o FD atingiu tamanho e maturidade satisfatórias, provavelmente, antes da remoção da P4. A permanência dos níveis de progesterona acarreta a atresia em fêmeas que falham em formar um FD/FPO e ovular (QUIRK *et al.*, 2004; STEVENSON & LAMB, 2016; STEVENSON & PULLEY, 2016; WILTBANK *et al.*, 2012). Neste estudo, a presença de P4 pode ter influenciado o crescimento do FD de nulíparas e multíparas que demonstraram o comportamento de estática folicular, reduzindo potencialmente o tamanho do FPO desta onda, como já demonstrado (GOMEZ-LEÓN *et al.*, 2019a; MARTINS *et al.*, 2014; STEVENSON & LAMB, 2016; WILTBANK *et al.*, 2012). Um dos possíveis motivos que justificaria a ocorrência deste fenômeno com uma maior prevalência nas nulíparas, é que esta categoria animal apresenta preponderantemente um padrão de dinâmica folicular com a formação de três ondas foliculares no intervalo interovularório (ADAMS *et al.*, 2008; FORDE *et al.*, 2011; FORTUNE, 1993; JAISWAL *et al.*, 2009). Portanto, esta categoria tende a apresentar um padrão de onda folicular mais curto, e conseqüentemente com a formação de FDs menores em um intervalo de tempo menor do que fêmeas com o padrão de duas ondas foliculares (ADAMS *et al.*, 2008; FORDE *et al.*, 2011; DRIANCOURT, 2000; GOMEZ-LEÓN *et al.*, 2019b; JAISWAL *et al.*, 2009). Desta forma, deve-se readequar a duração do período de permanência do inserto de progesterona em ambos os grupos que compuseram este experimento, talvez em 12 a 24 h, sobretudo para o Grupo OPU na categoria de nulíparas.

Em ambos os grupos (BE e OPU) e nos dois experimentos (Experimento 1 e 2), tanto o intervalo do estro como da ovulação após a remoção da fonte de P4 foram em média próximos às distribuições observadas nos trabalhos que utilizaram o CE como indutor de ovulação (SALES *et al.*, 2012; TORRES-JÚNIOR *et al.*, 2014; USLENGHI *et al.*, 2014). No Experimento 1, as nulíparas do Grupo OPU apresentaram os sinais de estro cerca de 12 horas após as nulíparas do Grupo BE. Este acontecimento pode estar associado ao rápido

crescimento folicular (taxa de crescimento) diário destas fêmeas, e do possível efeito deletério de um atraso na remoção da P4 possa ter causado nestes FDs (GOMEZ-LEÓN *et al.*, 2019a; MARTINS *et al.*, 2014; STEVENSON & LAMB, 2016; WILTBANK *et al.*, 2012). A observação de ovulações tardias não teve relação comprovada com o fenômeno estática folicular do FD, pois houve ovulações tardias (após 72 h) em fêmeas com ou sem a manifestação de tais características. Porém, o período de maior diferença entre os intervalos de tempo foi o intervalo P4-E, o que poderia estar associado a um efeito deletério da P4 nos eventos após a remoção da P4 e a aplicação de indutor de ovulação, mesmo que estas fêmeas não tenham sofrido o fenômeno de estática folicular do FD. As distribuições das ovulações ocorreram nas primeiras horas nas nulíparas devido à maior taxa de crescimento folicular diário, pelo fato do FPO já estar mais próximo de um tamanho responsivo ao LH (GIMENES *et al.*, 2008; HUNTER *et al.*, 2004; SARTORI *et al.*, 2001), com esta categoria apresentando normalmente um padrão de onda com uma duração mais curta do que as múltiparas (ADAMS *et al.*, 2008; FORDE *et al.*, 2011; FORTUNE, 1993; JAISWAL *et al.*, 2009). Mesmo com a observação em menor intensidade dos fenômenos de estática folicular e de ovulações tardias nas fêmeas múltiparas (Experimento 2), o efeito deletério da fonte de P4 possivelmente prejudicou estes animais nos eventos próximos e posteriores à remoção da P4 e aplicação do CE.

Historicamente, conceitos são revistos e descobertas são feitas, que nos levam ao aprimoramento das biotécnicas reprodutivas, pois o constante questionamento e a realização de novos experimentos com base nestas atualizações podem elucidar dúvidas que, até o presente momento, não tínhamos como saná-las. Portanto este trabalho visou a comparação de duas metodologias bem estabelecidas de indução a uma nova onda folicular, com o intuito de buscar informações adicionais acerca da fisiologia ovariana e da dinâmica folicular em resposta a intervenções que possam auxiliar na melhoria destes processos em prol das

diversas biotécnicas que utilizam estes procedimentos regularmente. No experimento com fêmeas nulíparas, o método hormonal (BE) apresentou falhas na indução de uma nova onda folicular, sem diferenças quanto ao número de fêmeas ovulando em comparação com o Grupo OPU (método físico). Esta categoria animal, e em especial o grupo da aspiração folicular, parece ter sofrido consequências negativas pela permanência mais prolongada do dispositivo de P4, o que possivelmente afetou o desenvolvimento de FD, reduzindo a taxa de ovulação. No experimento com as fêmeas múltíparas, houve uma menor diferença entre os grupos, não ocorrendo falhas na indução da nova onda folicular, com apenas duas vacas não ovulando ao final das observações, em cada grupo experimental. A permanência da P4 exógena também pode ter prejudicado esta categoria, porém em uma menor intensidade se comparada as nulíparas. Se considerarmos que o sucesso em protocolos de sincronização de estro e da ovulação inicia com a correta indução de uma nova onda folicular e subsequente ovulação do FPO, a taxa de ovulação dentro de uma janela fisiológica esperada, por conseguinte, representa tal sucesso. No Experimento 1, obtivemos uma taxa de ovulação de 58,8% nas nulíparas do Grupo BE, com 70,6% induzindo uma nova onda e 83,3% ovulando. No Grupo OPU obtivemos uma taxa de ovulação de 64,7% (100% induzidas e 64,7% ovulando). No Experimento 2, as taxas foram idênticas entre os grupos, já que 100% das múltíparas induziram uma nova onda e 81,8% ovularam em ambos os grupos, alcançando uma taxa de ovulação de 81,8%, o que corrobora com estudos anteriores em bovinos de corte (BARUSELLI *et al.*, 2017b; BÓ *et al.*, 2016). Futuros estudos deverão levar em conta ajustes no protocolo utilizado para que seja alcançado sucesso repetível, integral e previsível da indução da nova onda folicular de forma síncrona entre fêmeas nulíparas e múltíparas de corte.

7. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo nos permitem concluir que:

- a) Houve falhas na indução da sincronização da onda folicular ovariana pelo uso de benzoato de estradiol no início do protocolo hormonal de sincronização do estro e da ovulação em fêmeas nulíparas bovinas de corte cíclicas, mas não em fêmeas multíparas, o que reduziu a eficiência do protocolo em termos de taxa final de ovulação.
- b) A ablação folicular ovariana pela OPU induziu uma nova onda folicular em todas as fêmeas, e de forma temporalmente síncrona e homogênea, quando comparada ao uso de benzoato de estradiol em protocolos de sincronização do estro e da ovulação em fêmeas bovinas de corte nulíparas e multíparas cíclicas.
- c) A permanência ligeiramente mais prolongada (12 a 24 h) do inserto intravaginal de progesterona pode ter contribuído com a redução da taxa final de ovulação, em especial em fêmeas nulíparas e no grupo OPU, por causar a atresia ou um comportamento de estática folicular do FD, reduzindo o número de fêmeas que ovularam.

