

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

**INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF) EM BOVINOS DE CORTE**  
**COM SÊMEN REFRIGERADO OU CRIOPRESERVADO**

**CÉSAR AUGUSTO PINZÓN OSORIO**

**PORTO ALEGRE**

**2023**

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

**INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF) EM BOVINOS DE CORTE  
COM SÊMEN REFRIGERADO OU CRIOPRESERVADO**

**Autor:** César Augusto Pinzón Osorio

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

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

PORTO ALEGRE

2023

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

Pinzón Osorio, César Augusto  
Inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em  
bovinos de corte com sêmen refrigerado ou  
criopreservado / César Augusto Pinzón Osorio. -- 2023.  
139 f.  
Orientador: Marcelo Bertolini.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto  
Alegre, BR-RS, 2023.

1. Sêmen. 2. Sincronização. 3. Ultrassonografia. 4.  
Bovinos. 5. IATF. I. Bertolini, Marcelo, orient. II.  
Título.

César Augusto Pinzón Osorio

**INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF) EM BOVINOS DE CORTE  
COM SÊMEN REFRIGERADO OU CRIOPRESERVADO**

Aprovado em: 28 de fevereiro de 2023.

COMISSÃO AVALIADORA:

---

Prof. Dr. Marcelo Bertolini, FAVET/UFRGS

Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. João Batista de Souza Borges, FAVET/UFRGS

Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Paulo Bayard Dias Gonçalves, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Eduardo de Souza Ribeiro, Animal Biosciences, University of Guelph

Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma influenciaram e me ajudaram durante esse período.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

Finalmente ao povo brasileiro, por me oferecer como estrangeiro a oportunidade de continuar minha formação científica com recursos públicos na Universidade Pública, sempre crítica e transformadora.

*Este trabalho é dedicado especialmente à peonada, porque cada quilo de carne, além de proteína, também tem uma história de força e sacrifício.*

## RESUMO

### INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF) EM BOVINOS DE CORTE COM SÊMEN REFRIGERADO OU CRIOPRESERVADO

Autor: César Augusto Pinzón Osorio

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bertolini

Embora pareça razoável considerar que fatores inerentes ao sêmen refrigerado, tais como maior viabilidade e sobrevivência, estejam associados a uma capacidade de fecundação mais duradoura para aumentar a taxa de prenhez por inseminação artificial (P/IA) em relação ao sêmen criopreservado, de acordo ao atual estado de conhecimento, não há estudos explorando as associações entre as taxas de prenhez por IA em tempo fixo (IATF) com sêmen refrigerado e congelado de acordo com o tamanho do folículo ovariano e seus parâmetros de ecotextura. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos e a interação da ciclicidade reprodutiva, o escore de condição corporal, morfometria folicular na probabilidade de prenhez em bovinos de corte submetidos à IATF usando sêmen congelado ou refrigerado. Avaliou-se a probabilidade de P/IA em 348 fêmeas multíparas (3/8 *Bos taurus indicus* e 5/8 *Bos taurus taurus*) usando sêmen refrigerado ou congelado considerando o tamanho do folículo (folículos pequenos, <8,5 mm, folículos médios, 8,5-11,0 mm, e folículos grandes, >11,0 mm) em vacas de corte submetidas à IATF baseado em um protocolo com benzoato de estradiol e progesterona (P4). No dia 30, as taxas de P/AI foram mais altas ( $P < 0,0001$ ) com o uso de sêmen resfriado (64,4%) do que com o sêmen congelado (51,2%), com vacas acíclicas ou sem expressão de cio com probabilidade 1,5 a 1,7 vezes maior ( $P < 0,05$ ) de engravidar com sêmen resfriado do que as fêmeas inseminadas com sêmen congelado nas mesmas condições. Embora não tenham sido observadas diferenças em P/AI de acordo com as faixas de FD usando sêmen resfriado, as fêmeas que não atingiram a divergência folicular no dia 8 do protocolo hormonal para TAI tiveram taxas mais altas de P/AI usando sêmen resfriado (71,9%;  $P < 0,05$ ) do que com sêmen congelado (38,0%). Por fim, o uso do sêmen refrigerado aumentou a taxa de P/IA, com maiores taxas de concepção em vacas com folículos pequenos.

**Palavras-chave:** sêmen, sincronização, ultrassonografia, bovinos.

## ABSTRACT

### TIMED ARTIFICIAL INSEMINATION (TAI) IN BEEF CATTLE WITH COOLED OR CRYOPRESERVED SEMEN

Author: César Augusto Pinzón Osorio

Supervisor: Prof. Dr. Marcelo Bertolini

Although it seems reasonable to consider that factors inherent to cooled semen, such as higher viability and survival over time, are associated with a higher and long-lasting fertilization capacity to improve pregnancy rates by artificial insemination (P/IA) as compared with cryopreserved semen, according to the current state of knowledge, no studies report associations between P/IA after timed AI (TAI) with cooled and frozen semen according to ovarian follicular size and echotexture parameters. The aim of the present study was to evaluate the effects and interactions between reproductive cyclicity, body condition score, morphometry and follicular echotexture on the likelihood of P/IA in beef cattle subjected to TAI using frozen or cooled semen. The likelihood of P/IA was evaluated in 348 multiparous females (3/8 *Bos taurus indicus* and 5/8 *Bos taurus taurus*) using cooled or frozen semen considering follicular size (small follicles, <8.5 mm, medium follicles, 8.5-11.0 mm, and large follicles, >11.0 mm) and echotexture parameters in beef cows subjected to TAI based on an estradiol benzoate plus progesterone (P4) protocol. On Day 30, P/IA rates were higher ( $P<0.0001$ ) using cooled (64.4%) than frozen semen (51.2%), with acyclic cows or with no estrus expression having 1.5- to 1.7-fold higher likelihood ( $P<0.05$ ) to become pregnant with cooled semen than females inseminated with frozen semen under the same conditions. Although no differences in P/IA were observed according to FD ranges using cooled semen, females that did not reach follicular divergence on day 8 of the hormone protocol for TAI had higher P/IA rates using cooled semen (71.9%;  $P<0.05$ ) than with frozen semen (38.0%). Thus, the use of cooled semen increased P/IA, with higher conception rates in cows with small follicles and perifollicular stroma with low average numerical pixel value.

**Keywords:** pixel, semen, synchronization, software, ultrasonography, cattle.

## LISTA DE FIGURAS

### Figura inserida na revisão de literatura

- Figura 1.** Ilustração da inter-relação entre os hormônios circulantes (FSH, LH, E2, P4) e os efeitos sobre o diâmetro folicular durante o crescimento folicular e ao início do processo de desvio folicular em uma dinâmica folicular de duas ondas foliculares. Folículos dominante (FD) e subordinados (FS) em cada onda são indicados como círculos em cinza, e o corpo lúteo (CL) é a forma irregular em cinza desenhada acima dos folículos. O aumento da concentração de FSH precede o surgimento de cada onda. O número de folículos  $\geq 4$  mm flutua em resposta ao nível plasmático de FSH. Inicialmente, o FSH está estimulando todos os folículos FSH-responsivos, e a inibina é o primeiro supressor deste hormônio a ser liberado quando os folículos atingem 5 mm de diâmetro. A seleção ocorre contra os FS, onde o FD continua seu crescimento, enquanto seus subordinados diminuem a taxa de crescimento, pois ao início do processo de divergência, apenas o FD está preparado para manter seu desenvolvimento mesmo com as condições decrescentes de FSH. O FD de cada onda é a principal fonte de E2, e a produção é duas vezes mais alta no folículo pré-ovulatório em relação ao folículo anovulatório dominante. Com o desaparecimento por atresia ou ovulação do FD, os produtos foliculares responsáveis pela supressão da queda de FSH e concentrações circulantes de FSH são depurados, resultando no surgimento de nova onda folicular.....23

### Figuras inseridas no artigo científico

- Figure 2.** Influence of cyclicity status and probability of pregnancy per AI (P/AI) outcome 30 days after TAI by semen type. (A) P/AI according to cyclicity status (cyclic, acyclic) and semen type (cooled or frozen semen) .....101
- Figure 3.** Interaction between follicular diameter classes and semen type (cooled or frozen semen) on pregnancy outcome 30 days after TAI.....101
- Figure 3.** Influence of estrous and probability of pregnancy per AI (P/AI) outcome 30 days after TAI by semen type. (A) P/AI according to estrous expression and semen type (cooled or frozen semen) .....102

## LISTA DE TABELAS

### Tabelas inseridas na revisão de literatura

- Tabela 1.** Resultados de estudos da literatura com diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre o uso de sêmen bovino refrigerado (R) e/ou congelado (C) na IA ou na IATF de fêmeas bovinas de corte ou de leite.....40
- Tabela 2.** Classificação do escore do trato reprodutivo (ETR), após exame ginecológico por palpação retal e ultrassonografia transretal, com descrição de características ovarianas (tamanho, estruturas, funcionalidade) e contratilidade (tônus) uterina para fêmeas bovinas.....46

### Tabelas inseridas no artigo científico

- Table 1.** Overview of the effect of processing time and temperature of storage on progressive sperm cell motility, motility vigor, sperm cell viability, sperm cell plasma membrane functional integrity, and sperm cell acrosome status ( $LSM \pm SEM$ ) in fresh, diluted, cooled and frozen-thawed semen from three bulls used for the timed artificial insemination (TAI) of suckled multiparous beef females.....98
- Table 2.** Descriptive statistics, risk factors (odds ratio, OR), Wald  $P$  value and likelihood ratio test (LRT) of the univariable logistic regression models of variables with association with pregnancy per artificial insemination (P/AI) on Day 30 after timed artificial insemination (TAI) in multiparous suckled beef females.....99
- Table 3.** Risk factors (odds ratio, OR), Wald  $P$  value and likelihood ratio test (LRT) of final multivariable logistic regression model for pregnancy per AI (P/AI) in beef cows on day 30 after timed artificial insemination (TAI) with cooled or frozen semen.....100

## 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
CL	Corpo Lúteo
DF	Divergência Folicular
ECC	Escore Condição Corporal
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
EUA	Estados Unidos da América
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
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
HHG	Hipotalâmico-hipofisiário-gonadal
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IBGE	Intituto Brasileiro de Geografia e Estatística
im	intramuscular
LH	<i>Luteinizing Hormone</i>
mg	miligrama
MHz	Mega Hertz
mm	milímetro
mL	milímetro
ng	nanograma
OECD	Organisation for Economic Co-operation Development
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandina-F 2alfa
P4	Progesterona
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
US	Ultrassom
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
TEC	Toneladas Equivalente Carcaça
VE	Valerato de Estradiol
α	<i>Alfa</i>
τ	<i>Tau</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1. Ciclo estral em bovinos .....</b>	<b>16</b>
2.1.1. Próestro e estro .....	18
2.1.2. Metaestro e diestro.....	20
<b>2.2. Dinâmica folicular durante o ciclo estral .....</b>	<b>22</b>
2.2.1. Recrutamento folicular.....	24
2.2.2. Seleção folicular .....	25
2.2.3. Desvio e dominância folicular.....	27
<b>2.3. Uso de hormônios exógenos para manipular o ciclo reprodutivo: a inseminação artificial em tempo fixo .....</b>	<b>28</b>
2.3.1. Fatores que afetam o sucesso dos programas de IATF.....	32
<b>2.4. Uso do sêmen criopreservado e refrigerado na IATF .....</b>	<b>36</b>
<b>2.5. Ciclicidade e ferramentas para avaliação da função reprodutiva .....</b>	<b>42</b>
<b>2.6. Criobiologia do sêmen bovino.....</b>	<b>51</b>
2.6.1. Crioprotetores extracelulares ou não penetrantes.....	56
2.6.2. Crioprotetores intracelulares ou penetrantes .....	56
<b>2.7. Avaliação da qualidade espermática.....</b>	<b>58</b>
<b>3.1. Hipótese.....</b>	<b>63</b>
<b>3.2. Objetivo geral .....</b>	<b>63</b>
<b>3.2.1. Objetivos específicos .....</b>	<b>63</b>
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>64</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>65</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Desde o início do Holoceno (ca. 10000 a.C.) os bovinos têm desempenhado um papel importante no progresso humano (MASTROMONACO; GONZALEZ-GRAJALES, 2020; ZHANG *et al.*, 2020). Na atualidade, a indústria bovina é um componente chave da agricultura global (BLONDIN, 2015; GICQUEL *et al.*, 2020), desempenhando um papel importante no fornecimento de alimentos, e apoiando a segurança alimentar e o desenvolvimento socioeconômico dos países (GODDE *et al.*, 2021). Hoje, esta indústria é o maior setor pecuário do mundo em termos de valor da produção/número de animais (1,4 bilhão), com estimativa de US\$ 324,4 bilhões em 2019 (BLONDIN, 2015; OECD-FAO, 2021).

Nos últimos 25 anos, a produção mundial de carne bovina aumentou em quase 50% (OECD-FAO, 2021). A pecuária bovina se expandiu principalmente nos países em desenvolvimento da Ásia, África e América Latina, onde a produção de gado de corte é um dos principais motores das economias nacionais (OECD-FAO, 2021). Especificamente, o setor da pecuária no Brasil tem apresentado uma evolução substancial. Nas economias pecuárias mundiais, o Brasil possui destaque na indústria global de alimentos, especialmente de *commodities* como a carne e leite bovino (BARUSELLI *et al.*, 2021). Com regiões tropicais e subtropicais, o país possui um rebanho bovino de 224,6 milhões de cabeças, segundo a metodologia de avaliação sugerida pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2021).