8. PERSPECTIVAS

As observações deste trabalho permitem reforçar o conhecimento de que ambos os métodos são eficientes na indução de uma nova onda folicular. Porém, confirmamos que há falhas no processo que permitem ainda uma margem para a melhoria da eficiência da indução. O método hormonal apresentou uma menor taxa de sucesso na categoria das nulíparas, mas novos experimentos deverão ser realizados, readequando o período de permanência do dispositivo de P4 e a aplicação de indutor de ovulação, para que se elimine este fator que pode ter influenciado nas respostas de todas as fêmeas em ambos os grupos e experimentos. O uso de protocolos hormonais é amplamente utilizado na prática, possuindo ótimos resultados, principalmente em protocolos de IATF e TETF. Porém, sob o ponto de vista da produção de embriões, seja *in vivo* ou *in vitro*, a necessidade de melhores resultados é premente, pois a variabilidade de resposta de doadoras aos protocolos de SOV permanece sendo um problema nas técnicas de MOET e OPU-PIV. Pequenas melhorias poderão se refletir em vantagens técnicas e econômicas. Devido ao alto valor genético, e por serem técnicas que demandam um maior investimento do que as outras, qualquer incremento na eficiência se torna economicamente justificável.

O grupo tem perspectivas de testar os grupos experimentais deste estudo em protocolos de SOV/MOET, após algumas modificações, conforme abaixo. Consideramos que, se obtivermos uma eficiência próxima de 100% na indução de uma nova onda folicular, síncrona entre as doadoras, e se iniciarmos o protocolo hormonal para superestimulação ovariana em tempo e dose adequados, deveremos observar uma diferença entre os dois métodos quanto ao número de fêmeas responsivas ao tratamento superovulatório e quanto ao número de estruturas viáveis coletadas ao final do procedimento. Readequações deverão ser realizadas na formação dos grupos, como por exemplo, pela segregação de fêmeas homogeneamente quanto à dinâmica folicular no início do protocolo hormonal, certificando-

se da presença das três categorias da dinâmica folicular (recrutamento, seleção e dominância) nos grupos experimentais, a fim de obtermos resultados que nos permitam verificar se existe efeito da fase da dinâmica na indução da onda subsequente, e no momento da nova emergência folicular. Da mesma forma, deveremos procurar realizar novos experimentos com um número maior de animais e/ou com repetições, invertendo os animais entre os grupos experimentais após devido tempo. Também, deve-se incluir nos estudos, se possível, a mensuração de hormônios, como o estradiol e a progesterona em momentos chave do protocolo experimental. Por fim, deve-se incluir a contagem de folículos antrais <5 mm (AFC, *antral follicle count*), incluindo uma possível mensuração de AMH como fator de seleção de fêmeas com maior potencial como doadoras, utilizando a contagem de folículos <5 mm como critério de seleção das fêmeas para os grupos experimentais.

A realização de experimentos testando as respostas destes dois métodos em protocolos de MOET/SOV e OPU-PIV, com e sem o uso do FSH, é outra possibilidade almejada pelo grupo. Outro aspecto se refere à associação dos métodos hormonal e físico, aplicando BE concomitante à ablação folicular, para verificar se é possível uma resposta mais efetiva e síncrona da indução de uma nova onda folicular. Por fim, expandir estas experimentações para bovinos leiteiros seria interessante, devido às particularidades fisiológicas e metabólicas destes animais, quando em níveis de produção de maiores demandas ao animal, em especial pelo enfoque no uso de hormônios não esteroides, à exceção da progesterona.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIEC, Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Beef Report – Perfil da Pecuária no Brasil, 2019. Disponível em: <http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2019/>
- ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H. & GINTHER; O.J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **J Reprod Fert**, v. 94, p. 177-188, 1992.
- ADAMS, G.P.; KOT, K. & GINTHER, O.J. Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. **Anim Reprod Sci**, v. 30, p. 259–271, 1993a.
- ADAMS, G.P.; KOT, K.; SMITH, C.A. & GINTHER, O.J. Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. **Can J Anim Sci**, v. 73, p. 267–275, 1993b.
- ADAMS, G.P.; JAISWAL, R.; SINGH, J. & MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 69, p. 72-80, 2008.
- ADONA, P.R.; MONZANI, P.S.; GUEMRA, S.; MIRANDA, M.S. & OHASHI, O.M. Oogenesis and folliculogenesis in mammals. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 15 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. **Reprod Dom Anim**, 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. **Reprod Dom Anim**, v. 45, p. 180–187, 2010b.
- ALILA, H.W. & HANSEL, W. Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. **Biol Reprod**, v. 31, p. 1015-1025, 1984.

- ALLEN, W.M. Physiology of the corpus luteum, V: The preparation and some chemical properties of progestin, a hormone of the corpus luteum which produces progestational proliferation. **Am J Physiol**, v. 92, p. 174–188, 1930.
- ALLEN, E. & DOISY, E.A. An ovarian hormone preliminary report on its location, extraction and partial purification, and action in test animals. **J Am Med Assoc**, v. 81, p. 819–821, 1923.
- ALLER, J.F.; MUCCI, N.C.; KAISER, G.G.; RÍOS, G.; CALLEJAS, S.S.; ALBERIO, R.H. Transvaginal follicular aspiration and embryo development in superstimulated early postpartum beef cows and subsequent fertility after artificial insemination. **Anim Reprod Sci**, v. 119, p. 1-8, 2010.
- ALLRICH, R.D. Endocrine and neural control of estrus in dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 77, p. 2738-2744, 1994.
- 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. **J. Anim. Sci.**, v. 78, p. 1291–1302, 2000.
- AMIRIDIS, G.S.; TSILIGIANNI, T. & VAINAS, E. Follicle ablation improves the ovarian response and the number of collected embryos in superovulated cows during the early stages of lactation. **Reprod Dom Anim**, v. 41, p. 402–407, 2006.
- AROSH, J.A.; BANU, S.K. & MCCRACKEN, J.A. Novel concepts on the role of prostaglandins on luteal maintenance and maternal recognition and establishment of pregnancy in ruminants. **J Dairy Sci**, v. 99, p. 1–15, 2016.
- 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. **Biol Reprod**, v. 64, p. 839–848, 2001.
- BAKER, T.G. & HUNTER, R.H.F. Oogenesis and follicular growth in the cow: implications for superovulation. In: Sreenan J.M. (Ed.), **Control of Reproduction in the Cow. CEC Publications**, Luxembourg, p. 34–49, 1978.
- BAO, B. & GARVERICK, H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotrophin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **J Anim Sci**, v. 76, p. 1466–1473, 1998.
- BARACALDO, M.I.; MARTINEZ, M.; ADAMS, G.P. & MAPLETOFT, R.J. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. **Theriogenology**, v. 53, p. 1239–1250, 2000.
- BARROS, C.M. & NOGUEIRA, M.F. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1483–1496, 2001.
- BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U. & SALES, J.N.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 31, p. 205-211, 2007.
- BARUSELLI, P.S.; FERREIRA, R.M.; SALES, J.N.S.; GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; MARTINS, C.M.; RODRIGUES, C.A. & BÓ, G.A. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. **Theriogenology**, v. 76, p. 1583–1593, 2011.
- BARUSELLI, P.S.; SÁ FILHO, M.F.; FERREIRA, R.M.; SALES, J.N.S.; GIMENES, L.U.; VIEIRA, L.M.; MENDANHA, M.F. & BÓ, G.A. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. **Reprod Dom Anim**, v. 47, p. 134–141, 2012.
- BARUSELLI, P.S.; BATISTA, E.O.S.; VIEIRA, L.M.; FERREIRA, R.M.; GUERREIRO, B.G.; BAYEUX, B.M.; SALES, J.N.S.; SOUZA, A.H. & GIMENES, L.U. Factors that

- interfere with oocyte quality for *in vitro* production of cattle embryos: effects of different developmental & reproductive stages. **Anim Reprod**, v. 13, p. 264-272, 2016.
- BARUSELLI, P.S.; BATISTA, E.O.S.; VIEIRA, L.M.; SALES, J.N.S.; GIMENES, L.U. & FERREIRA, R.M. Intrinsic and extrinsic factors that influence ovarian environment and efficiency of reproduction in cattle. **Anim Reprod**, v. 14, p. 48-60, 2017a.
- BARUSELLI, P.S.; FERREIRA, R.M.; COLLI, M.H.A.; ELLIFF, F.M.; SÁ FILHO, M.F.; VIEIRA, V. & FREITAS, B.G. Timed artificial insemination: current challenges and recent advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. **Anim Reprod**, v. 14, p. 558-571, 2017b.
- BARUSELLI, P.S.; CATUSSI, B.L.C.; ABREU, L.Â.; ELLIFF, F.M.; SILVA, L.G.; BATISTA, E.S. & CREPALDI, G.A. Evolução e perspectivas da inseminação artificial em bovinos. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 43, p. 308-314, 2019.
- BEG, M.A. & GINTHER, O.J. Follicle selection in cattle and horses: Role of intrafollicular factors. **Reproduction**, v. 132, p. 365–377, 2006.
- BERGFELD, E.G.; KOJIMA, F.N.; WEHRMAN, M.E.; CUPP, A.S.; PETERS, K.E.; MARISCAL, V.; SANCHEZ, T.; KITTOK, R.J.; GARCIA-WINDER, M. & KINDER, J.E. Frequency of luteinizing hormone pulses and circulating 17 β -oestradiol concentration in cows is related to concentration of progesterone in circulation when the progesterone comes from either an endogenous or exogenous source. **Anim Reprod Sci**, v. 37, p. 257-265, 1995.
- BERGFELT, D.R.; LIGHTFOOT, K.C. & ADAMS, G.P. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. **Theriogenology**, v. 42, p. 895–907, 1994.

- BERGFELT, D.R.; BÓ, G.A.; MAPLETOFT, R.J. & ADAMS, G.P. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the estrous cycle in cattle. **Anim Reprod Sci**, v. 49, p. 1–12, 1997a.
- BERGFELT, D.R.; SMITH, C.A.; ADAMS, G.P. & GINTHER, O.J. Surges of FSH during the follicular and early luteal phases of the estrous cycle in heifers. **Theriogenology**, v. 48, p. 757-768, 1997b.
- BERGFELT, D.R.; KULICK, L.J.; KOT, K. & GINTHER, O.J. Follicular and hormonal response to experimental suppression of FSH during follicle deviation in cattle. **Theriogenology**, v. 54, p. 1191–206, 2000.
- BERGFELT, D.R.; SEGO, L.H.; BEG, M.A. & GINTHER, O.J. Calculated follicle deviation using segmented regression for modeling diameter differences in cattle. **Theriogenology**, v. 59, p. 1811-1825, 2003.
- BERNAL, B.; REVOL, J.; OVIEDO, J.M.; TRIBULO, A.; TRIBULO, H.; MOREIRA, G. & BÓ, G.A. Influence of breed and season on *in vitro* embryo production. **Reprod Fertil Dev**, v. 28, p. 255 (Abstract), 2016.
- BERNARD, C.; VALET, J.P.; BELAND, R. & LAMBERT, R.D. Prediction of bovine ovulation by a rapid radioimmunoassay for plasma LH. **J Reprod Fertil**, v. 68, p. 425-430, 1983.
- BERTOLINI, M. & BERTOLINI, L.R. Advances in reproductive technologies in cattle: from artificial insemination to cloning. **Rev Med Vet Zoot**, v. 56, p. 184-194, 2009.
- BETTERIDGE, K.J. A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. **Anim Reprod Sci**, v. 79, p. 203-244, 2003.
- BIGELOW, K.L. & FORTUNE, J.E. Characteristics of prolonged dominant versus control follicles: follicle cell numbers, steroidogenic capabilities, messenger ribonucleic acid for steroidogenic enzymes. **Biol Reprod**, v. 58, p. 1241–1249, 1998.

- 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. **Anim Reprod**, v. 11, p.246-253, 2014.
- BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; BARNES, F. & SIRARD, M-A. Manipulation of Follicular Development to Produce Developmentally Competent Bovine Oocytes. **Biol Reprod**, v. 66, p. 38–43, 2002.
- BÓ, G.A. & MAPLETOFT, R.J. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. **Theriogenology**, v. 81, p. 38–48, 2014.
- BÓ, G.A.; PIERSON, R.A. & MAPLETOFT, R.J. The effect of estradiol valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cows with Syncro Mate B implants. **Theriogenology**, v. 36, p. 169–183, 1991.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; NASSER, L.F.; PIERSON, R.A. & MAPLETOFT, R.J. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. **Theriogenology**, v. 40, p. 225–239, 1993.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; TRÍBULO, H.E.; CACCIA, M. & MAPLETOFT, R.J. Follicular wave dynamics after estradiol-17b treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v. 41, p. 1555–1569, 1994a.
- BÓ, G.A.; CACCIA, M.; MARTÍNEZ, M.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A. & MAPLETOFT, R.J. The use of estradiol-17 β and progestogen treatment for the control of follicular wave emergence in beef cattle. **Theriogenology**, v. 41, p. 165, 1994b.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A. & MAPLETOFT, R.J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v. 43, p. 31–40, 1995a.

- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; CACCIA, M.; MARTÍNEZ, M.; PIERSON, R.A. & MAPLETOFT, R.J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Anim Reprod Sci**, v. 39, p. 193-204, 1995b.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A. & MAPLETOFT, R.J. Effect of progestogen plus estradiol-17 β treatment on superovulatory response in beef cattle. **Theriogenology**, v. 45, p. 897-910, 1996.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRIBULO, R.; TRIBULO, H. & MAPLETOFT, R.J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 53-72, 2002.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S. & MARTÍNEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 78, p. 307–326, 2003.
- BÓ, G.A.; PERES, L.C.; CUTAIA, L.E.; PINCINATO, D.; BARUSELLI, P.S. & MAPLETOFT, R.J. Treatments for the synchronisation of bovine recipients for fixed-time embryo transfer and improvement of pregnancy rates. **Reprod Fertil Dev**, v. 24, p. 272–277, 2012.
- BÓ, G.A.; DE LA MATA, J.J.; BARUSELLI, P.S. & MENCHACA, A. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. **Theriogenology**, v. 86, p. 388–396, 2016.
- BÓ, G.A.; HUGUENINE, E.; DE LA MATA, J.J.; NÚÑEZ-OLIVERA, R. BARUSELLI, P.S. & MENCHACA, A. Programs for fixed-time artificial insemination in South American beef cattle. **Anim Reprod**, v. 15, (Suppl.1), p. 952-962, 2018.
- BÓ, G.A.; CEDEÑO, A. & MAPLETOFT, R.J. Strategies to increment *in vivo* and *in vitro* embryo production and transfer in cattle. **Anim Reprod**, v.16, n.3, p.411-422, 2019.

- BODENSTEINER, K.J.; WILTBANK, M.C.; BERGFELT, D.R. & GINTHER, O.J. Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. **Theriogenology**, v. 45, p. 499–512, 1996.
- BOLAND, M.P.; GOULDING, D. & ROCHE, J.F. Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. **Theriogenology**, v. 35, p. 5–17, 1991.
- BOYD, W.L. A study of the physiologic and pathologic changes occurring in the reproductive organs of the cow following parturition. In: **Technical Bulletin, The University of Minnesota**, n. 23, p. 3-39, 1925.
- BRAW-TAL, R. & YOSSEFI, S. Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **J Reprod Fertil**, v. 109, p. 165–171, 1997.
- BREWSTER, J.E. & COLE, C.L. The time of ovulation in cattle. **J Dairy Sci**, v. 21, p. 111–115, 1941.
- BRIDGES, P.J.; LEWIS, P.E.; WAGNER, W.R. & INSKEEP, E.K. Follicular growth, estrus and pregnancy after fixed-time insemination in beef cows treated with intravaginal progesterone inserts and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 52, p. 573–583, 1999.
- BRITT, J.H.; KITTOK, R.J. & HARRISON, D.S. Ovulation, estrus and endocrine response after GnRH in early postpartum cows. **J Anim Sci**, v. 39, p. 915–919, 1974.
- BROADBENT, P.J.; STEWART, M. & DOLMAL, D. F. Recipient management and embryo transfer. **Theriogenology**, v. 35, p. 125–139, 1991.
- BURATINI JR., J.; PRICE, C.A.; VISINTIN, J.A. & BÓ, G.A., Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, v. 54, p. 421–432, 2000.