O panorama atual do mercado mundial para carne bovina mostra que o Brasil é o primeiro maior exportador de carne bovina e o quinto maior de gado vivo do mundo, com um volume de 1,05 milhão de toneladas (ton.) em 2018, o que representou um valor de US\$ 6,36 bilhões (OECD-FAO, 2021). Em 2021, o país exportou 1,385 milhão de toneladas de

carne bovina para 107 países, e teve como principais importadores a China (723,2 ton.), a união europeia (EU, 136,7 ton), Hong Kong (135,6 ton.), o Chile (110,6 ton.), o Egito (68,5 ton.), entre outros (201,8 ton.) (OECD-FAO, 2021). Neste contexto, o mercado externo tem proporcionado uma demanda constante pela carne bovina brasileira, mesmo durante a crise pandêmica da Covid-19 (USDA, 2022), que devido à desvalorização da moeda brasileira (uma média de R\$ 5,50 por dólar durante 2021), tornou os produtos brasileiros derivados de carne bovina atraentes no mercado global (OECD-FAO, 2021). Não é um exagero, portanto, assumir que o crescimento desta indústria esteja sustentado no estabelecimento e uso combinado de tecnologias de reprodução assistida tais como a inseminação artificial (IA), sincronização de estro e IA em tempo fixo (IATF) (BÓ *et al.*, 2018; MUELLER; VAN EENENNAAM, 2022). Recentemente, foi apresentado que para o ano de 2021, o mercado de IATF no Brasil cresceu 25%, superando 26 milhões de procedimentos de sincronização do ciclo estral bovino para IATF (BARUSELLI *et al.*, 2022).

O progresso significativo e a intensificação da IATF nos programas comerciais de produção de gado de corte (BÓ *et al.*, 2018, 2007; SÁ FILHO *et al.*, 2010) dá suporte hoje a taxas de prenhez por IA (P/IA) entre 40% e 60% (BARUSELLI *et al.*, 2012; BÓ *et al.*, 2018; MADUREIRA *et al.*, 2020b, 2020a; MENEGHETTI *et al.*, 2009; SALES *et al.*, 2012; WILTBANK; PURSLEY, 2014), considerando a aplicação desta biotecnologia em rebanhos férteis em ciclicidade ou em iminência de ciclicidade, com boas condições de manejo geral, sanitário e nutricional, e salvaguardando o uso de sêmen de fertilidade comprovada e procedimentos técnicos adequados.

Atualmente, regimes de tratamento à base de ésteres de estradiol e progesterona (P4) são amplamente utilizados na América Latina (BÓ *et al.*, 2016; MADUREIRA *et al.*, 2020a,b). Tais protocolos hormonais dão apoio à sincronização do início da emergência da nova onda folicular, ao controle das concentrações de P4 circulante para regular tanto os

padrões de crescimento do folículo pré-ovulatório, o ambiente uterino, quanto o tempo entre o estro e a ovulação, e sincronizar o tempo de ovulação para permitir a IA fértil no final do protocolo (MADUREIRA *et al.*, 2020a). Entretanto, devido à variabilidade fisiológica e genética inerente das fêmeas (PFEIFER *et al.*, 2015), foi documentado que a regressão folicular pode falhar nestes protocolos, produzindo folículos persistentes (CONSENTINI *et al.*, 2021; MONTEIRO *et al.*, 2015), ou atrasar a emergência e sincronização da nova onda folicular (BÓ *et al.*, 1995a, b; BURKE *et al.*, 2003; MCDOUGALL *et al.*, 2004), o que, por sua vez, promove a assincronia tanto nos padrões de crescimento do folículo pré-ovulatório futuro, como o tempo de estro e ovulação (LAMB *et al.*, 2001; PERRY *et al.*, 2007, 2005; SÁ FILHO *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2007). De acordo com estes fatos, os protocolos hormonais, apesar de comercialmente viáveis (BARUSELLI *et al.*, 2017a, 2019; BÓ *et al.*, 2016; MAPLETOFT *et al.*, 2018), ainda apresentam limitações biológicas que devem ser superadas para o aumento da eficiência da P/IA da IATF.

Apesar de se considerar uma prática obsoleta, o sêmen refrigerado tem sido reincorporado nos últimos anos em alguns programas de IATF, tanto em pesquisa (BORGES-SILVA *et al.*, 2016; BUCHER *et al.*, 2009; CRESPILO *et al.*, 2014; PAPA *et al.*, 2015; PYTLÍK *et al.*, 2020; SATAKE *et al.*, 2018; TIPPENHAUER *et al.*, 2021), como também no campo comercial em países como a Irlanda (MURPHY *et al.*, 2017, 2018), Nova Zelândia (YANG *et al.*, 2018) e Austrália (SATAKE *et al.*, 2018). Em geral, esta estratégia tem destacado um aumento de 10% de P/IA em relação ao sêmen congelado quando usado em regimes de tratamento à base de benzoato de estradiol com P4 (BORGES-SILVA *et al.*, 2016; PAPA *et al.*, 2015).

Embora pareça razoável considerar que fatores inerentes ao sêmen refrigerado, como a maior viabilidade e sobrevivência, estejam associados a uma maior capacidade fecundante para melhorar as taxas de P/IA comparado ao criopreservado, segundo o estado atual de

conhecimento na literatura, não há nenhum estudo randomizado e controlado demonstrando as associações entre a P/IA pela IATF utilizando sêmen refrigerado e congelado considerando o *status* de ciclicidade, a expressão do estro, a morfometria folicular e os parâmetros de ecotextura e seus efeitos sobre a probabilidade de concepção em vacas de corte. Segundo as considerações anteriores, a hipótese que suporta o principal estudo que se apresenta aqui, é que a vantagem da IA com sêmen refrigerado se reflete principalmente no aumento das taxas de P/IA em vacas com folículos menores (<8,5 mm) e que não alcançam a divergência folicular no momento da remoção do dispositivo intravaginal de P4 durante o protocolo hormonal.

Diante desse cenário, a presente dissertação apresenta achados que resultaram em três artigos que visaram abordar e adicionar ao conhecimento os efeitos e associações entre a ciclicidade reprodutiva, o estado de condição corporal, e a morfometria e a ecotextura folicular na P/IA em bovinos de corte após a IATF com sêmen refrigerado ou criopreservado. O primeiro artigo intitulado *Effect of fixed-time AI using cooled or frozen semen on pregnancy rates in beef cows according to cyclicity, estrus expression, and follicular size*, teve o objetivo de determinar a probabilidade de P/IA usando sêmen refrigerado ou congelado considerando o tamanho do maior folículo ovariano em vacas multíparas de corte submetidas à IATF. Além disso, foi avaliado o efeito e a interação da expressão do estro, da ciclicidade reprodutiva e do escore de condição corporal também como variáveis explicativas na probabilidade de P/IA.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Ciclo estral em bovinos

Na medida em que a agricultura se tornou uma prática mais comum, o conhecimento do ciclo estral bovino se tornou uma ferramenta valiosa para agricultores e pecuaristas, que baseada na observação dos sinais comportamentais e dos sintomas do estro, foi possível reconhecer que os sinais do estro 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). Foi o avanço da tecnologia e da pesquisa no século XX que permitiu uma maior compreensão do ciclo estral, como a determinação do tempo do ciclo e da ovulação, com Anderson (1944) relatando uma duração média do ciclo estral de 22 e 23 dias, para o *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, respectivamente. No entanto, outros estudos estipularam uma duração média de 21 dias, variando de 17 a 24 dias (WILTBANK *et al.*, 1965; SALISBURY *et al.*, 1978; WISHART, 1972), e o estro com duração de 25 a 30 horas (BERNARD *et al.*, 1983; CHRISTENSON *et al.*, 1975). Posteriormente foram identificados os hormônios e mecanismos que controlam o ciclo estral.

O sistema neuroendócrino é responsável pela regulação da maioria das funções reprodutivas em mamíferos. O hipotálamo, a hipófise anterior, os ovários e o útero são partes deste sistema, com os hormônios reprodutivos liberados para regular as mudanças reprodutivas fisiológicas (GINTHER *et al.*, 2001). Para que um ciclo estral saudável funcione, e para que uma prenhez seja estabelecida e mantida com sucesso, as atividades e interações hormonais são cruciais (GINTHER *et al.*, 2001a, b; HANSEL; ECHTERNKAMP, 1972). Diferentes hormônios ligados interdependentemente são produzidos durante o ciclo estral como resultado de uma série de eventos fisiológicos que controlam a dinâmica folicular e luteal. Esses processos incluem o desenvolvimento folicular

e atresia, expressão do estro, receptividade sexual, ovulação e luteólise (WILTBANK *et al.*, 1965; FORDE *et al.*, 2011; ATKINS *et al.*, 2013).

Os bovinos são animais monovulares e poliétricos anuais (PETER *et al.*, 2009). O ciclo estral nos bovinos é caracterizado por ter um padrão dinâmico e cíclico dominado pelo eixo hipotalâmico-hipofisiário-gonadal (HHG) (FORDE *et al.*, 2011). O HHG é um sistema regulado por retroalimentação no qual as concentrações de hormônios ovarianos tem um efeito no hipotálamo para inibir ou não a liberação do GnRH (WILTBANK *et al.*, 1965; 1967).

Temporalmente, o ciclo estral é marcado pelo intervalo entre dois períodos de receptividade reprodutiva, denominado de estro, o qual ocorre aproximadamente a cada 21 dias na fêmea bovina (HANSEL; ECHTERNKAMP, 1972; GINTHER *et al.*, 2001a; FORDE *et al.*, 2011; PETER *et al.*, 2009; SARTORI; BARROS, 2011). Também denominado como interestro, este período é fisiológico e endocrinologicamente dividido em duas fases e quatro estágios regulados pelo HHG. A fase folicular compreende os estágios de próestro e estro, enquanto a fase lútea inclui os estágios de metaestro e diestro.

A fase folicular, também conhecida como estrogênica, é relativamente curta, já que compreende cerca de 20% do ciclo estral, durando aproximadamente 4 a 6 dias (PETER *et al.*, 2009). Esta fase inclui os estágios de próestro (três a quatro dias) e estro (12 a 18 horas), e é caracterizada pela presença de folículos antrais terciários, com diâmetro menor do que 5 mm, até a existência de um FD com diâmetro maior do que 10 mm que possibilita o aumento na taxa de liberação de E2 pelo folículo, com a subsequente receptividade sexual, a qual ocorrerá aproximadamente 12-24 horas antes da ovulação (FORDE *et al.*, 2011; PETER *et al.*, 2009). Devido à menor concentração de P4 durante este período, ocorre a liberação de GnRH pelo centro pré-ovulatório, que induzirá a liberação de um pico de LH pela hipófise anterior, levando à maturação folicular e oocitária, a luteinização do folículo e a ovulação

do FD ao redor de 24 a 32 horas mais tarde (BINELLI *et al.*, 2014; FORDE *et al.*, 2011; GARVERICK; SMITH, 1993; KOJIMA, 2003; PETER *et al.*, 2009).

A fase lútea, também denominada de progesterônica, compõe a maior parte do ciclo estral, durando aproximadamente 14 a 18 dias. Esta fase é caracterizada pelo desenvolvimento do CL, compreendendo os estágios de metaestro e diestro, com um subsequente aumento na produção de P4, a qual será responsável pela manutenção do endométrio, de forma que este se mantenha preparado para a implantação de um concepto (FORDE *et al.*, 2011; PETER *et al.*, 2009), ou no caso de ausência do mesmo, culminando com a luteólise (SARTORI; BARROS, 2011).

A literatura é unânime em afirmar que o ciclo estral nos bovinos é um fenômeno dinâmico e complexo que é afetado por diversos fatores, tais como a idade, a raça, o tipo de alimentação, o balanço energético e o escore de condição corporal, e condições ambientais, como fontes de estresse, sazonalidade, etc. (FORDE *et al.*, 2011; PETER *et al.*, 2009).

### **2.1.1. Próestro e estro**

Quando a fase lútea está em seu final pela ausência de sinalização de reconhecimento de gestação por um concepto, a oxitocina liberada pelo corpo lúteo (CL) se liga a receptores de oxitocina presentes no endométrio uterino, promovendo a produção pulsátil de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ). A  $PGF_{2\alpha}$  tem como alvo o CL, para induzir a luteólise (FORDE *et al.*, 2011; GINTHER *et al.*, 2011). Inicia-se um ciclo em *feedback* positivo entre a secreção de oxitocina lútea e a  $PGF_{2\alpha}$  até que é desencadeada a apoptose celular lútea, que é em essência, a regressão do CL. A luteólise funcional e estrutural resulta em uma diminuição da esteroidogênese de síntese e secreção de P4, gerando uma redução do *feedback* negativo deste hormônio no centro pré-ovulatório no hipotálamo e na hipófise anterior, o que permite

um aumento na produção e secreção de GnRH, o que por sua vez causa um aumento na liberação essencialmente de LH, mas também de FSH (SARTORI; BARROS, 2011).