- BURKE, C.R.; MUSSARD, M.L.; GRUM, D.E. & DAY, M.L. Effects of maturity of the potential ovulatory follicle on induction of oestrus and ovulation in cattle with oestradiol benzoate. **Anim Reprod Sci**, v. 66, p. 161–174, 2001.
- BYSKOV, A.G.; SKAKKEBAEK, N.E.; STAFANGER, G. & PETERS, H. Influence of ovarian surface epithelium and *rete ovarii* on follicle formation. **J Anat**, v. 123, p. 77–86, 1977.
- 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.
- CASIDA, L.E. The preparation, properties and use of gonadstimulating hormones. **J Dairy Sci**, v. 21, p. 101–108, 1938.
- CASTILHO, C.; GARCIA, J.M.; RENESTO, A.; NOGUEIRA, G.P. & BRITO, L.F. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 98, p. 189–196, 2007.
- CHENOWETH, P.J. Aspects of reproduction in female *Bos indicus* cattle: a review. **Austr. Vet. J.**, v. 71, p. 422-426, 1994.
- CHRISTENSON, R.K.; ECHTERNKAMP, S.E. & LASTER, D.B. Oestrus, LH, ovulation and fertility in beef heifers. **J Reprod Fertil**, v. 43, p. 543-546, 1975.
- CHUN, S.Y.; EISENHAUER, K.M.; MINAMI, S.; BILLIG, H.; PERLAS, E. & HSUEH, A.J. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. **Endocrinology**, v. 137, p. 1447-1456, 1996.
- CIRIT, Ü.; ÖZMEN, M.F.; KÜÇÜKASLAN, İ.; MEHMET KÖSE, M.; KUTSAL, H.G. & ÇINAR, E.M. Effect of the interval from follicle aspiration to initiation of lengthened

- FSH treatment on follicular superstimulatory and superovulatory responses and embryo production in lactating Simmental cows. **Theriogenology**, v. 128, p. 218–224, 2019.
- COLAZO, M.G.; MARTÍNEZ, M.F.; SMALL, J.A.; KASTELIC, J.P.; BURNLEY, C.A. WARD, D.R. & MAPLETOFT, R.J. Effect of estradiol valerate on ovarian follicle dynamics and superovulatory response in progestin-treated cattle. **Theriogenology**, v. 63, p. 1454–1468, 2005.
- CUPP, A.S.; STUMPF, T.T.; KOJIMA, F.N.; WERTH, L.A.; WOLFE, M.W.; ROBERSON, M.S.; KITTOCK, R.J. & KINDER, J.E. Secretion of gonadotrophins change during the luteal phase of the bovine oestrous cycle in the absence of corresponding changes in progesterone or 17 β -oestradiol. **Anim Reprod Sci**, v. 37, p. 109-119, 1995.
- D'OCCHIO, M.J.; BARUSELLI, P.S. & CAMPANILE, G. Influence of nutrition, body condition, and metabolic status on reproduction in female beef cattle: A review. **Theriogenology**, v. 125, p. 277–284, 2019.
- DE ALBA, J. & ASDELL, S.A. Estrous behavior and hormones in the cow. **J Comp Psychol**, v. 39, p. 119–123, 1946.
- DISKIN M.G.; AUSTIN, E.J. & ROCHE, J.F. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. **Dom Anim Endocrinol**, v. 23, p. 211–228, 2002.
- DOWNEY, B.R. Regulation of the estrous cycle in domestic animals a review. **Can Vet J**, v. 21, p. 301-306, 1980.
- DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, v. 35, p. 55–68, 1991.
- DRIANCOURT, M.A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, p. 1211-1239, 2001.

- DURLINGER, A.L.L.; KRAMER, P.; KARELS, B.; DE JONG, F.H.; UILENBROEK, J.T.J.; GROOTEGOED, J.A. & THEMME, A.P.N. Control of primordial follicle recruitment by anti-müllerian hormone in the mouse ovary. **Endocrinology**, v. 140, p. 5789–5796, 1999.
- DURLINGER, A.L.L.; GRUIJTERS, M.J.G.; KRAMER, P.; KARELS, B.; KUMAR, T.R.; MATZUK, M.M.; ROSE, U.M.; DE JONG, F.H.; UILENBROEK, J.T.J.; GROOTEGOED, J.A. & THEMME, A.P.N. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. **Endocrinology**, v. 142, p. 4891–4899, 2001.
- DURLINGER, A.L.L.; GRUIJTERS, M.J.G.; KRAMER, P.; KARELS, B.; INGRAHAM, H.A.; NACHTIGAL, M.W.; UILENBROEK, J.T.J.; GROOTEGOED, J.A. & THEMME, A.P.N. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. **Endocrinology**, v. 143, p. 1076–1084, 2002.
- ELSDEN, R.P.; NELSON, L.D. & SEIDEL JR., G.E. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. **Theriogenology**, v. 9, p. 17-26, 1978.
- ERICKSON, B.H. Development and senescence of the post natal bovine ovary. **J Anim Sci**, v. 25, p. 800–805, 1966.
- EVANS, A.C.O. & FORTUNE, J.E. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. **Endocrinology**, v. 138, p. 2963-2971, 1997.
- FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Anim Reprod Sci**, v. 78, p. 203–216, 2003.
- FAIR, T.; HULSHOF, S.C.J.; HYTTEL, P.; BOLAND, M. & GREVE, T. Bovine oocyte ultrastructure in primordial to tertiary follicles. **Anat Embryol**, v. 195, p. 327–336, 1997.

FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Databases.

Live Animals. Disponível em : <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA>

FEVOLD, H.L.; HISAW, F.L. & LEONARD, S.L. The gonad stimulating and the luteinizing hormones of the anterior lobe of the hypophysis. **Am J Physiol**, v. 97, p. 291–301, 1931.

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. **Anim Reprod**, v. 15 (Suppl.1), p. 648-659, 2018.

FINEGAN, T.M. & BERGSTRALH, D.T. Gametogenesis: germ cells aren't just along for the ride. **Current Biol**, 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. **Anim Reprod Sci**, v. 124, p. 163–169, 2011.

FORTUNE, J.E. Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: A limiting factor in improvement of fertility? **Anim Reprod Sci**, v. 33, p. 111-125, 1993.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biol Reprod**, v. 50, p. 225-232, 1994.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; EVANS, A.C.O. & TURZILLO, A.M. Differentiation of Dominant Versus Subordinate Follicles in Cattle. **Biol Reprod**, v. 65, p. 648–654, 2001.

FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Anim Reprod Sci**, v. 78, p. 135–163, 2003.

- FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M. & YANG, Y. Follicular development: The role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Anim Reprod Sci**, v. 82-83, p. 109–126, 2004.
- GALINA, C.S. & ARTHUR, G.H. Review on cattle reproduction in the tropics. Part 4. Oestrus cycles. **Anim. Breed**, v. 58, p. 697–707, 1990.
- GAMBINI, A.L.G.; MOREIRA, M.B.P.; CASTILHO, C. & BARROS, C.M. Follicular development and synchronization of ovulation in Gir cows. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 22, p. 201–210, 1998.
- GARCIA, A. & SALAHEDDINE, M. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. **Theriogenology**, v. 50, p. 575-585, 1998.
- GARVERICK, H.A. & SMITH, M.F. Female reproductive physiology and endocrinology of cattle. **Vet Clin North Am: Food Animal Practice**, v. 9, p. 223-247, 1993.
- GARVERICK, H.A.; BAXTER, G.; GONG, J.; ARMSTRONG, D.; CAMPBELL, B.; GUTIERREZ, C. & WEBB, R. Regulation of expression of ovarian mRNA encoding steroidogenic enzymes and gonadotrophin receptors by FSH and GH in hypogonadotrophic cattle. **Reproduction**, v. 123, p. 651–661, 2002.
- GHETTI, A.M.; SIQUEIRA, L.G.B.; ARASHIRO, E.K.N.; PALHÃO, M.P.; BRANDÃO, F.Z. & VIANA, J.H.M. Characterization of blood flow and the effects of exogenous estradiol benzoate on residual follicles formed after ultrasoundguided transvaginal follicle aspiration in cattle. **J Anim Sci Biotech**, v. 7, p. 1-6, 2016.
- 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. **Biol Reprod**, v. 57, p. 1066-1073, 1997.