No próestro, folículos da onda anterior continuam a atresia se ainda não regrediram, enquanto uma nova onda folicular inicia ou continua a se desenvolver. Durante esta fase, com a remoção do *feedback* negativo da P4, a onda folicular que estiver em nova emergência, seja antes da luteólise e da atresia folicular, seja após a luteólise, irá prosseguir o crescimento até a dominância folicular (GINTHER *et al.*, 2001a,b). Com o subsequente desenvolvimento folicular inicialmente estimulado pelo FSH, um folículo se torna dominante (FD). Neste período crítico as células da teca e da granulosa do FD em expansão expressam maior número de receptores para LH na medida em que o desenvolvimento folicular progride, o que aumenta significativamente a produção e liberação de E2 (BAO; GARVERICK, 1998). O crescimento folicular está associado ao este aumento gradual na esteroidogênese, e por consequência, da secreção de E2. O FD secreta grandes quantidades de E2, que estimula o centro sexual para a mudança psicossomática comportamental de manifestação do estro, e por *feedback* positivo sobre o centro pré-ovulatório (pelo desbloqueio pela baixa P4), desencadeia uma secreção sustentada de GnRH, que levará à secreção em pico de LH (RAHE *et al.*, 1980; GONG *et al.*, 1996). Este fenômeno de *feedback* positivo causa pulsos de GnRH e LH mais intensos e mais frequentes como resultado do aumento do E2 circulante (WALTERS *et al.*, 1984). Com a manifestação do início dos sinais de estro, o qual é exibido por aproximadamente 90% das fêmeas sob tais condições endocrinológicas (ROELOFS *et al.*, 2005), encerra-se o próestro e inicia-se a fase de estro.

Os principais sinais comportamentais na fase de estro incluem a maior mobilidade e inquietação do animal, assim como a diminuição do apetite, a receptividade à monta, e a procura pelo contato com touros ou outras fêmeas (ROELOFS *et al.*, 2005). Além disso, sinais secundários como mudanças morfométricas do trato reprodutivo (aumento no

tamanho e na consistência do colo uterino e do tônus útero, presença de FD, hiperemia vulvar, assim como liberação de muco cervical translúcido) são presentes (VAN EERDENBURG *et al.*, 1996; PETER *et al.*, 2009; ROELOFS *et al.*, 2010). Estes sinais são acompanhados por um nível máximo de E2 na corrente sanguínea causando o pico de LH ovulatório (MOENTER *et al.*, 1990; ALLRICH, 1994) que ocorre entre 24 e 32 horas após o início do estro (BREWSTER; COLE, 1941; WALKER *et al.*, 1996), já no início do metaestro.

### 2.1.2. Metaestro e diestro

As alterações morfológicas e esteroidogênicas foliculares provocadas pelo LH incluem a transição das células residuais foliculares para células lúteas (O'SHEA *et al.*, 1989; HOWELL *et al.*, 1994). Este processo marca o início do metaestro que dura cerca de cinco dias após a ovulação. O processo de luteinização envolve a remodelação do estroma e do tecido vascular ovariano, levando à conversão celular e bioquímica das células da teca e da granulosa pela ação luteotrófica do LH (CUPP *et al.*, 1995; KOJIMA, 2003; RATHBONE *et al.*, 2001; NISWENDER *et al.*, 2000). No início, o processo gera uma cavidade cheia de sangue (*corpus hemorrhagicum*), o qual iniciará a síntese de pequena liberação de P4 (FORDE *et al.*, 2011; PETER *et al.*, 2009), posteriormente precedendo a a estrutura madura do CL (O'SHEA *et al.*, 1989; HOWELL *et al.*, 1994). No início, as células da granulosa formam as células grandes do CL, enquanto as células da teca formam as células menores. Com a remodelação do CL, as células grandes diminuem seu tamanho, o CL se internaliza mais no ovário, formando um CL maduro com gradual secreção de P4 (O'SHEA *et al.*, 1989), chegando ao diestro.

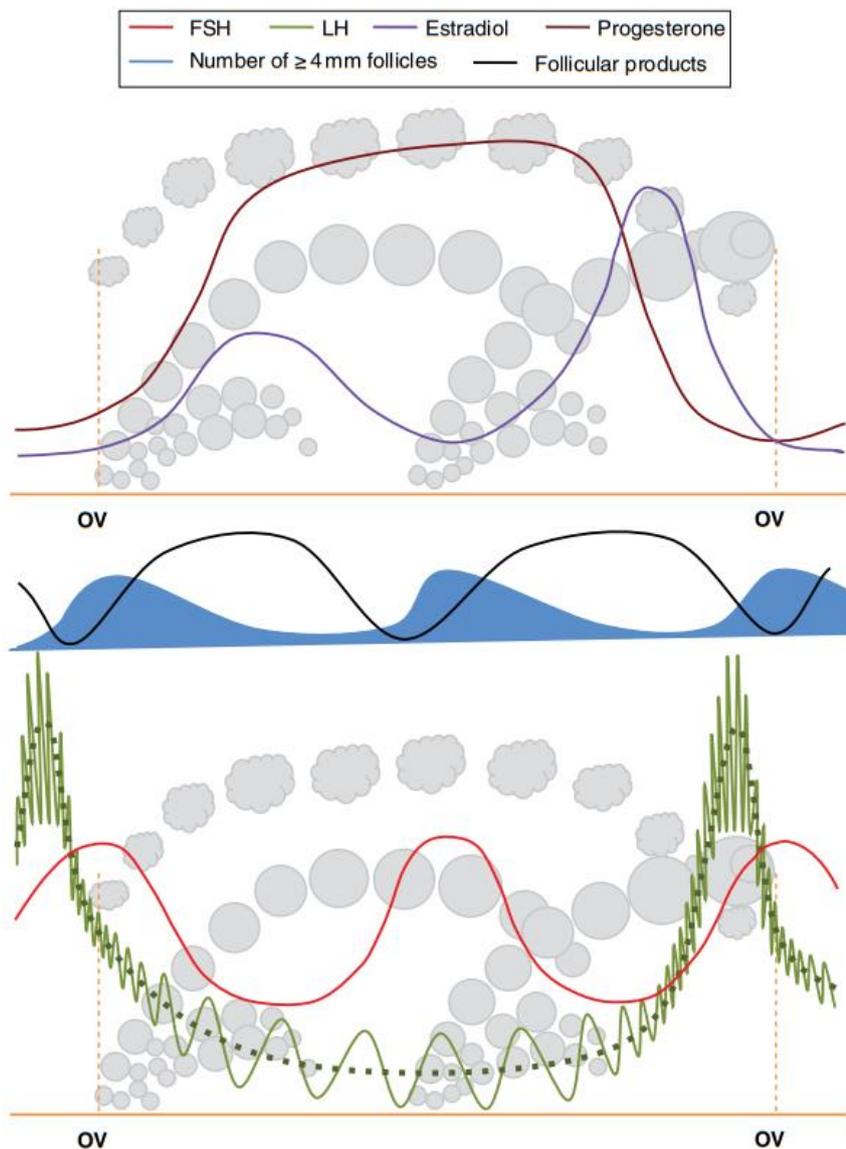
No diestro, o crescimento do CL em tamanho e volume celular atinge sua máxima capacidade; também há um notável aumento na vascularização (FORDE *et al.*, 2011;

HANSEL; CONVEY, 1983; KOJIMA, 2003; PETER *et al.*, 2009). O diestro é caracterizado pela secreção mais elevada e constante de P4, e também pela presença de receptores lúteos à  $PGF_{2\alpha}$  (LAMOTHE *et al.*, 1977). O pico de liberação da concentração sérica de P4 ocorre durante o diestro. Entre o sétimo e o décimo segundo dia do ciclo (após a ovulação), a concentração crescente de P4 atinge seu pico máximo e permanece elevada até a luteólise (ocorrendo por volta do décimo oitavo dia) (WILTBANK *et al.*, 1965; ADAMS; PIERSON, 1995). Estes níveis de P4 evitam a ocorrência de um pico de LH no centro pré-ovulatório através de um mecanismo de *feedback* negativo, permitindo apenas uma liberação baixa deste hormônio, que é mais pronunciada e menos frequente em comparação com a fase anterior, o que é insuficiente para induzir a ovulação quando há um FD (BERGFELD *et al.*, 1995; KOJIMA, 2003; PETER *et al.*, 2009; RATHBONE *et al.*, 2001).

O CL é essencial para a manutenção da prenhez, que se não ocorrer, determinará a regressão lútea (WILTBANK *et al.*, 1965). Se o reconhecimento materno pelo efeito do interferon  $\tau$  (IFN $\tau$ ) produzido nas células trofoblásticas do concepto não ocorrer entre os dias 16 e 18 (bloqueio da expressão de receptores para a oxitocina no endométrio), o processo de luteólise começará (AROSH *et al.*, 2016; GINTHER *et al.*, 2011; RATHBONE *et al.*, 2001; ROVANI *et al.*, 2017). Este processo é dirigido pela liberação da  $PGF_{2\alpha}$  no endométrio, que através de um mecanismo contracorrente ativo da artéria uterina para a artéria ovariana alcançará a irrigação do CL, que em efeito de *feedback* positivo, como descrito acima, causará a luteólise e queda nos níveis de P4 (LAMOTHE *et al.*, 1977), o que permitirá o reinício de um novo ciclo.

## 2.2. Dinâmica folicular durante o ciclo estral

Os ovários funcionam de forma cíclica. Isto foi baseado em observações de que o ovário consistia de vários grupos discretos de folículos, cada um dos quais funcionando em momentos diferentes durante o ciclo estral. Assim, foi estabelecido que o desenvolvimento e crescimento de folículos em fêmeas bovinas ocorrem em duas ou três ondas foliculares (PIERSON; GINTHER, 1986, 1987, 1988). Estas ondas são caracterizadas pelo crescimento ordenado e síncrono de uma coorte de folículos, os quais tem que passar sucessivamente por processos de recrutamento de uma coorte de folículos terciários responsivos ao FSH, posteriormente por uma seleção folicular, caracterizada pela divergência e dominância de um FD sobre outros folículos que se tornam subordinados (AERTS; BOLS, 2010a, b; DRIANCOURT, 1991; DRIANCOURT, 2001; FORTUNE, 1994; GINTHER *et al.*, 1996; GINTHER, 2016a, b; HODGEN, 1982; LUCY *et al.*, 1992; WEBB *et al.*, 2016). Tal processo sequencial e ordenado é denominado de dinâmica folicular, que ocorre em ondas nos ovários, cada qual passando pelo recrutamento de dezenas de folículos terciários FSH-responsivos, seleção folicular e finalmente a dominância folicular. Deste ponto em diante, o destino do FD dependerá do pico de LH, que por sua vez, dependerá da fase do ciclo estral e dos níveis plasmáticos de P4 (ADAMS *et al.*, 2002; ADAMS; SINGH, 2015).



**Figura 1.** Ilustração da inter-relação entre os hormônios circulantes (FSH, LH, E2, P4) e os efeitos sobre o diâmetro folicular durante o crescimento folicular e ao início do processo de desvio folicular em uma dinâmica folicular de duas ondas foliculares. Folículos dominante (FD) e subordinados (FS) em cada onda são indicados como círculos em cinza, e o corpo lúteo (CL) é a forma irregular em cinza desenhada acima dos folículos. O aumento da concentração de FSH precede o surgimento de cada onda. O número de folículos  $\geq 4$  mm flutua em resposta ao nível plasmático de FSH. Inicialmente, o FSH está estimulando todos os folículos FSH-responsivos, e a inibina é o primeiro supressor deste hormônio a ser liberado quando os folículos atingem 5 mm de diâmetro. A seleção ocorre contra os FS, onde o FD continua seu crescimento, enquanto seus subordinados diminuem a taxa de crescimento, pois ao início do processo de divergência, apenas o FD está preparado para manter seu desenvolvimento mesmo com as condições decrescentes de FSH. O FD de cada onda é a principal fonte de E2, e a produção é duas vezes mais alta no folículo pré-ovulatório em relação ao folículo anovulatório dominante. Com o desaparecimento por atresia ou ovulação do FD, os produtos foliculares responsáveis pela supressão da queda de FSH e concentrações circulantes de FSH são depurados, resultando no surgimento de nova onda folicular. Adaptado de Adams *et al.* (2002, 2014).

### 2.2.1. Recrutamento folicular

O FD na onda é aquele que cresce mais do que os outros (FS) e é dito que é "selecionado" para crescimento preferencial (BERGFELT *et al.*, 1991; GINTHER *et al.*, 1996). O início da formação de uma onda folicular é caracterizado pelo recrutamento de um grupo de folículos terciários ovarianos, dos quais apenas um folículo se tornará dominante e potencialmente ovulará se os níveis de P4 forem baixos até um nível mais próximo do basal (1 ng/mL) (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). Segundo Ireland *et al.* (2000), o recrutamento ou emergência é o processo pelo qual um grupo de folículos terciários emerge e começa a crescer quase sincronicamente ou se engajam em uma trajetória de crescimento e, como resultado, tornam-se dependentes de gonadotrofinas. Assim, a emergência de uma onda folicular é definida como o desenvolvimento síncrono de um grupo ou coorte de folículos de 4-5 mm de diâmetro (GINTHER *et al.*, 1989a,b; KNOPF *et al.*, 1989), que pode ir de 5 até 24 folículos por onda folicular (MIHM; AUSTIN, 2002), apresentando uma duração de crescimento comum por cerca de três dias nos bovinos (GINTHER *et al.*, 2003).

Cada onda folicular é precedida por uma elevação nos níveis de FSH (ADAMS *et al.*, 1992; JAISWAL *et al.*, 2004), pela redução nas concentrações circulantes de E2 pela atresia ou ovulação de um FD de uma onda anterior, aumentando o padrão pulsátil de GnRH pelo centro tônico (ADAMS *et al.*, 1992). A primeira onda, que ocorre durante a fase folicular inicial, tipicamente nos dias 3-5 do ciclo estral, é caracterizada por um rápido aumento do diâmetro folicular (2-3 mm/dia) a partir de folículos de 4 a 5 mm de diâmetro.

Além da onda inicial de desenvolvimento folicular, uma segunda onda ocorre nos dias 8-10 do ciclo, a qual é caracterizada por uma taxa de crescimento mais lenta (1-2 mm/dia) onde os folículos atingem de 4-8 mm de diâmetro (GINTHER *et al.*, 1989ab;

ADAMS *et al.*, 1993a). Em contraste, o FD da terceira onda atinge 10-15 mm de diâmetro (GINTHER *et al.*, 1996) nos dias 15-17, o qual tem uma secreção folicular crescente de E2 e inibina, pelo que os FS sofrem atresia (GINTHER *et al.*, 1989a, b; KNOPF *et al.*, 1989).

Os níveis de FSH são mais elevados durante a fase folicular inicial, quando ocorre a primeira onda de crescimento folicular. A seleção de um FD durante a fase folicular do ciclo ovariano é mediada por uma mudança no equilíbrio do FSH (GINTHER *et al.*, 1996). O crescimento seletivo do FD é alcançado pelo aumento da secreção de FSH pela glândula hipófise anterior. O FD produz mais E2 e inibina do que os FS, o que leva ao aumento do nível de E2 e inibina na corrente sanguínea a partir do FD, com o E2 inibindo o padrão pulsátil do centro tônico no hipotálamo e por consequência, a liberação de FSH da hipófise anterior, e a inibina inibindo os gonadotrofos na hipófise anterior, reprimindo ainda mais a secreção de FSH, resultando na atresia dos FS (GINTHER *et al.*, 1989c). As concentrações de E2 circulantes são mais elevadas na fase folicular inicial do ciclo e atingem um pico no momento que antecede o estro e a ovulação (WILTBANK *et al.*, 1967; PIERSON; ADAMS, 1995). Este aumento nas concentrações de E2 circulantes é considerado como resposta ao aumento da produção de E2 hormônio pelo FD (WILTBANK *et al.*, 1965; PIERSON; ADAMS, 1995). Aumentos secundários nas concentrações de E2 foram detectados durante a fase lútea do ciclo estral. Entretanto, estes aumentos são de menor magnitude do que aqueles observados durante a fase folicular (ADAMS *et al.*, 1995). Embora o FD seja caracterizado por concentrações crescentes de E2 e inibina, as concentrações desses hormônios diminuem após o pico de LH e ovulação (PIERSON; ADAMS, 1995).

### **2.2.2. Seleção folicular**

Em cada onda folicular, os folículos recrutados estarão sujeitos ao processo de seleção. Em animais monovulares, a seleção de folículos é um processo em que um folículo

é escolhido de uma coorte de folículos em desenvolvimento e se torna dominante, continuando a crescer até entrar em atresia ou ovular (PETER *et al.*, 2009; AERTS; BOLS, 2010b; GINTHER *et al.*, 2000b; 2016).

O processo de seleção envolve uma série de mudanças morfológicas e endocrinológicas, onde a diferença nas taxas de crescimento entre o folículo maior e o próximo do maior em uma onda é considerada o principal fator no processo (HODGEN, 1982). A fase comum de crescimento do desenvolvimento das ondas, que segue a emergência das ondas e as elevações na concentração de FSH, está ligada à parte decrescente subsequente da onda de FSH. Assim, os futuros FD e FS sofrem várias modificações em termos de processos hormonais locais que, em parte, controlam a queda nas concentrações de FSH (BEG *et al.*, 2002; GINTHER *et al.*, 2003).

Quando o FSH se eleva e atinge um platô, folículos terciários FSH-dependentes de 4 a 5 mm são recrutados (KULICK *et al.*, 1999; GINTHER *et al.*, 2015). Os níveis de FSH séricos na primeira onda folicular de um ciclo são normalmente expressos 28 horas após o início da fase estro (MIHM; AUSTIN, 2002), e depois durante os primeiros três dias da onda folicular recém-recrutada, quando os níveis de FSH começam a diminuir gradualmente em função do próprio crescimento dos folículos recrutados (ADAMS *et al.*, 1992; ADAMS *et al.*, 1993a). Mesmo que ainda estejam dependentes deste hormônio, os folículos em crescimento começam a produzir e liberar principalmente inibina, mas também pequenas quantidades de estradiol. Esta inibição gradual da secreção de FSH leva a níveis desta gonadotrofina que são insuficientes para que os folículos menores, recém-emergentes, mantenham seu crescimento, os quais entram em atresia, em processo de seleção e rumo a uma divergência de padrão de crescimento entre um futuro FD e os FS (GIBBONS *et al.*, 1999; MIHM; BLEACH, 2003; AERTS; BOLS, 2010b; GINTHER, 2016). Após a fase típica de crescimento dos folículos, o futuro FD e, em média, dois a quatro FS continuam

crescendo, mantendo a proliferação celular e a produção de estradiol apesar da redução na concentração de FSH. Isto ocorre porque os folículos podem manter altos níveis de expressão do mRNA receptor de FSH e sua capacidade de se ligar ao FSH, mesmo que mais baixo (EVANS; FORTUNE 1997; BAO; GARVERICK, 1998).

### 2.2.3. Desvio e dominância folicular

O termo "desvio folicular" foi cunhado para substituir o termo "divergência folicular" (PETER *et al.*, 2009). Os fenômenos de seleção e divergência que impulsionam o futuro crescimento folicular do FD até o estágio de dominância é o ponto de partida do período de dominância folicular, com o desvio folicular marcando a conclusão da fase de seleção (IRELAND *et al.*, 2000). A seleção do FD é determinada pelo processo de desvio folicular, que acontece em torno de 2,5 dias após a emergência da onda (PETER *et al.*, 2009).

Segundo Ginther *et al.* (2016), o padrão fisiológico de desvio folicular regular caracteriza-se por um futuro FD atingindo 8,5 mm em cerca de 2,5 dias, enquanto o tamanho dos FS estará na faixa de 7 mm ou menos. Porém, o diâmetro folicular nem sempre é um método confiável para determinar o estágio de desenvolvimento, particularmente quando há uma pequena diferença de tamanho entre os dois maiores folículos na avaliação. O padrão de desvio folicular pode estar subdimensionado, onde o FS não atinge o tamanho de 7 mm enquanto o futuro FD está próximo do tamanho de 8,5 mm. Com um padrão de crescimento folicular alterado, o futuro FD e o FS podem crescer para tamanhos muito próximos um do outro, o que envolve incerteza sobre qual folículo será o FD.

Quando um folículo atinge 10 mm de diâmetro, este é geralmente considerado dominante (GINTHER *et al.*, 1998; GINTHER *et al.*, 2003). Este processo refere-se aos aspectos endocrinológicos e fisiológicos do FD durante a fase de crescimento, tais como os níveis de E2 e a inibina, que indiretamente afetam a regressão dos FS e a supressão da

subsequente emergência de novas ondas pela supressão do FSH. O declínio na proporção intrafolicular de E2/P4 durante a dominância tem o objetivo de prepará-lo para a ovulação (MIHM *et al.*, 2006). O FD que não é exposto ao pico de LH sobreviverá por um breve período antes de se tornar atrésico (VALDEZ *et al.*, 2005). Durante este tempo, o FD depende de fatores de crescimento que estimulam a transição das fases G1 para as fases S do ciclo celular e preveem a apoptose das células de granulosa (QUIRK *et al.*, 2004). Com a atresia e a depuração do E2 e da inibina do FD desta onda, o centro tônico é desinibido e aumenta o padrão pulsátil de GnRH, que elevará os níveis de FSH, iniciando uma nova onda folicular. Porém, com a queda abrupta nos níveis de P4 causada pela luteólise, o FD aumentará ainda mais os níveis de E2, estimulando o centro sexual às mudanças comportamentais do estro, e o centro pré-ovulatório do hipotálamo em descarregar GnRH, que por sua vez causará o pico de LH, levando então ao desenvolvimento do FD em folículo pré-ovulatório e à ovulação (AERTS; BOLS, 2010b; FORDE *et al.*, 2011), conforme já descrito acima.

### **2.3. Uso de hormônios exógenos para manipular o ciclo reprodutivo: a inseminação artificial em tempo fixo**

Uma variedade de técnicas de manejo pode ser usada para aumentar a eficiência reprodutiva, mas as biotécnicas da reprodução podem acelerar o processo. Em termos gerais, as biotécnicas, como a inseminação artificial (IA), a congelamento de gametas e a sincronização de estros e IA em tempo fixo (IATF) amadureceram em aplicações comerciais bem-sucedidas, facilitando o aumento da produção através da genética, a redução do intervalo entre gerações, o controle de enfermidades e a redução dos custos de produção (BERTOLINI; BERTOLINI, 2009; THIBIER, 2005). Neste contexto, as biotécnicas da

reprodução se tornaram ferramentas de gerenciamento crucial (DISKIN, 2018; HARSTINE *et al.*, 2018).

A IA se tornou a principal biotécnica para o desenvolvimento genético no setor pecuário. A fim de desenvolver esta biotécnica em um método viável e eficaz, muitos desafios tiveram que ser resolvidos. A IA em animais remonta alguns séculos. No século XVII, o cientista italiano Lazzaro Spallanzani realizou experimentos com animais para estudar a fertilidade e a reprodução, e realizou a primeira IA com sucesso em caninos (FOOTE, 2001; ORLAND, 2017). No final do século XIX, Ivanoff começou o trabalho pioneiro na Rússia para estabelecer a IA como um processo viável em cães, raposas, cavalos, coelhos e aves (IVANOFF, 1922). Anos mais tarde, Walton (1933) foi um pioneiro ao transportar sêmen de carneiro durante dois dias, sendo posteriormente utilizado para inseminar ovelhas com sucesso. Entretanto, a técnica não foi amplamente utilizada de imediato devido à falta de conhecimento sobre os ciclos estrais e à falta de tecnologia apropriada nas diversas espécies animais. Na década de 1940, pelo desenvolvimento de um diluente a base de gema de ovo e fosfato (PHILLIPS; LARDY, 1940) e melhorado com um diluente tamponando a base de gema de ovo e citrato de sódio (SALISBURY *et al.*, 1941), a IA com sêmen diluído e refrigerado tornou-se prática comum nas fazendas leiteiras na Europa e nos Estados Unidos (SALISBURY *et al.*, 1978; FOOTE, 2002).

Passados mais de 80 anos desde a implementação comercial, inicialmente com sêmen refrigerado, a IA foi significativamente desenvolvida e melhorada, em especial após a criopreservação, a partir da década de 1950. Embora tenha se tornado uma biotécnica comumente utilizada para melhorar a produção em bovinos de corte e leite e para melhorar a genética de diferentes espécies, um estudo de 2017 pelo Sistema Nacional de Monitoramento e Saúde Animal (*USDA National Animal Health Monitoring System*, 2020)

documentou que apenas 5,5% e 15,1% dos programas de inseminação em vacas e novilhas de carne, respectivamente, nos EUA utilizam a IA nos rebanhos (USDA, 2020).

A necessidade de controle do estro para a IA diminuiu de importância a partir de meados dos anos 1990 em muitos sistemas de produção na medida em que as pesquisas sobre protocolos de manipulação do ciclo estral e da sincronização de uma nova onda folicular usando hormônios exógenos evoluíram (MOORE; HASLER, 2017; STEVENSON; BRITT, 2017). Os protocolos hormonais para a IATF consistem em uma manipulação intencional da função ovariana empregando hormônios exógenos para promover que a fêmea seja inseminada em um determinado momento sem a detecção do estro (BÓ; BARUSELLI, 2014). Assim, uma vantagem da IATF sobre os protocolos de sincronização do estro é que a identificação do estro não é necessária, com todas as fêmeas sendo inseminadas ao mesmo momento. Mesmo que nem todos os animais exibam estro antes da IATF, a observação frequentemente produz taxas de prenhez comparáveis àquelas obtidas usando procedimentos convencionais de detecção de estro (PURSLEY *et al.*, 1995). Esta estratégia da IATF permite encurtar a estação de parição, promover ciclicidade das fêmeas e a uniformidade nos bezerros, diminuir o número de touros necessários para o serviço natural e aumentar a proporção de fêmeas que concebem no início da estação reprodutiva (PURSLEY *et al.*, 1995; BÓ; BARUSELLI, 2014).

Existem três tipos básicos de protocolos hormonais para IATF atualmente utilizados em bovinos de corte, combinados com dispositivos intravaginais de liberação de P4: (a) protocolos com GnRH, em especial usados para o gado leiteiro, (b) protocolos com ésteres de estradiol (E2), como o benzoato (BE) e o ciponato de estradiol (CE), em especial para o gado de corte, e (c) protocolos com EB e GnRH, como o J-Synch (PURSLEY *et al.*, 1995; BÓ *et al.*, 2016; DE LA MATA *et al.*, 2018; MADUREIRA *et al.*, 2020a,b). O uso destes hormônios (GnRH, BE) visa a sincronização do início da emergência da onda folicular do

protocolo, o controle das concentrações de P4 circulante para regular tanto os padrões de crescimento do folículo pré-ovulatório e o ambiente uterino, quanto o tempo de estro/ovulação, e sincronizar o tempo de ovulação para permitir a IA no final do protocolo (MADUREIRA *et al.*, 2020a; CONSENTINI *et al.*, 2021).