- GIBBONS, J.R.; WILTBANK, M.C. & GINTHER, O.J. Relationship between follicular development and the decline in the follicle-stimulating hormone surge in heifers. **Biol Reprod**, v. 60, p. 72–77, 1999.
- 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.
- GIMENES, L.U.; FERRAZ, M.L.; ARAÚJO, A.B.; FANTINATO NETO, P.; CHIARATTI, M.R.; MESQUITA, L.G.; ARANGO, J.S.P.; RAPOSO, M.; SOUZA, D.C.; CALOMENI, G.D.; GARDINAL, R.; RODRIGUEZ, C.L.V.; TRINCA, L.A.; MEIRELLES, F.V. & BARUSELLI, P.S. OPU at different times of a synchronized follicular wave did not affect IVP in *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Bubalus bubalis*. **Reprod Fertil Dev**, v. 22, p. 293 (abstract), 2010.
- GINTHER, O.J. The theory of follicle selection in cattle. **Dom Anim Endocrinol**, v. 57, p. 85-99, 2016.
- GINTHER, O.J.; KASTELIC, J.P. & KNOPF, L. Composition and Characteristics of Follicular Waves during the Bovine Estrous Cycle. **Anim Reprod Sci**, v. 20, p. 187-200, 1989a.
- GINTHER, O.J.; KNOPF, L. & KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and three follicular waves. **J Reprod Fert**, v. 87, p. 223-230, 1989b.
- GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBONS, J.R. & KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biol Reprod**, v. 55, p. 1187–1194, 1996.

- GINTHER, O.J.; KOT, K.; KULICK L.J. & WILTBANK, M.C. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v. 48, p. 75–87, 1997.
- GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; KULICK, L.J. & KOT, K. Pulsatility of systemic FSH and LH concentrations during follicular-wave development in cattle. **Theriogenology**, v. 50, p. 507–519, 1998.
- GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; KULICK, L.J. & KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, v. 52, p. 1079–1093, 1999.
- GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; KULICK, L.J. & KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles. **Biol Reprod**, v. 62, p. 920-927, 2000a.
- GINTHER O.J.; BERGFELT, D.R.; KULICK L.J. & KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. **Biol Reprod**, v. 63, p. 383–389, 2000b.
- GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; BEG, M.A. & KOT, K. Follicle selection in cattle: relationship among growth rate, diameter ranking, and capacity for dominance. **Biol Reprod**, v. 65, p. 345–350, 2001a.
- GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; DONADEU, F.X. & KOT, K. Follicle Selection in Monovular Species. **Biol Reprod**, v. 65, p. 638–647, 2001b.
- GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; DONADEU, F.X. & BERGFELT, D.R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Anim Reprod Sci**, v. 78, p. 239-257, 2003.
- GINTHER, O.J.; FUENZALIDA, M.J.; SHRESTHA, H.K. & BEG, M.A. The transition between preluteolysis and luteolysis in cattle. **Theriogenology**, v. 75, p. 164–171, 2011.
- GINTHER, O.J.; SIDDIQUI, M.A.R.; BALDRIGHI, J.M.; WOLF, C.A. & GREENE, J.M. Differences between follicular waves 1 e 2 in patterns of emergence of 2-mm follicles,

- associated FSH surges, and ovarian vascular perfusion in heifers. **Theriogenology**, v. 84, p. 853-861, 2015.
- GINTHER, O.J.; BALDRIGHI, J.M.; SIDDIQUI, M.A.R. & ARAUJO, E.R. Complexities of follicle deviation during selection of a dominant follicle in *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 86, p. 2012-2019, 2016a.
- GINTHER, O.J.; SIDDIQUI, M.A.R.; BALDRIGHI, J.M.; WOLF, C.A. & CASTRO, T. Temporality of two-way functional coupling between FSH and follicles in heifers. **Theriogenology**, v.86, p. 1645-1653, 2016b.
- GINTHER, O.J.; 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, O.J.; 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.
- GOMEZ-LEÓN, V.E.; GINTHER, O.J.; GUIMARÃES, J.D. & WILTBANK, M.C. Hormonal mechanisms regulating follicular wave dynamics II: Progesterone decreases diameter at follicle selection regardless of whether circulating FSH or LH are decreased or elevated. **Theriogenology**, v. 143, p. 148-156, 2019a.
- GOMEZ-LEÓN, V.E.; GINTHER, O.J.; ARAUJO, E.R.; GUIMARÃES, J.D. & WILTBANK, M.C. Hormonal mechanisms regulating follicular wave dynamics I: Comparison of follicle growth profiles under different physiological conditions in heifers. **Theriogenology**, v. 123, p. 194–201, 2019b.
- GONÇALVES, R.L.R. & VIANA, J.H.M., Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo. **Rev Bras Reprod Anim**, v.43, p. 156-159, 2019.

- GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. 2nd Edition. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2003, 548pp.
- GRUNERT, E. & BERCHTOLD, M. **Infertilidad en la Vaca**. 1ª ed. Buenos Aires: Hemisfério Sur, 1988. 475p.
- HAMMOND, J. III. The Oestrous Cycle. *In: The Physiology of Reproduction in the Cow*. p 9. Cambridge University Press, London, 1927.
- HANSEL, W. & CONVEY, E.M. Physiology of the estrous cycle. **J Anim Sci**, v. 57, p. 404-424, 1983.
- HASLER, J.F. Bovine embryo transfer: are efficiencies improving? In: APPLIED REPRODUCTIVE STRATEGIES IN BEEF CATTLE, I. August 5th & 6th, Nashville, TN, **Proc Appl Reprod Strat Conf**, p. 265-282, 2010.
- HASLER, J.F. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. **Theriogenology**, v.81, p. 152–169, 2014.
- HODGEN, G.D. The dominant ovarian follicle. **Fert Steril**, v. 39, p. 54-73, 1982.
- HULSHOF, S.C.J.; BEVERS, M.M.; VAN DER DONK, H.A. & VAN DEN HURK, R. The isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. In: **Proc 12th Int Cong Anim Reprod**, vol. 1, The Hague, pp. 336–338, 1992.
- HUNTER, M.G.; ROBINSON, R.S.; MANN, G.E. & WEBB, R. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. **Anim Reprod Sci**, v. 82-83, p. 461–477, 2004.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Censo Agropecuário, 2017 – Resultados Definitivos. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=73096>

- 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. **J Dairy Sci**, v. 83, p. 1648–1658, 2000.
- IRELAND, J.J.; WARD, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J.L.H.; SMITH, G.W.; LONERGAN, P. & EVANS, A.C.O. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human Reprod**, v. 22, p. 1687–1695, 2007.
- ISMAIL, Z.B. Epidural analgesia in cattle, buffalo, and camels. **Vet World**, v. 9, p. 1450-1455, 2016.
- JAISWAL, R.S.; SINGH, J. & ADAMS, G.P. Developmental pattern of small antral follicles in the bovine ovary. **Biol Reprod**, v. 71, p. 1244-1251, 2004.
- JAISWAL, R.S.; SINGH, J.; MARSHALL, L. & ADAMS, G.P. Repeatability of 2-wave and 3-wave patterns of ovarian follicular development during the bovine estrous cycle. **Theriogenology**, v. 72, p. 81–90, 2009.
- JOLLY, P.D.; TISDALL, DJ.; HEATH, D.A.; LUN, S. & McNATTY, K.P. Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and follicular atresia. **Biol Reprod**, v. 51, p. 934-944, 1994.
- 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. **Anim Reprod**, v. 15, p. 180-190, 2018.
- KAIPIA, A. & HSUEH, A.J.W. Regulation of ovarian follicle atresia. **Annu Rev Physiol**, v. 59, p. 349–363, 1997.