Qualquer programa que pretenda sincronizar o ciclo estral com ou sem a detecção do estro requer a sincronização das ondas foliculares (NASSER *et al.*, 1993; BÓ *et al.*, 2002). O protocolo OvSynch (GnRH - 7 dias/PGF<sub>2α</sub> - 48h/GnRH - 16h/IATF), desenvolvido em meados dos anos 1990 para bovinos de leite, foi um dos primeiros esforços para consolidar o que se conhece hoje por IATF (PURSLEY *et al.*, 1995). Neste protocolo, o GnRH estimula a liberação de LH, o que provoca a ovulação ou luteinização de um folículo dominante (FD) que esteja presente nos ovários. Com isto, o impacto endócrino inibitório do FD na secreção de FSH é eliminado, havendo a emergência de uma nova onda (McMILLAN; THATCHER, 1991; PURSLEY *et al.*, 1995; BÓ *et al.*, 1995b). Se o GnRH for administrado na fase de crescimento tardio ou estático precoce do desenvolvimento folicular, ao contrário de outras fases de crescimento folicular, é mais provável que o FD ovule (MARTINEZ *et al.*, 2000).

Semelhante ao efeito do tratamento com GnRH para estimular uma nova onda folicular, também passaram a ser empregados ésteres de E2 (BÓ *et al.*, 1995b). Quando foram administrados 5 mg de valerato de E2 (VE) um dia após a ovulação (durante a fase inicial de crescimento) em novilhas com dispositivos de P4, foi observada atresia folicular, o que causou um aumento de FSH e o desenvolvimento precoce da onda folicular seguinte (BÓ *et al.*, 1993). Resultados similares foram obtidos em vacas, onde uma única injeção de 5 mg de 17β-estradiol gerou a supressão folicular bem-sucedida e favoreceu o desenvolvimento sincronizado de uma nova onda folicular 4 a 5 dias depois (BÓ *et al.*, 1994b).

Embora o mecanismo pelo qual o E2 sincroniza a emergência de uma nova onda folicular não seja totalmente conhecido, foi proposto que o E2 inibe o centro tônico liberador de GnRH no hipotálamo, que por sua vez causa a redução nos níveis de FSH, o que inibe o crescimento dos folículos FSH-dependentes (BÓ *et al.*, 1993). Estes protocolos com ésteres de E2 acompanhados por um dispositivo liberador de P4 gera o surgimento sincrônico de uma nova onda quatro dias após iniciar o tratamento (BÓ *et al.*, 1994b; BÓ *et al.*, 1995a). Neste contexto, a supressão dos pulsos de LH pela P4 parece inibir o desenvolvimento de folículos que dependem do LH enquanto aumenta os efeitos do E2 (SAVIO *et al.*, 1993; BÓ *et al.*, 1995b).

### 2.3.1. Fatores que afetam o sucesso dos programas de IATF

Apesar do progresso significativo e da intensificação da IATF nos programas reprodutivos bovinos (SÁ FILHO *et al.*, 2010; BÓ *et al.*, 2019), em geral, as taxas de P/IA têm permanecido entre 40 e 60% por muitos anos (MENEGHETTI *et al.*, 2009; SA FILHO *et al.*, 2009; BÓ *et al.*, 2013; BARUSELLI *et al.*, 2012; BÓ; BARUSELLI, 2014; WILTBANK; PURSLEY, 2014, MARTÍNEZ *et al.*, 2004a, b; SIQUEIRA *et al.*, 2008; BÓ *et al.*, 2016; LAMB; MERCADANTE, 2016). Fatores limitantes de um incremento nestes índices necessitam ser melhor reconhecidos, avaliados e manipulados.

O sucesso da concepção requer a interação sinérgica entre um oócito saudável com um espermatozoide capaz de se manter viável no trato reprodutivo feminino, até o momento da fecundação. Várias pesquisas têm demonstrado que as limitações da IATF para superar essas taxas de P/IA são resultado de eventos multifatoriais sinérgicos que dependem de eventos multifatoriais intrínsecos (condição corporal, raça do animal, idade dos animais,

categoria animal como novilhas ou vacas, primíparas ou múltiparas, *status* de ciclicidade, dias pós-parto, tamanho do folículo ovulatório e tempo de inseminação em relação à ovulação, etc.) (PERRY *et al.*, 2007; MENEGHETTI *et al.*, 2009; SÁ FILHO *et al.*, 2009, SARTORI *et al.*, 2016), e extrínsecos (reprodutores, rebanho, técnicos, nutrição, sanitários, meio ambiente, protocolos de manejo e sincronização entre outros) (BEDERE *et al.*, 2018; FAIR; LONERGAN, 2018; UNGERFELD *et al.*, 2021). Compreender a interação destes fatores é chave para a aplicação de medidas que incrementem as taxas de prenhez após a IATF sob diferentes circunstâncias.

A conseqüente variação no desenvolvimento folicular, expressão do estro e tempo de ovulação na conclusão do protocolo de IATF pode resultar em baixa taxa de prenhez. Com a minimização de diferenças entre fêmeas no que diz respeito ao momento da expressão do estro e, por fim, da ovulação, os protocolos de IATF permitem um maior controle sobre o ciclo estral para maximizar as taxas de prenhez. Em vacas, a capacidade de um regime hormonal para sincronizar o tempo de expressão do estro e ovulação pode variar de acordo com os dias pós-parto, escore de condição corporal e paridade (CONSENTINI *et al.*, 2021). A sincronicidade no tempo de expressão do estro pode ser melhorada e possivelmente levar a taxas mais altas de P/IA em protocolos de IATF que considerem a variação no estágio do ciclo estral entre fêmeas no início do tratamento (CONSENTINI *et al.*, 2021).

Outro aspecto a ser considerado com respeito à sincronização da ovulação é que nem todas as fêmeas que exibem estro serão inseminadas no momento mais adequado em relação à ovulação devido a condições logísticas e a condições associadas à qualidade seminal, por exemplo. Além disso, nem todas as fêmeas expressarão estro antes ou depois da IATF, e ainda sim, alcançarão a concepção. É exatamente esta a estratégia que permite que todos os animais sejam inseminados de uma só vez sem a necessidade da detecção do estro. Em estudos anteriores (GALVO *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2016; POHLER *et al.*, 2016),

verificou-se que as fêmeas que expressam estro próximo à IATF têm taxas de P/IA maiores do que as que não expressam estro, o que pode ser explicado pelas maiores concentrações de E2 sérico derivado de FD de fêmeas que expressaram estro 24 h antes da IA (PERRY *et al.*, 2007; JINKS *et al.*, 2013), demonstrando sincronia adequada da ovulação. Então, neste contexto, é crucial se obter o máximo de animais expressando o estro ou que pelo menos apresentem um folículo pré-ovulatório fisiologicamente maduro no momento da IATF, objetivo final óbvio dos protocolos de IATF (ATKINS *et al.*, 2010; JINKS *et al.*, 2013).

Quando a IATF é utilizada, a regulação ineficaz da dinâmica folicular e luteal no início do protocolo pode levar a baixas taxas de P/IA. Pohler *et al.* (2012) documentaram que a redução da fertilidade pode resultar da ovulação induzida de um folículo fisiologicamente incompetente durante a IATF. Alguns estudos têm destacado que o diâmetro menor do folículo poderia causar falha na ovulação e subsequentemente baixas taxas de P/IA (PERRY *et al.*, 2007; PERRY *et al.*, 2005; LAMB *et al.*, 2001; SÁ FILHO *et al.*, 2010) e/ou redução da sobrevivência embrionária, menor taxa de fecundação, resultado provavelmente tanto da maturidade folicular quanto da competência oócitaria (MOOREY *et al.*, 2021; READ *et al.*, 2021). Desta forma, a otimização do tamanho do FD se tornou um fator crítico prioritário para melhorar o sucesso nos programas de IATF (WILTBANK *et al.*, 2011; BARUSELLI *et al.*, 2012; PFEIFER *et al.*, 2015; TARSO *et al.*, 2016; NÚÑEZ-OLIVERA *et al.*, 2020; KORNMATITSUK; KORNMATITSUK, 2021). De fato, o tamanho do FD é um preditor chave associado à resposta ovulatória (LAMB *et al.*, 2010; PUGLIESI *et al.*, 2016), com aumento da concentração de E2 (PERRY *et al.*, 2007; ATKINS *et al.*, 2010), maior expressão de estro comportamental próximo à IATF (RODRIGUES *et al.*, 2018; OOSTHUIZEN *et al.*, 2020), tempo mais adequado para a ovulação (PFEIFER *et al.*, 2015), melhor função lútea (ECHTERNKAMP *et al.*, 2009; ATKINS *et al.*, 2010; DADARWAL *et al.*, 2013; PUGLIESI *et al.*, 2016), e maiores taxas de P/IA (PERRY *et al.*,

2005; PERRY *et al.*, 2007; SÁ FILHO *et al.*, 2010a,b). Recentemente Moorey *et al.* (2021) e Read *et al.* (2021) demonstraram uma composição diferencial de metabólitos entre folículos pequenos ( $\leq 11.7$  mm) e grandes ( $\geq 12.7$  mm) quando foram expostos a um pico de LH induzido por GnRH exógeno, o que teve um efeito direto sobre a competência do oócito (READ *et al.*, 2021).

Os protocolos iniciais de sincronização da ovulação em programas de IATF em bovinos de corte empregava frequentemente o protocolo Co-Synch com dispositivo de P4 por 7 dias (BÓ *et al.*, 1995). Porém, como o protocolo começa com a administração de GnRH, somente as vacas que tem a chance de ter um folículo LH-responsivo no início do procedimento irão ovular/luteinizar em resposta ao GnRH. Além disso, aproximadamente 35% das vacas não ovularam em resposta ao GnRH (GEARY *et al.*, 2000; VASCONCELOS *et al.*, 1999). Estudos adicionais destacaram que devido ao estágio do FD no momento do tratamento, uma única administração de GnRH reduziu significativamente o tempo (1,5 a 2 dias) entre o tratamento de GnRH e a emergência de uma nova onda folicular, mas foi insuficiente para sincronizar com sucesso a emergência da nova onda (BODENSTEINER *et al.*, 1996; MARTINEZ *et al.*, 2000).

No mesmo contexto, os regimes de tratamento baseados em ésteres de E2 e P4, embora possam promover a ciclicidade em vacas em condição de anestro (BARUSELLI *et al.*, 2004; SÁ FILHO *et al.*, 2010; BÓ *et al.*, 2016; MAPLETOFT *et al.*, 2018; BOSOLASCO *et al.*, 2021; TSCHOPP; BÓ 2022), também devem garantir a atresia dos folículos da onda anterior, e o recrutamento e o surgimento de uma nova onda folicular (BÓ *et al.*, 2003). A maior limitação do uso do BE é a resposta dose-dependente para induzir a atresia (BURKE *et al.*, 2003), o que pode resultar no fracasso da regressão folicular, produzindo folículos persistentes (BRIDGES *et al.*, 1999; MONTEIRO *et al.*, 2015; CONSENTINI *et al.*, 2021), ou retardando o tempo de aparecimento de uma nova onda

folicular (BÓ *et al.*, 1995; BURKE *et al.*, 2001; DISKIN *et al.*, 2002; BURKE *et al.*, 2003; MCDOUGALL *et al.*, 2004; Madureira *et al.*, 2020), que por sua vez promove a assincronia tanto nos padrões de crescimento do folículo pré-ovulatório futuro quanto no tempo de expressão do estro e da ovulação (FIKE *et al.*, 1997; SÁ FILHO *et al.*, 2010; SALES *et al.*, 2012; BARBOSA *et al.*, 2022). No final do protocolo, estas variações nas respostas das vacas ao GnRH e ao BE efetivamente separam as fêmeas em duas subpopulações com desenvolvimento folicular diferente, o que poderia levar a menores proporções de expressão do estro, além de maior variabilidade no tempo de início da ovulação. Este fenômeno é exacerbado pela menor viabilidade das doses de sêmen congelado comumente usadas durante os programas de IATF, os quais têm baixa capacidade de manter a viabilidade por um período suficientemente longo no trato reprodutivo feminino para alcançar a interação sinérgica com os oócitos decorrentes da ovulação retardada (COHEN-DAYAG *et al.*, 1995).

#### **2.4. Uso do sêmen criopreservado e refrigerado na IATF**

A competência funcional dos espermatozoides é um dos fatores-chave para se obter ótimas taxas de P/IA nos programas de IATF (KUMARESAN *et al.*, 2017; DISKIN, 2018; HARSTINE *et al.*, 2018), pois somente espermatozoides viáveis com uma membrana intacta e acrossoma funcional conseguem povoar, ligarem-se ao epitélio do istmo tubárico e capacitar, criando um reservatório de espermatozoides, o que aumentará as chances dos espermatozoides competentes fecundarem o oócito ovulado (ŠTIAVNICKÁ *et al.*, 2023). Se falho, isto é especialmente crítico se considerarmos que atualmente o sêmen criopreservado compreende 98% do sêmen utilizado em programas de IATF (BARUSELLI *et al.*, 2022), o que demonstra que o sêmen congelado pode ser uma ferramenta crítica no

manejo de programas comerciais de produção bovina (DISKIN, 2018; HARSTINE *et al.*, 2018; NOGUEIRA *et al.*, 2019).

A consideração do tipo de sêmen usado nos protocolos de IATF depende em grande parte do intervalo entre o tempo que ocorre a ovulação e a viabilidade média de sobrevivência dos espermatozoides, a qual muda segundo o tipo de sêmen (fresco, refrigerado ou criopreservado) (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Apesar das pesquisas com sêmen refrigerado em animais domésticos ter iniciado nos anos 1920, só nos anos 1940 é que o sêmen foi colocado em uso comercial quando desenvolveram o diluente tamponando a base de gema de ovo com citrato de sódio (SALISBURY *et al.*, 1941). No entanto, após o descobrimento do glicerol (POLGE *et al.*, 1949; PEGG, 2002), o uso de sêmen refrigerado gradualmente caiu para segundo plano em bovinos.