- KIM, I.H.; SON, D.S.; YEON, S.H.; CHOI, S.H.; PARK, S.B.; RYU, I.S.; SUH, G.H.; LEE, D.W.; LEE, C.S. LEE, H.J. & YOON, J.T. Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in holstein cows. **Theriogenology**, v. 55, p. 937-945, 2001.
- KNOPF, L.; KASTELIC, J.P.; SCHALLENBERGER, E. & GINTHER, O.J. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. **Domest Anim Endocrinol**, v. 6, p. 111–119, 1989.
- KO, J.C.H.; KASTELIC, J.P.; DEL CAMPO, M.R. & GINTHER, O.J. Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. **J Reprod Fertil**, v. 91, p. 511-519, 1991.
- KOJIMA, F.N. The Estrous cycle in cattle: Physiology, endocrinology, and follicular waves. **Prof Anim Scient**, v. 19, p. 83-95, 2003.
- KULICK, L.J.; KOT, K.; WILTBANK, M.C. & GINTHER, O.J. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. **Theriogenology**, v. 52, p. 913-921, 1999.
- LAMB, G.C. & MARCADANTE, V.R.G. Synchronization and artificial insemination strategies in beef cattle. **Vet Clin North Am: Food Anim Pract**, v. 32, p. 335–347, 2016.
- LAMOTHE, P.; BOUSQUET, D. & GUAY, P. Cyclic variation of F prostaglandins in the uterine fluids of the cow. **J Reprod Fertil**, v. 50, p. 381–382, 1977.
- LANDRY, D.A.; BELLEFLEUR, A-M.; LABRECQUE, R.; GRAND, F-X.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P. & SIRARD, M-A. Effect of cow age on the *in vitro* developmental competence of oocytes obtained following FSH stimulation/coasting treatments. **Theriogenology**, v. 86, p. 1240–1246, 2016.

- LAUDERDALE, J.W.; SEGUIN, B.E.; STELLFLUG, J.N.; CHENAULT, J. R.; THATCHER, W.W.; VINCENT, C.K. & LOYANCANO, A.F. Fertility of cattle following PGF_{2α} injection. **J Anim Sci**, v. 38, p. 964–967, 1974.
- LIMA, W.M.; VIEIRA, A.D.; THALLER NETO, A.; MEZZALIRA, A.; MATOS, R.C. & GREGORY, R.M. Improved superovulatory response in beef cattle following ovarian follicular ablation using a simplified transvaginal device. **Anim Reprod Sci**, v. 100, p. 364–370, 2007.
- LONERGAN, P. State-of-the-art embryo technologies in cattle. **Soc Reprod Fertil Suppl**, v. 64, p. 315-325, 2007.
- LUCY, M.C.; SAVIO, J.D.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R.L. & THATCHER, W.W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **J Anim Sci**, v. 70, p. 3615-3626, 1992.
- LUCY, M.C. The bovine dominant ovarian follicle. **J Anim Sci**, v. 85, p. E89–E99, 2007.
- LUSSIER, J.G.; MATTON, P., & DUFOUR, J.J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **J Reprod Fertil**, 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.
- MACMILLAN, K.L. & PETERSON, A.J. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for oestrus synchronization, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anoestrus. **Anim Reprod Sci**, v. 33, p. 1–25, 1993.
- MACMILLAN, K.L.; TAUFA, V.K.; BARNES, D.R. & DAY, A.M. Plasma progesterone concentrations in heifers and cows treated with a new intravaginal device. **Anim Reprod Sci**, v. 26, p. 25–40, 1991.

- MACMILLAN, K.L.; TAUFU, V.K. & DAY, A.M. Combination treatments for synchronising oestrus in dairy heifers. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, vol. 53, p. 267–270, 1993.
- 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.
- MAPLETOFT, R.J. History and perspectives on bovine embryo transfer. **Anim Reprod**, v. 10, p. 168-173, 2013.
- MAPLETOFT, R.J. & BÓ, G.A. The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. **Reprod Fertil Dev**, v. 24, p. 278-283, 2012.
- MAPLETOFT, R.J. & BÓ, G.A. Innovative strategies for superovulation in cattle. **Anim. Reprod.**, v.10, p.174-179, 2013.
- MAPLETOFT, R.J.; COLAZO, M.G.; MARTÍNEZ, M.F. & KASTELIC, J.P. Estrogen esters to synchronize follicular wave emergence and ovulation in cidr-treated cattle. **Proc Annu Conv Am Embryo Transfer Assoc**, p. 27-28, 2002.
- 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. **Anim Reprod**, v.15 (Suppl.1), p.1003-1014, 2018.
- 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. **Anim Reprod Sci**, v. 86, p. 37–52, 2005.
- 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 Nellore heifers. **Theriogenology**, v. 81, p. 446–453, 2014.
- MAUER, R.E.; WEBEL, S.K. & BROWN, M.D. Ovulation control in cattle with progesterone intravaginal device (PRID) and gonadotropin releasing hormone (GnRH). **Ann Biol Anim Bioch Bioph**, v. 15, p.291-296, 1975.
- MCCARREY, J.R. Gametogenesis: gametogenesis overview. **Encycl Reprod**, v. 3, p. 2-4, 2018.
- MEIKLE, A.; BRUN, V.; CARRIQUIRY, M.; SOCA, P.; SOSA, C.; ADRIEN, M.L.; CHILIBROSTE, P. & ABECIA, J.A. Influences of nutrition and metabolism on reproduction of the female ruminant. **Anim Reprod**, v. 15 (Suppl.1), p. 899-911, 2018.
- MELLO, R.R.C.; FERREIRA, J.E.; SILVA, A.P.T.B.; MELLO, M.R.B. & PALHANO, H.B. Desenvolvimento folicular inicial em bovinos. **Rev Bras Reprod Anim**, v.37, p. 328-333, 2013.
- MIHM, M. & AUSTIN, E.J. The final stages of dominant follicle selection in cattle. **Dom Anim Endocrinol**, v. 23, p. 155–166, 2002.
- MIHM, M. & BLEACH, E.C.L. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. **Anim Reprod Sci**, v. 78, p. 217–237, 2003.
- MIHM, M.; GOOD, T.E.M.; IRELAND, J.L.H.; IRELAND, J.J.; KNIGHT, P.G. & ROCHE, J.F. Decline in serum follicle-stimulating hormone concentrations alters key intrafollicular growth factors involved in selection of the dominant follicle in heifers. **Biol Reprod**, v. 57, p. 1328–1337, 1997.
- MIHM, M.; BAKER, P.J.; IRELAND, J.L.H.; SMITH, G.W.; COUSSENS, P.M.; EVANS, A.C.O. & IRELAND, J.J. Molecular evidence that growth of dominant follicles involves

- a reduction in follicle-stimulating hormone dependence and an increase in luteinizing hormone dependence in cattle. **Biol Reprod**, v. 74, p. 1051–1059, 2006.
- MIKKOLA, M. & TAPONEN, J. Embryo yield in dairy cattle after superovulation with Folltropin or Pluset. **Theriogenology**, v. 88, p. 84–88, 2017.
- MIKKOLA, M., HASLER, J.F. & TAPONEN, J. Factors affecting embryo production in superovulated *Bos taurus* cattle. **Reprod Fertil Dev**, v. 32, p. 104–124, 2020.
- MILVAE, R.A.; HINCKLEY, S.T. & CARLSON, J.C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v. 45, p. 1327-1349, 1996.
- 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 Sci Vet**, v. 35, p. 958, 2007. [abstract]
- MONNIAUX, D. Factors influencing establishment of the ovarian reserve and their effects on fertility. **Anim Reprod**, v.15 (Suppl.1), p. 635-647, 2018.
- MONTEIRO JR., P.L.J.; BORSATO, M.; SILVA, F.L.M.; PRATA, A.B.; WILTBANK, M.C. & SARTORI, R. Increasing estradiol benzoate, pretreatment with gonadotropin-releasing hormone, and impediments for successful estradiol-based fixed-time artificial insemination protocols in dairy cattle. **J Dairy Sci**, v. 98, p. 1–14, 2015.
- MOORE, K. & THATCHER, W.W. Major advances associated with reproduction in dairy cattle. **J Dairy Sci**, v.89, p.1254-1266, 2006.
- MOORE, S.G. & HASLER, J.F. A 100-Year Review: reproductive technologies in dairy science. **J Dairy Sci**, v. 100, p.10314-10331, 2017.
- MOSSA, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; SCHEETZ, D.; WEBER-NIELSEN, M.; EVANS, A.C.O. & IRELAND, J.J. Anti-Müllerian Hormone (AMH) and fertility management in agricultural species. **Reproduction**, v. 154, p. R1–R11, 2017.