Mesmo com os benefícios da criopreservação de sêmen, os espermatozoides estão sujeitos a mudanças estruturais, metabólicas e funcionais deletérias durante e após o processo de criopreservação (CORMIER; BAILEY, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2012; SATAKE *et al.*, 2018; SCHNOBRICH, 2018; WATSON, 2000), tais como mudanças da permeabilidade e fluidez da membrana, geração de radicais livres, desestabilização do citoesqueleto, desequilíbrio iônico, fragmentação do DNA, distúrbios nas interações macromoleculares e modificações proteicas, RNA e epigenéticas (PINI *et al.*, 2018; YANEZ-ORTIZ *et al.*, 2022), menor fertilidade e subsequente menores taxas de P/IA.

Interessantemente no Brasil, a publicação inicial de Garcia *et al.* (1999) retomou a prática de utilização de sêmen refrigerado em bovinos. Desde então, o sêmen refrigerado foi reincorporado ocasionalmente nos últimos anos em programas de IATF tanto em pesquisa (BUCHER *et al.*, 2009; CRESPILO *et al.*, 2012; CRESPILO *et al.*, 2014; PAPA *et al.*, 2015; BORGES-SILVA *et al.*, 2016; SATAKE *et al.*, 2018; RESENDE *et al.*, 2018; PYTLÍK *et al.*, 2020; TIPPENHAUER *et al.*, 2021), quanto no campo comercial em países

como Irlanda (MURPHY *et al.*, 2013; MURPHY *et al.*, 2017), Nova Zelândia (YANG *et al.*, 2018), e Austrália (SATAKE *et al.*, 2018).

A questão da curta viabilidade do sêmen congelado é um dos problemas que tem sido tratado de diversas maneiras. Fatores como o meio de armazenamento, temperatura e outras condições devem ser considerados para preservar a capacidade fecundante do sêmen (VISHWANATH; SHANNON, 1997; LONERGAN, 2018). Sem diminuir significativamente a fertilidade, o sêmen refrigerado pode ser mantido em diluentes como o Caprogen<sup>®</sup> por até três dias (VERBERCKMOES *et al.*, 2005). De acordo com Vishwanath & Shannon (2000), o sêmen refrigerado por 48 horas foi eficaz em manter a viabilidade e atingir taxas de não retorno ao estro de 68,1%. Já Vishwanath & Shannon (2000) e Bucher *et al.* (2009) demonstraram que é possível reduzir o número de espermatozoides por dose inseminante usando sêmen refrigerado. Os resultados de Vishwanath & Shannon (2000) utilizando  $4 \times 10^6$  espermatozoides,  $6 \times 10^6$  espermatozoides, e  $8 \times 10^6$  espermatozoides por IA mostraram taxas de não-retorno ao estro de 73%. Bucher *et al.* (2009) utilizaram  $4 \times 10^6$  espermatozoides/dose com sêmen refrigerado por 24 horas, e não demonstraram diferenças nas taxas de P/IA.

Quando os danos espermáticos e as taxas de P/IA são comparados, alguns estudos demonstraram que a refrigeração por até 24 horas gera menos danos e promove melhores taxas de P/IA na IATF quando comparados ao sêmen congelado (PAPA *et al.*, 2015; BORGES-SILVA *et al.*, 2015; CRESPILO *et al.*, 2008). Além disso, Crespilho (2012) documentou uma P/IA maior usando sêmen refrigerado por 48 horas quando comparado ao sêmen criopreservado. Entretanto, uma pesquisa subsequente usando o sêmen refrigerado pelo mesmo período, relatou uma menor P/IA (CRESPILO *et al.*, 2014), dados que sugerem que o fator macho associado a diferentes composições lipídicas das membranas

plasmáticas podem desempenhar um papel fundamental para a determinação do sucesso ou fracasso do uso do sêmen refrigerado (MURPHY *et al.*, 2017).

Como apresentado na Tabela 1, estudos têm avaliado os efeitos da concentração espermática, do tipo de palheta, da composição do diluente, do tempo e da temperatura utilizados sobre as taxas de prenhez após a IA. Muitas vezes não é viável comparar os resultados de vários estudos focados na avaliação do desempenho de sêmen refrigerado ou criopreservado sobre a P/IA em bovinos de corte e leite devido aos desenhos experimentais heterogêneos, ao número de espermatozoides utilizados por palheta variar, os componentes e suplementos dos diluentes serem distintos, a temperatura e tempo de armazenamento, a categoria de fêmeas usadas nos experimentos, e os protocolos hormonais serem diferentes (BORCHARDT *et al.*, 2018; BORGES-SILVA *et al.*, 2019; TIPPENHAUER *et al.*, 2021). Em geral, enfatiza-se que o uso de sêmen refrigerado diluído em Tris-gema de ovo ou diluente comercial a 5°C por até 24 horas atingem taxas de P/IA 5% a 15,8% maiores em programas de IA/IATF, considerando o sêmen congelado convencional como padrão (59,9% vs 49,4%, BORGES-SILVA *et al.*, 2016; 61,49% vs 45,71%, CRESPILO *et al.*, 2012; 51% vs 41%, PAPA *et al.*, 2015; 64,5% vs 44,7%, RESENDE *et al.*, 2018), respectivamente. Quando comparado com sêmen congelado contendo  $20 \times 10^6$  espermatozoides/dose, o uso de sêmen fresco a uma concentração de  $3 \times 10^6$  espermatozoides/dose não resultou em diferenças nas taxas de P/IA (BUCHER *et al.*, 2009).

**Tabela 1.** Resultados de estudos da literatura com diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre o uso de sêmen bovino refrigerado (R) e/ou congelado (C) na IA ou na IATF de fêmeas bovinas de corte ou de leite

Referência	Objetivo	Nº touros	Dose IA (x 10 <sup>6</sup> )	Diluentes	Parâmetros espermáticos	Nº fêmeas	Categoria	Raça	P/IA
BUCHER <i>et al.</i> , 2009	P/IA com sêmen criopreservado (20x10 <sup>6</sup> spm/dose) vs refrigerado (3x10 <sup>6</sup> spz/dose)	2	10 (C) 3 (R)	Padrão	MT TTR INT. ACR.	1455	Múltiparas	Angus	50,4 (C) 51,5 (R)
CRESPILHO <i>et al.</i> , 2012	P/IA com sêmen refrigerado a 5°C por 24 h	1	30	Botubov®	DT MT	349	Múltiparas com cria ao pé	Nelore	45,7 (C) 61,5 (R)
CRESPILHO <i>et al.</i> , 2014	P/IA com sêmen refrigerado a 5°C por 48 h com e sem glicerol	20	30	Tris Botu-Bov® Botu-Bov®-Lecithin	DT MT CASA INT. ACR. INT. MEM.	973	Múltiparas com cria ao pé	Nelore	25,3 (Tris) 26,3 (Botu-Bov®) 33,3 (Botu-Bov®-Lecithin)
PAPA <i>et al.</i> , 2015	P/IA com sêmen refrigerado a 5°C por 24 h com e sem glicerol	30	40	Botu-Bov® sem glicerol Botu-Bov® com glicerol	DT MT CASA INT. ACR. INT. MEM. ROS FRAG. DNA	762	Múltiparas	Nelore	51,0 (C) 44,0 (R)
BORGES <i>et al.</i> , 2016	P/IA com sêmen refrigerado a 5°C por 24 h com e sem glicerol	3	25	Padrão	MT HIPO TTR	346	Múltiparas	Nelore	50,0 (R glicerol) 53,0 (R sem glicerol)
BORGES-SILVA <i>et al.</i> , 2016	P/IA com sêmen criopreservado vs refrigerado a 5°C por 24 h	3	25	Padrão	DT MT HIPO TTR	838	Múltiparas com cria ao pé	Nelore	49,4 (C) 59,9 (R)
RESENDE <i>et al.</i> , 2018	P/IA com sêmen resfriado vs congelado	2	20	Botubov®	NR	152	Múltiparas	Girolando	44,7 (C) 64,5 (R)
SATAKE <i>et al.</i> , 2018	P/IA com sêmen criopreservado vs refrigerado por 48 h	3	6	Padrão	DT MT CASA CITO FLUXO	352	Múltiparas	Brahman	53,2 (C) 31,6 (R)
BORGES-SILVA <i>et al.</i> , 2020	P/IA com sêmen refrigerado a 5°C por 24 e 48 h com dois diluentes comerciais	5	30	Botubov® INRA 96®	DT MT	946	Múltiparas	Nelore	49,3 (24 h) 49,6 (48 h)
PYTLÍK <i>et al.</i> , 2020		39	7,5	Andromed®	NR	3979	Múltiparas	Holandês	30,6 (C)

	P/IA com sêmen criopreservado e refrigerado a 5°C								35,6 (R)
SILVA <i>et al.</i> , 2020	P/IA com sêmen refrigerado a 5°C por 24 e 48 h	3	30	Padrão	NR	257	Múltiparas solteiras	NR	52,6 (24 h) 52,1 (48 h)
SILVA <i>et al.</i> , 2020	P/IA com sêmen criopreservado e refrigerado a 5°C por 72 h	5	30	Padrão	NR	NR	NR	NR	39,4 (C) 21,6 (R)
SILVA <i>et al.</i> , 2020	P/IA com sêmen criopreservado e refrigerado a 5°C por 24 h com diferentes tipos/palhetas	2	30	NR	NR	196	Novilhas	NR	40,2 (C) 48,9 (R)
SILVA <i>et al.</i> , 2020	P/IA com sêmen refrigerado a 5°C por 24 e 48 h	3	30	Padrão		257	Múltiparas solteiras	NR	52,6 (24 h) 52,1 (48 h)
WIEBKE <i>et al.</i> , 2023	P/IA com sêmen refrigerado ou congelado em fêmeas com ovulação atrasada	4	9 (R) 25 (C)	Caprogen® BioXce®	MT	667	Primíparas Múltiparas	Holandês	46,8% (R) 27,7% (C)

**Siglas, abreviações e definições.** Padrão: diluentes a base de TRIS-gema de ovo; DT: Defeitos totais; MT: Motilidade total; CASA: Análise computadorizada; INT. ACR: Integridade do acrossoma; HIPO: Teste hiposmótico; INT. MEM.: Integridade de membrana; ROS: espécies reativas do oxigênio; FRAG. DNA: Fragmentação do DNA. C: Congelado; R: Refrigerado. NR: Não relatado.

Inconsistências nas taxas de P/IA observadas entre os estudos utilizando sêmen refrigerado poderiam se dever principalmente à redução do número de espermatozoides por palheta ( $3 \times 10^6$  espermatozoides/dose, BUCHER *et al.*, 2009;  $5 \times 10^6$  espermatozoides/dose, MURPHY *et al.*, 2015; MURPHY *et al.*, 2017;  $10 \times 10^6$  espermatozoides/dose, TIPPENHAUER *et al.*, 2021), tempo de armazenamento ou diluente usado (CRESPILHO *et al.*, 2014; MURPHY *et al.*, 2017, 2018), o protocolo hormonal usado, tempo de inseminação (BUCHER *et al.*, 2009; RICHARDSON *et al.*, 2017; TIPPENHAUER *et al.*, 2021), condições de manuseio e armazenamento de sêmen (MURPHY *et al.*, 2015; SATAKE *et al.*, 2017).

Segundo a literatura (Tabela 1), existem inúmeras diferenças relativas ao custo-benefício, à qualidade da mão de obra, a supervisão do processamento, o tempo para manter a viabilidade espermática, a escolha do diluente, a logística e os equipamentos. Além disso, não existem estudos que determinem as associações entre a P/IATF usando sêmen refrigerado e congelado, considerando o estado de ciclicidade, a expressão do estro, e a morfometria folicular ovariana.

## 2.5. Ciclicidade e ferramentas para avaliação da função reprodutiva

A prevalência do anestro por aciclia tem um impacto deletério sobre a fertilidade, especialmente durante o período pós-parto (PETER *et al.*, 2009). Antes do primeiro ciclo estral após o parto, há um período de quiescência ovariana, que é conhecido como anestro pós-parto. Após o parto, o anestro reduz a competência funcional do HHG por um tempo (SHORT *et al.*, 1990). Devido a uma maior sensibilidade do hipotálamo ao *feedback* negativo do E2 durante o anestro, a liberação de GnRH é reduzida (ACOSTA *et al.*, 1983), e o FSH e o LH são liberados com menor frequência e em menores quantidades (SHORT *et al.*, 1972, 1990). Nesta fase, a dinâmica de crescimento folicular é semelhante à da fase lútea, durante a qual os folículos crescem em padrões ondulatórios, mas se tornam atrésicos em distintas fases da dinâmica e não ovulam (AERTS; BOLS, 2010b; FORDE *et al.*, 2011).

A duração do anestro pós-parto pode ser influenciada por uma variedade de variáveis agindo em conjunto ou separadamente. Esta condição é o principal fator que afeta a recria e concepção precoce no início da temporada reprodutiva em bovinos de corte (SHORT *et al.*, 1990; BÓ *et al.*, 2003; ARAGUNDE VIEYTES *et al.*, 2023). A retomada dos ciclos ovarianos férteis nestas condições está intimamente associada ao estado nutricional (RICHARDS *et al.*, 1986; D'OCCHIO *et al.*, 1990; VIZCARRA *et al.*, 1998), saúde física, época de parição, idade da fêmea, presença de bezerros e estado de amamentação (RANDEL, 1990; YAVAS; WALTON 2000), condições que coletivamente podem suprimir o GnRH e consequentemente o FSH e a frequência dos pulsos do LH (WRIGHT *et al.*, 1992; RASBY *et al.*, 1992; ROCHE *et al.*, 1992).

Previamente foi estabelecido que o retorno da ciclicidade está positivamente correlacionada com o número de dias pós-parto. Na medida em que os dias pós-parto aumentam, é mais provável que as vacas ciclem do que as vacas com menos dias pós-parto (D'OCCHIO *et al.*, 2019). Alguns estudos documentaram que as fêmeas em anestro pós-parto antes da estação de reprodução têm taxas de expressão de estro, taxas de P/IA e probabilidade de se tornarem prenhes menores do que fêmeas cíclicas (LEFEVER; ODDE 1986; HOLM *et al.*, 2009; GUTIERREZ *et al.*, 2014; HOLM *et al.*, 2015; KASIMANICKAM *et al.*, 2016; KASIMANICKAM *et al.*, 2020). Além disso, a reprodução está subordinada em importância aos nutrientes, reservas energéticas fundamentais e balanço energético (SHORT *et al.*, 1990). Uma vaca só pode continuar seus ciclos estrais quando consome proteína e alimentos com valor energético suficientes. Com relação ao impacto da paridade, as vacas primíparas têm maior exigência nutricional porque há necessidades para crescimento e gestação, e posteriormente lactação, que se não atendidas, leva o metabolismo do animal a priorizar o consumo de nutrientes para o crescimento, gestação e/ou lactação em detrimento da reprodução no pós-parto (SANTOS *et al.*, 2009).

O efeito do padrão nutricional sobre a fertilidade de novilhas ficou bem caracterizado já há mais de cinco décadas. Dunn *et al.* (1969) demonstraram que o padrão de ingestão de alimentos energéticos

tanto no pré-parto quanto no pós-parto influencia o desempenho reprodutivo de novilhas de corte. Um baixo nível de energia antes do parto retardou o início da ciclicidade no pós-parto comparadas a fêmeas alimentadas em padrão de acordo com as exigências nutricionais. No pós-parto, baixos níveis de energia reduziram a taxa de concepção, aparentemente afetando a competência oocitária. Já as fêmeas primíparas com padrão de dieta de acordo com as exigências nutricionais alcançaram elevadas taxas de concepção. Desta forma, diferenças marcantes na fertilidade e em taxas de concepção podem ser observadas em fêmeas de acordo com o padrão nutricional, o balanço energético, o ECC, etc, sendo fundamental em qualquer atividade de exploração comercial da produção animal.

Segundo Peter *et al.* (2009), os principais elementos que determinam o restabelecimento da ciclicidade ovariana são a emergência e a divergência folicular, já que determinam o destino do FD, mesmo que o início do crescimento folicular no período pós-parto muitas vezes não seja afetado. Neste contexto, um diagnóstico através da categorização do anestro segundo as características foliculares em emergência, desvio e dominância tem sido sugerido (PETER *et al.*, 2009).

Estratégias de manejo antes da época reprodutiva, tais como a avaliação do início da puberdade em novilhas e retomada dos ciclos ovarianos férteis em vacas após o parto, são consideradas críticas para potencialmente identificar e selecionar fêmeas com fertilidade ótima (D'OCCHIO *et al.*, 2019; MOOREY; BIASE, 2020).

Embora disponíveis, os sistemas objetivos para determinar o *status* de ciclicidade, como a avaliação das concentrações de P4 (ROSENKRANS; HARDIN, 2003; ARCHBOLD *et al.*, 2012), tornam-se caros e impraticáveis em sistemas em larga escala. Portanto, nas últimas décadas, diversos sistemas de classificação subjetiva, baseados na palpação retal do trato reprodutivo e de estruturas ovarianas com ou sem o auxílio da ultrassonografia, tais como o Escore do Trato Reprodutivo (ETR) (LEFEVER; ODDE, 1986; ANDERSEN *et al.*, 1991), o Escore do Trato Reprodutivo Modificado (ETRM) (STEVENSON *et al.*, 2008), o Desenvolvimento do Trato Reprodutivo (DTR) (MONTEIRO

*et al.*, 2013; BRUINJÉ *et al.*, 2019), o Diagnóstico da Atividade Ovariana (DOA) (MENCHACA *et al.*, 2013; QUINTANS, 2016), o Sistema de Pontuação do Trato Reprodutivo Ultrassonográfico (SPTRU) (MEE *et al.*, 2009), e a Pontuação de Tamanho e Posição (PTP) (YOUNG *et al.*, 2017; MADUREIRA *et al.*, 2020; SPECKHART *et al.*, 2022), têm sido usados em operações em grande escala.

Embora conceitualmente sejam semelhantes, estes sistemas são metodologicamente diferentes. Por exemplo, o ETR é baseado no tamanho e tônus uterino, bem como no desenvolvimento folicular e presença de um CL no ovário (PENCE *et al.*, 2007). Por sua vez, o ETRM usa as mesmas características de avaliação (tamanho, tônus, estruturas ovarianas), mas é simplificado pela designação do *status* em anestro profundo (ETRM1, ou AP), anestro superficial (ETRM2, ou AS) e cíclico (ETRM3, ou CC) (STEVENSON *et al.*, 2008). O sistema DTR só é baseado no tamanho uterino e nas estruturas ovarianas (MONTEIRO *et al.*, 2013; BRUINJÉ *et al.*, 2019), e o DOA privilegia apenas as estruturas ovarianas, onde os diâmetros foliculares e a presença do corpo lúteo determinam se as fêmeas são ou não cíclicas, classificando as acíclicas em AP ou AS, e as cíclicas em CC (MENCHACA *et al.*, 2013; QUINTANS, 2016). O SPTRU é baseado na avaliação transretal de ovários e do útero, onde os descritores uterinos são baseados em imagens ultrassonográficas de corte transversal dos dois cornos uterinos para determinar a quantidade do fluido intraluminal e a ecogenicidade (MEE *et al.*, 2009). Recentemente, foi desenvolvido o sistema PTP que se baseia na categorização das fêmeas com útero pequeno localizado na cavidade pélvica (PTP1), útero médio localizado na transição entre as cavidades abdominal e pélvica (PTP2), e útero grande localizado na cavidade abdominal (PTP3) (YOUNG *et al.*, 2017; MADUREIRA *et al.*, 2020; SPECKHART *et al.*, 2022).

O ETR foi desenvolvido no início dos anos 1990 na Colorado State University (CSU), EUA, para estimar o estado puberal de novilhas com o objetivo de selecionar fêmeas para a reposição, além de ajudar a identificar problemas de desenvolvimento que podem afetar a fertilidade futura (ANDERSEN *et al.*, 1991). O sistema baseado na palpação transretal e avaliação dos cornos uterinos, ovários e

estruturas ovarianas, utiliza uma escala de 5 pontos (Tabela 2), onde as novilhas com pontuação 1 ou 2 são consideradas pré-púberes (trato reprodutivo imaturo); fêmeas com pontuação 3 são consideradas peripuberais (desenvolvimento uterino moderado e vários folículos na faixa de 8-10 mm), mas estima-se que atinjam a puberdade dentro de 30 dias após a avaliação; e as classificadas como 4 ou 5 são consideradas como púberes (trato reprodutivo maduro) (LEFEVER; ODDE, 1986; ANDERSEN *et al.*, 1991; PENCE *et al.*, 2007; SMITH *et al.*, 2022). Uma pontuação de 4 é atribuída com base na percepção das características indicativas de estro, incluindo o tamanho e o tônus do útero e a presença de um folículo pré-ovulatório maior do que 10 mm em um ou ambos os ovários. A presença de um CL e de um útero bem desenvolvido resulta na atribuição de uma pontuação de 5 (ANDERSEN *et al.*, 1991).

**Tabela 2.** Classificação do escore do trato reprodutivo (ETR), após exame ginecológico por palpação retal e ultrassonografia transretal, com descrição de características ovarianas (tamanho, estruturas, funcionalidade) e contratilidade (tônus) uterina para fêmeas bovinas

<i>Status da ciclicidade*</i>	<i>Status da ciclicidade†</i>	<i>Score*</i>	<i>Diâmetro do útero (mm) e tônus</i>	<i>Estruturas ovarianas (mm)</i>
Pré-púberes	Anestro profundo	1	<20, sem tônus	nenhuma palpável
		2	20 a 25, sem tônus	Folículos de até 8
Peripuberes	Anestro superficial	3	20 a 25, tônus leve	Folículos de 8-10
Púberes	Iminente ou ciclica	4	26 a 30, tônus leve	Folículos >10, sem CL
		5	>30, tônus leve ou intenso	Folículos >10, com CL

\*Adaptado de ANDERSEN *et al.* (1991) para nulíparas

†Adaptado de STEVENSON *et al.* (2008)

Schwalbach *et al.* (2000) desenvolveram um sistema de ETR para vacas de corte pós-parto. Neste sistema, a indicação do nível de ciclicidade é diferente do sistema utilizado em novilhas, pois há uma indicação do nível de involução uterina e de estruturas ovarianas como indicador de retorno da ciclicidade, havendo associação positiva destes parâmetros com o resultado da prenhez (SCHWALBACH *et al.*, 2000).

O ETR originalmente proposto por Andersen *et al.* (1991) pode ser utilizado como teste de triagem para determinar o estado puberal de novilhas antes da época de reprodução (HOLM *et al.*, 2009). Entretanto, pensa-se que a associação mais forte do ETR com os resultados de fertilidade é alcançada quando a avaliação é realizada 30-60 dias antes do serviço (PENCE *et al.*, 1999). O ETR também pode ser um indicador indireto das necessidades nutricionais de novilhas e vacas e como uma ferramenta de seleção e predição da idade para atingir a puberdade (ANDERSEN *et al.*, 1991; ARCHBOLD *et al.*, 2012, GUTIERREZ *et al.*, 2014), quando realizado quatro a seis semanas antes do início da temporada de cria (GUTIERREZ *et al.*, 2014; MONDAY *et al.*, 2018; MOOREY; BIASE, 2020). Tais avaliações na pré-temporada podem auxiliar na identificação de fêmeas com baixa probabilidade de concepção, facilitando decisões quanto ao descarte/seleção em programas de sincronização.

Vários estudos independentes têm demonstrado que há uma correlação forte e quase linear entre o ETR e as taxas de prenhez em novilhas (LEFEVER; ODDE, 1986; ANDERSEN *et al.*, 1991; HOLM *et al.*, 2009; PENCE *et al.*, 2007; SMITH *et al.*, 2022). Pence & Bredahl (1998) avaliaram a associação do sistema ETR com a futura taxa de prenhez, e demonstraram uma forte associação entre os maiores escores de ETR e maiores taxas de P/IA. As novilhas com ETR de 5 tiveram 12% maior taxa de P/IA quando comparado com fêmeas com ETR 2. Além disso, as novilhas classificadas com uma pontuação de ETR 4 ou 5 têm maior probabilidade de estarem em estro durante os primeiros 24 dias da época reprodutiva, independentemente do peso corporal ou idade, em comparação com aquelas classificadas com ETR 1 ou 2 (PENCE; BRED AHL, 1998). Holm *et al.* (2009), pesquisando a capacidade preditiva do ETR em novilhas, relataram que quando usado o ETR 2 como ponto de corte, a taxa de prenhez após IA não tem aumento (56-58%). Já o ETR 3 como ponto de corte traz melhoras nas taxas (56-64%), com o ETR 4 resultando em um aumento ainda mais significativo nas taxas de prenhez (56-73%). Holm *et al.* (2015) e Smith *et al.* (2021) corroboraram com os achados por Pence & Bredahl (1998), demonstrando que novilhas com ETR 1 e 2 possuem menor probabilidade de prenhez, e com maior risco de falha

reprodutiva e de serem retiradas do rebanho em idade precoce em comparação com as classificadas com ETR 4 ou 5. No estudo de Holm *et al.* (2015), novilhas *Bos taurus indicus* classificadas com ETR 3 alcançaram um desempenho significativamente melhor que aquelas classificadas em 1 e 2, mas pior do que outras classificações (4 e 5).

Conforme mencionado anteriormente, a pontuação do ETR como método de seleção foi correlacionada com a idade para atingir a ciclicidade, resposta à sincronização e às taxas de P/IA pela sincronização do estro, com uma herdabilidade estimada de ( $h^2 = 0,32$ ) (ANDERSEN *et al.*, 1991). Em adição, Brinks (1994) destaca que o ETR tem correlações com o peso ao nascimento ( $r = -0,37$ ), peso ao desmame ( $r = 0,20$ ), ganho de peso ao ano ( $r = 0,31$ ), e idade à puberdade, tornando-o um método válido para medir e prever a idade de puberdade. Por sua vez, Holm *et al.* (2009) documentaram uma associação positiva com a P/IA após 50 dias pós-parto ( $P < 0,01$ ), o peso de desmame do terneiro ( $r = 0,22$ ,  $P < 0,01$ ), a taxa de P/IA geral ( $P < 0,01$ ), e negativamente associada a dias ao parto ( $r = -0,28$ ,  $P < 0,01$ ).