- NALBANDOV, A. & CASIDA, L.E. Ovulation and its relation to estrus in cows. **J Anim Sci**, v. 1, p. 189-198, 1942.
- NISWENDER, G.D.; JUENGEL, J.L.; MCGUIRE, W.J.; BELFIORE, C.J. & WILTBANK, M.C. Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. **Biol Reprod**, v. 50, p. 239-247, 1994.
- NISWENDER, G.D.; JUENGEL, J.L.; SILVA, P.J.; ROLLYSON, M.K. & MCINTUSH, E.W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiol Rev**, v. 80, p. 1-29, 2000.
- NIVET, A-L.; BUNEL, A.; LABRECQUE, R.; BELANGER, J.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P. & SIRARD, M-A. FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. **Reproduction**, v. 143, p. 165–171, 2012.
- O'ROURKE, M.; DISKIN, M.G.; SREENAN, J.M. & ROCHE, J.F. The effect of dose and route of oestradiol benzoate administration on plasma concentrations of oestradiol and FSH in long-term ovariectomized heifers. **Anim Reprod Sci**, v. 59, p. 1–12, 2000.
- OLIVEIRA, L.H.; SANCHES, C.P.; SEDDON, A.S.; VERAS, M.B.; LIMA, F.A.; MONTEIRO JR, P.L.J.; WILTBANK, M.C. & SARTORI, R. *Short communication*: Follicle superstimulation before ovum pick-up for *in vitro* embryo production in Holstein cows. **J Dairy Sci**, v. 99, p. 1–6, 2016.
- ONGARATTO, F.L.; CEDEÑO, A.V.; RODRIGUEZ-VILLAMIL, P. TRÍBULO, A. & BÓ, G.A. Effect of FSH treatment on cumulus oocyte complex recovery by ovum pick up and *in vitro* embryo production in beef donor cows. **Anim Reprod Sci**, v. 214, p. 1–6, 2020.
- 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.

- PHILLIPPO, M. & ROWSON, L.E.A. Prostaglandins and superovulation in the bovine. **Ann Biol Anim Biochim Biophys**, v. 15, p.233–240, 1975.
- PHILLIPS, P.E. & JAHNKE, M.M. Embryo Transfer (Techniques, Donors, and Recipients). **Vet Clin Food Anim**, v. 32, p. 365–385, 2016.
- PIERSON, R.A. & GINTHER, O.J. Ultrasonography of the bovine ovary. **Theriogenology**, v. 21, p. 495–504, 1984.
- PIERSON, R.A. & GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, v. 29, p. 21–37, 1988.
- PIERSON, R.A. & ADAMS, G.P. Remote assessment of ovarian response and follicular status using visual analysis of ultrasound images. **Theriogenology**, v. 51, p. 47–57, 1999.
- 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_{2α} and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, p. 915-923, 1995.
- QUIRK, S.M.; COWAN, R.G.; HARMAN, R.M.; HU, C.-L. & PORTER, D.A. Ovarian follicular growth and atresia: The relationship between cell proliferation and survival. **J Anim Sci**, v. 82 (E. Suppl.) E40–E52, 2004.
- RAJAKOSKI, E. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical and left-right variations. **Acta Endocrinol**, v. 52, p. 1–68, 1960.
- RATHBONE, M.J.; KINDER, J.E.; FIKE, K.; KOJIMA, F.; CLOPTON, D.; OGLE, C.R. & BUNT, C.R. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology

- and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 50, p. 277–320, 2001.
- RHODES, F.M.; DE'ATH, G. & ENTWISTLE, K.W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. **Anim Reprod Sci**, v. 38, p. 265-277, 1995.
- RICO, C.; FABRE, S.; MÉDIGUE, C.; DI CLEMENTE, N.; CLÉMENT, F.; BONTOUX, M.; TOUZÉ, J.; DUPONT, M.; BRIANT, E.; RÉMY, B.; BECKERS, J. & MONNIAUX, D. Anti-mullerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin- responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. **Biol Reprod**, v. 80, p. 50–59, 2009.
- RICO, C.; MÉDIGUE, C.; FABRE, S.; JARRIER, P.; BONTOUX, M.; CLÉMENT, F. & MONNIAUX, D. Regulation of anti-mullerian hormone production in the cow: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels. **Biol Reprod**, v. 84, p. 560–571, 2011.
- ROCHE, J.F. Control and regulation of folliculogenesis – a symposium in perspective. Reviews of Reproduction. In: **J Reprod Fertil**, v. 1, p. 19-27, 1996.
- RODRIGUES, J.L.R. & BERTOLINI, M. Biotecnologias da reprodução animal: de Aristóteles à edição gênica. **Rev Bras Reprod Anim**, v.43, p.204-208, 2019.
- 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.
- ROSENBERGER, G. Sistema genital feminino. In: **Exame Clínico dos Bovinos**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993, p. 303-319.
- ROVANI, M.T.; ILHA, G.F.; GASPERIN, B.G.; NÓBREGA JR. J.; SIDDAPPA, D. GLANZNER, W.; ANTONIAZZI, A.Q.; BORDIGNON, V.; DUGGAVATHI, R. &

- GONÇALVES, P.B.D. Prostaglandin F₂α-induced luteolysis involves activation of signal transducer and activator of transcription 3 and inhibition of AKT signaling in cattle. **Mol Reprod Dev**, v. 84, p. 486-494, 2017.
- RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibl Anat**, v. 24, p. 77-92, 1983.
- SALES, J.N.S.; CARVALHO, J.B.P.; CREPALDI, G.A.; CIPRIANO, R.S.; JACOMINI, J.O.; MAIO, J.R.G.; SOUZA, J.C.; NOGUEIRA, G.P. & BARUSELLI, P.S. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 78, p. 510-516, 2012.
- SALISBURY, G.W.; VANDEMARK, N.L. & LODGE, J.R. Semen collection. **In: Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle**. 1 ed, San Francisco, CA, W. H. Freeman and Co., 1978, p 385.
- SARTORELLI, E.S.; CARVALHO, L.M.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. & BARROS, C.M., Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, p. 2382–2394, 2005.
- SARTORI, R. & BARROS, C.M. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. **Anim Reprod Sci**, v. 124, p. 244–250, 2011.
- SARTORI, R.; FRICKE, P.M.; FERREIRA, J.C.P.; GINTHER, O.J. & WILTBANK, M.C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biol Reprod**, v. 65, p. 1403–1409, 2001.
- SARTORI, R.; ROSA, G.J.M. & WILTBANK, M.C. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **J Dairy Sci**, v. 85, p. 2813–2822, 2002.

- SARTORI, R.; HAUGHIAN, J.M.; SHAVER, R.D.; ROSA, G.J.M. & WILTBANK, M.C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **J Dairy Sci**, v. 87, p. 905–920, 2004.
- SARTORI, R. MONTEIRO JR., P.L.J. & WILTBANK, M.C. Endocrine and metabolic differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* cows and implications for reproductive management. **Anim Reprod**, v. 13, p. 168-181, 2016.
- SAVIO, J.D.; KEENAN, L.; BOLAND, M.P. & ROCHE, J.F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **J Reprod Fertil**, v. 83, p. 663–671, 1988.
- SCARAMUZZI, R.J.; BAIRD, D.T.; CAMPBELL, B.K.; DRIANCOURT, M.-A.; DUPONT, J.; FORTUNE, J.E.; GILCHRIST, R.B.; MARTIN, G.B.; MCNATTY, K.P.; MCNEILLY, A.S.; MONGET, P.; MONNIAUX, D.; VIÑOLES, C. & WEBB, R. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. **Reprod Fertil Dev**, v. 23, p. 444–467, 2011.
- SEVGI, R.; ERDEM, H.; KARAŞAHIN, T.; YILMAZ, M.A.; SATILMIŞ, M.; OKUROĞLU, A.; ÜNAL, İ; DURSUN, Ş; ALKAN, H.; SATILMIŞ, F. & GÜLER, M. Determination of the relationship between serum anti-Müllerian hormone level and superovulatory response in Simmental cows. **Reprod Dom Anim**, v. 54, p. 1322–1329, 2019.
- SINGH, J.; DOMÍNGUEZ, M.; JAISWAL, R. & ADAMS, G.P. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. **Theriogenology**, v. 62, p. 227–243, 2004.
- SIROIS, J. & FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biol Reprod**, v. 39, p. 308–317, 1988.
- SOTO-SUAZO, M. & ZORN, T.M. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. **Anim Reprod**, v. 2, p. 147-160, 2005.

- STEVENSON, J.S. & LAMB, G.C. Contrasting effects of progesterone on fertility of dairy and beef cows. **J Dairy Sci**, v. 99, p. 1–14, 2016.
- STEVENSON, J.S. & PULLEY, S.L. Feedback effects of estradiol and progesterone on ovulation and fertility of dairy cows after gonadotropin-releasing hormone-induced release of luteinizing hormone. **J Dairy Sci**, v. 99, p. 1–13, 2016.
- STEVENSON, J.S. & BRITT, J.H. A 100-Year Review: Practical female reproductive management. **J Dairy Sci**, v. 100, p. 10292–10313, 2017.
- SUNDERLAND, S.J.; CROWE, M.A.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. & IRELAND, J.J. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. **J Reprod Fertil**, v. 101, p. 547-555, 1994.
- SURJUS, R.S.; PRATA, A.B.; BORSATO, M.; MATTOS, F.C.S.Z.; SILVEIRA, M.C.M.; MOURÃO, G.B.; PIRES, A.V.; WILTBANK, M.C. & SARTORI, R. *In vivo* embryo production in cows superovulated 1 or 2 days after ovum pick-up. **Reprod Fertil Dev**, v. 26, p. 527–532, 2014.
- THIBIER, M. The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. **Reprod Nutr Dev**, v. 45, p. 235-242, 2005.
- TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; PENTEADO, L.; SALES, J.N.S.; SÁ FILHO, M.F.; AYRES, H. & BARUSELLI, P.S. A comparison of two different esters of estradiol for the induction of ovulation in an estradiol plus progestin-based timed artificial insemination protocol for suckled *Bos indicus* beef cows. **Anim. Reprod. Sci.** (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.09.019>
- ULBERG, L.C.; CHRISTIAN, R.E. & CASIDA, L.E. Ovarian response in heifers to progesterone injections. **J Anim Sci**, v. 10, p. 752–759, 1951.

USDA, United States Department of Agriculture. Livestock Slaughter 2018 Summary, 2018.

Disponível em: https://www.nass.usda.gov/Publications/Todays_Reports/reports/lsslan19.pdf

VALDEZ, K.E.; CUNEO, S.P. & TURZILLO, A.M. Regulation of apoptosis in the atresia of dominant bovine follicles of the first follicular wave following ovulation. **Reproduction**, v. 130, p. 71–81, 2005.

VAN DEN HURK, R. & ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717–1751, 2005.

VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M. & BECKERS, J.F. *In-vivo* and *in vitro* development of preantral follicles. **Theriogenology**, v. 47, p. 73-82, 1997.

VAN WEZEL, I.L. & RODGERS, R.J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment *in vivo*. **Biol Reprod**, v. 55, p. 1003-1011, 1996.

VASSENA, R.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J.; PIERSON, R.A. & SINGH, J. Ultrasound image characteristics of ovarian follicles in relation to oocyte competence and follicular status in cattle. **Anim Reprod Sci**, v. 76, p. 25–41, 2003.

VIANA, J.H.M. 2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technol Newsletter**, v. 38, n.4, 2020.

VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F. & CAMARGO, L.S.A. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesq Agropec Bras**, v. 35, p. 2501–2509, 2000.

VIANA, J.H.M.; DOREA, M.D.; SIQUEIRA, L.G.B.; ARASHIRO, E.K.N.; CAMARGO, L.S.A.; FERNANDES, C.A.C. & PALHÃO, M.P. Occurrence and characteristics of residual follicles formed after transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration in cattle. **Theriogenology**, v. 79, p. 267–273, 2013.

- VIANA, J.H.M.; FIGUEIREDO, A.C.S; GONÇALVES, R.L.R. & SIQUEIRA, L.G.B. A historical perspective of embryo-related technologies in South America. **Anim Reprod**, v. 15, p. 963-970, 2018.
- VIEIRA, L.M.; RODRIGUES, C.A.; NETTO, A.C.; GUERREIRO, B.M.; SILVEIRA, C.R.A.; MOREIRA, R.J.C.; SÁ FILHO, M.F.; BÓ, G.A.; MAPLETOFT, R.J. & BARUSELLI, P.S. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve *in vitro* embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. **Theriogenology**, v. 82, p. 318–324, 2014.
- WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.-G. & ARMSTRONG, D.G. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. **J Anim Sci**, v. 82, p. E63–E74, 2004.
- WEBB, R.; BURATINI, J.; HERNANDEZ-MEDRANO, J.H.; GUTIERREZ, C.G. & CAMPBELL, B.K. Follicle development and selection: past, present and future. **Anim Reprod**, v. 13, p. 234-249, 2016.
- WILTBANK, M.C. & PURSLEY, J.R. The cow as an induced ovulator: Timed AI after synchronization of ovulation. **Theriogenology**, v. 81, p. 170–185, 2014.
- WILTBANK, J.N.; ZIMMERMAN, D.R.; INGALLS, J.E. & ROWDEN, W.W. Use of progestational compounds alone or in combination with estrogen for synchronization of estrus. **J Anim Sci**, v. 24, p.990- 994, 1965.
- WILTBANK, J.N.; SHUMWAY, R.P.; PARKER, W.R. & ZIMMERMAN, D.R. Duration of estrus, time of ovulation and fertilization rate in beef heifers synchronized with dihydroxyprogesterone acetophenide. **J Anim Sci**, v. 26, p.764- 767, 1967.
- WILTBANK, M.C.; SOUZA, A.H.; GIORDANO, J.O.; NASCIMENTO, A.B.; VASCONCELOS, J.M.; PEREIRA, M.H.C.; FRICKE, P.M.; SURJUS, R.S.; ZINSLY, F.C.S.; CARVALHO, P.D.; BENDER, R.W. & SARTORI, R. Positive and negative

- effects of progesterone during timed AI protocols in lactating dairy cattle. **Anim Reprod**, v. 9, p. 231-241, 2012.
- WISHART, D.F. Observations on the oestrous cycle of the friesian heifer. **Vet Rec**, v. 90, p. 595-597, 1972.
- 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. **Biol Reprod**, v. 53, p. 951–957, 1995.
- YANG, M.Y. & RAJAMAHENDRAN, R. Involvement of apoptosis in the atresia of nonovulatory dominant follicle during the bovine estrous cycle. **Biol Reprod**, v. 63, p. 1313–1321, 2000.
- ZEITOUN, M.M.; RODRIGUEZ, H.F. & RANDEL, R.D., Effect of season on ovarian follicular dynamics in Brahman cows. **Theriogenology**, v. 45, p. 1577–1581, 1996.
- ZOLMAN, J.; CONVEY, E.M.; BRITT, J.H. & HAF, H.D. Release of bovine luteinizing hormone by purified porcine and synthetic gonadotropin releasing hormone. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 142, p. 189–193, 1973.

10. BIOGRAFIA DA AUTOR

Thomaz Kranen Cunha é natural de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, ingressou na Faculdade de Veterinária da UFRGS em março de 2012, e ao início do curso fez estágio com clínica de Grandes Animais, pois tinha interesse na área de equinos. Foi bolsista de iniciação científica no Setor de Suínos da UFRGS sob orientação do Prof. Dr. Ivo Wentz, onde teve o primeiro contato com pesquisa científica e com a área de produção animal, especificamente com a suinocultura. Após este contato com o setor agropecuário, iniciou estágios durante o período de férias de verão com Médicos Veterinários que atuavam com reprodução bovina, e desde então trilhou seu caminho dentro da área de Bovinocultura de corte e leite, até o período final da graduação. Durante os estágios finais, pôde viajar e conhecer o Centro-Oeste brasileiro, através do estágio curricular realizado na empresa Lageado Biotecnologia Agropecuária, em Mineiros/GO. Também realizou estágio juntamente com os Médicos Veterinários da empresa Rumitec Serviços Veterinários na região da serra gaúcha, acompanhando visitas de prestação de serviços em reprodução, clínica e cirurgia. Por ter apreço com a temática da reprodução animal e suas biotecnologias, ingressou no mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS (PPGCV/UFRGS), junto ao Laboratório de Embriologia e Biotécnicas da Reprodução, sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Bertolini, e coorientação do Prof. Dr. José Luis Rodrigues.