Outros estudos sugerem que o *pool* de folículos antrais poderia ter associação com o ETR, o que tem relação com uma menor taxa de serviço por concepção (MOSSA *et al.*, 2012). No entanto, a contagem de folículos antrais não está relacionada com a idade à puberdade (MOSSA *et al.*, 2012; CUSHMAN *et al.*, 2014), mas tem sido sugerida como um indicador de fertilidade e longevidade (IRELAND *et al.*, 2011). Algumas evidências mostram que animais com menor *pool* de folículos antrais possuem menores taxas de P/IA (CUSHMAN *et al.*, 2009; MOSSA *et al.*, 2012; MARTINEZ *et al.*, 2016), datas de parto posteriores (MCNEEL *et al.*, 2015), e maior intervalo pós-parto (MARTINEZ *et al.*, 2016) do que aqueles com maior *pool* de folículos antrais. Outras variáveis associadas ao *status* de ciclicidade são o aumento da produção e efeitos da P4 e do E2 (IRELAND *et al.*, 2011; JIMENEZ-KRASSEL *et al.*, 2009), aumento da secreção de proteínas uterinas (MCNEEL *et al.*, 2017) e maior produção de embriões (MAJUMDER *et al.*, 2010), contribuindo para a melhoria geral da fertilidade (MORAES *et al.*, 2019).

Não obstante ao que foi descrito acima, alguns estudos recentes não foram consistentes com o documentado nos trabalhos iniciais. O ETR não foi preditivo nos resultados de prenhez (HINDMAN *et al.*, 2022), mas teve uma correlação positiva com a pontuação de *frame* (HINDMAN *et al.*, 2022). Phillips *et al.* (2018), utilizando ferramentas metabolômicas para identificar metabólitos úteis no plasma sanguíneo para identificação de novilhas inférteis no momento da IA e associação com o ETR, não determinaram diferenças significativas entre as novilhas prenhes ( $3,9 \pm 0,74$ ) ou vazias ( $4,4 \pm 0,70$ ) após a IA. Por outro lado, Smith *et al.* (2022) não determinaram diferenças no diâmetro dos cornos uterinos, no diâmetro do maior folículo, ou na quantidade de folículos antrais entre as pontuações do ETR. Aliás, as novilhas com um ETR 2 ou 3 eram mais jovens e com menor peso ( $P < 0,001$ ) do que aquelas com um ETR 4 e 5, o que corrobora com outros estudos (RATHMANN *et al.*, 2007). Além disso, a taxa de falhas na P/IA diferiu segundo o ETR, onde novilhas com ETR 2 e 3 tinham significativamente maiores falhas de concepção quando comparadas a fêmeas com ETR maior que 3.

A precisão do ETR pode variar potencialmente dependendo da idade, peso corporal, fase de desenvolvimento puberal, raça e outros fatores. Entretanto, as razões para a classificação incorreta não estão bem descritas. Devido à subjetividade do sistema, pode haver erros na classificação de novilhas como pré-púberes ou púberes para avaliadores inexperientes, o que pode afetar a precisão do sistema na previsão do desempenho reprodutivo (ROSENKRANS; HARDIN, 2003; ARCHBOLD *et al.*, 2012; MONDAY *et al.*, 2018). Segundo Holm (2009), em algumas ocasiões, novilhas não se encaixam exatamente em uma pontuação do ETR específica, e cabe ao operador decidir qual das variáveis avaliadas terá mais preponderância para definir o *status* de ciclicidade.

A concordância do sistema ETR foi validada em 2003 durante um período de três meses, realizado por dois veterinários, um com 22 anos de experiência e o outro recém-formado (ROSENKRANS; HARDIN, 2003). As novilhas (n=174) foram examinadas pela manhã e depois foram misturadas e reexaminadas à tarde. Em geral, a concordância (segundo o coeficiente de Kappa) foi substancial intra-

avaliadores (0,64), e moderado interavaliadores (0,46), e justo quando comparado com a ultrassonografia (0,35) (ROSENKRANS; HARDIN, 2003). Especificamente, a concordância para distinguir entre novilhas pré-púberes (ETR 1, 2) ou púberes (ETR 4 ou 5) foi moderado a substancial (0,58 e 0,72, respectivamente) (ROSENKRANS; HARDIN, 2003). Este trabalho destacou 18% das novilhas sendo classificadas como pré-púberes, quando eram realmente púberes (falsos negativos), com os autores não recomendando o sistema para a seleção de fêmeas para descarte individual de animais.

A subjetividade do ETR não é apenas por causa da repetibilidade menos favorável, mas também pela complexidade do sistema de pontuação (ROSENKRANS; HARDIN, 2003; HOLM *et al.*, 2009). Nas avaliações prévias no início da temporada de reprodução, o número de avaliações por animal (especialmente para as novilhas) parece ser determinante para o valor preditivo do sistema ETR. Quando é realizada apenas uma vez para cada animal, a pontuação atribuída é influenciada não apenas pela maturidade do trato reprodutivo, mas também pelo momento do ciclo estral (especialmente para as vacas), devido a que as características como o tônus uterino e as estruturas ovarianas variam de acordo com o estágio do ciclo (PIERSON; GINTHER, 1988; SMITH *et al.*, 2022).

Neste contexto, foi levantada a hipótese de que a repetição da avaliação do ETR em animais com baixa pontuação poderia melhorar a precisão, porque as fêmeas que foram erroneamente classificadas com ETR baixo poderiam estar em metaestro ou diestro precoce (BATTOCCHIO *et al.*, 1999; HOLM *et al.*, 2009). A razão para classificações errôneas em metaestro e diestro precoce parece estar associada à sensibilidade de palpação transretal para detectar um corpo hemorrágico ou um pequeno CL durante os primeiros dias após o estro (BATTOCCHIO *et al.*, 1999). Além disso, segundo Bonafos *et al.* (1995), as definições baseadas apenas na percepção de tônus uterino podem ser influenciadas diretamente com as concentrações de hormônios circulantes, como é o caso do E2, que são variáveis com base no estágio do ciclo ou mesmo da aciclia. Assim, pode haver uma assincronia entre o desenvolvimento e tônus uterino e a função ovariana, apesar da percepção ou não do tônus uterino (SMITH *et al.*, 2022). Os

mesmos autores indicaram que a literatura é limitada quanto à incidência e implicações quando as fêmeas têm pontuações de ETR inconsistentes, particularmente quando há disparidades que não coincidem com a classificação tradicional do *status* de ciclicidade (SMITH *et al.*, 2022). De fato, a categoria de pontuação pode ser incerta quando a maturidade ovariana não se alinha com a maturidade uterina com base nas definições de pontuação individual (HOLM, 2009). Nesses casos, estudos têm sugerido que as características ovarianas devem ser priorizadas com base no pressuposto de que a avaliação uterina é mais subjetiva, secundária e consequência do nível e do tempo de atividade ovariana (ROSENKRANS; HARDIN, 2003; HOLM *et al.*, 2016).

Apesar de a ultrassonografia ter sido incluída na avaliação do ETR para aumentar a precisão e a repetibilidade (HOLM *et al.*, 2009), estudos têm demonstrado discrepâncias na coleta de dados que poderiam ter origem na medição (HONARAMOOZ *et al.*, 2004; HOLM *et al.*, 2016). Neste contexto, Holm *et al.* (2016) assinalaram que a ultrassonografia transretal para avaliar as características ovarianas e uterinas, tais como a detecção da presença ou ausência do CL, ausência de um folículo  $\geq 13$  mm, e diâmetro dos cornos uterinos foram os melhores preditores para determinar falhas na prenhez quando comparado ao sistema tradicional de Andersen *et al.* (1991) baseado unicamente na palpação transretal.

A melhor determinação da repetibilidade entre sistemas de classificação do *status* de ciclicidade é crucial porque permitiria aos veterinários e pesquisadores reconhecer a variabilidade inerente entre métodos e como estes podem afetar a interpretação como preditores de fertilidade, o que até o momento ainda não foi explorado.

## 2.6. Criobiologia do sêmen bovino

A criopreservação dos espermatozoides, observada pela primeira vez por Spallanzani in 1776 (ROYERE *et al.*, 1996; HUNGERFORD *et al.*, 2023) e desenvolvida por outros como técnica (HUNGERFORD *et al.*, 2023), implica na exposição e congelamento de células espermáticas a

temperaturas ultrabaixas (normalmente  $<-80^{\circ}\text{C}$ ), seguido pelo armazenamento em nitrogênio líquido (MAZUR, 1970; DI SANTO *et al.*, 2012; HEZAVEHEI *et al.*, 2018).

A técnica de criopreservação baseia-se no princípio da redução da temperatura, passando por quatro estágios primários que incluem a diluição e subsequente refrigeração do sêmen, a desidratação celular, e o congelamento (MEDEIROS *et al.*, 2002). Estes processos visam preservar a integridade estrutural e funcional, além de prolongar a vida das células espermáticas (PARKS; GRAHAM, 1992) a partir da interrupção temporária dos processos metabólicos, processo também conhecido como anabiose (MAZUR, 1970; GAO *et al.*, 2000; PEGG, 2007). No entanto, os espermatozoides podem sofrer danos de diferentes formas durante a criopreservação. As características físico-químicas da membrana plasmática dos espermatozoides são alteradas pelas variações de volume durante as diluições iniciais. Hammersted *et al.* (1990) afirmaram que as membranas espermáticas precisam como requisito manter o estado de fluidez, tornando esta característica necessária para o desempenho de suas funções. Durante a refrigeração, a suscetibilidade espermática ao choque térmico pelo frio é determinada pelo teor de fosfolípidos e colesterol da membrana plasmática. Segundo Drobniš *et al.* (1993), mudanças de fase lipídica termotrópica ocorrem na membrana plasmática quando o espermatozoide é refrigerado da temperatura corporal para  $5^{\circ}\text{C}$ . As proteínas da membrana, os fosfolípidos e o colesterol são organizados de forma diferente, e a membrana passa de um estado líquido-cristalino para uma conformação de fase gel (DROBNIS *et al.*, 1993). Deve-se enfatizar que existem três membranas no espermatozoide: a plasmática, a acrossômica e a mitocondrial. Com exceção da última, as outras duas apresentam diferenças em suas características estruturais e bioquímicas (PARKS; GRAHAM, 1992; WATSON, 1995). Devido ao fato que famílias distintas de fosfolípidos passarem por transições de fase líquida a gel a várias temperaturas, as membranas passam por sua transição de fase em uma ampla faixa de temperatura heterogeneamente (HAMMERSTEDT *et al.*, 1990). Assim, são aumentadas as cadeias

de hidrocarbonetos dos fosfolipídeos, o que limita a fluidez da membrana e dificulta a movimentação dos componentes individuais da membrana (PARKS, 1997).

O transporte ativo de moléculas dependentes do ATP através da membrana espermática é desafiado pela diminuição da fluidez da membrana provocada pelas baixas temperaturas e pelas rápidas mudanças osmóticas que ocorrem durante os processos de refrigeração, o que é fortemente limitado durante o processo de congelamento e descongelamento (JANUSKAUSKAS *et al.*, 1995; TANGA *et al.*, 2021).

A produção de cristais de gelo e estresse osmótico pode comprometer a integridade da membrana e a homeostase intracelular (HUNGERFORD *et al.*, 2023). O processo de difusão, que depende da concentração de solutos e das propriedades da membrana, faz com que as moléculas se espalhem uniformemente em condições de temperatura corporal segundo a espessura e permeabilidade da membrana. No entanto, durante o processo de congelamento, este intercâmbio é limitado devido ao gelo que ocorre na suspensão celular; como este é composto principalmente de água, este não pode dissolver os solutos, o que gera uma condição hiperosmolar (HOLT, 2000). Nesta condição, a célula espermática se desidrata, num esforço para remediar e restaurar o equilíbrio osmótico (PEGG, 2002). No entanto, quando os limiares de tolerância osmótica da célula são excedidos, esta reação osmótica é fatal (HOLT, 2000).

Alterações como mudanças no pH celular são somadas ao desequilíbrio osmótico e à desidratação, os quais podem causar danos adicionais às células espermáticas (KATKOV 2000; PEGG, 2002; VADNAIS; ALTHOUSE 2011; OLDENHOF *et al.*, 2013). Nos casos em que não aconteça a desidratação completa da célula, a retenção de fluido pode levar à ruptura da membrana na medida em que o gelo se forma e se expande (KATKOV, 2000). Por isso, mais de 50% das células criopreservadas não sobrevivem ao processo de congelamento-descongelamento, e aquelas que sobrevivem em alguma proporção podem ter disfunções subletais, o que reduz a fertilidade e a vida útil dos espermatozoides

(WATSON, 2000). De acordo com Salamon & Maxwell (1995), apenas 20% a 30% dos espermatozoides permanecem biologicamente inalterados, apesar de 40 a 60% destes apresentarem motilidade pós-descongelamento.

Adicionalmente, mais danos podem ser causados pelo descongelamento, porém não diretamente da técnica de criopreservação em si, mas sim pelo estresse oxidativo. Níveis baixos ou moderados de espécies reativas de oxigênio (ERO ou ROS) são fundamentais para a transdução de sinais para certos aspectos biológicos (JAMIL *et al.*, 2020). Porém, na presença de crioinjúrias, os espermatozoides não viáveis ou morfologicamente aberrantes podem gerar grandes quantidades de ROS (GRÖTTER *et al.*, 2019), causado principalmente pelo vazamento da cadeia de transporte de elétrons mitocondriais, que é seguido pela redução do oxigênio molecular para gerar o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) (AITKEN *et al.*, 1997; DUTTA *et al.*, 2019). É interessante destacar que em espécies como os bovinos, a ruptura celular causada pelo congelamento e descongelamento pode resultar em uma pseudocapacitação conhecida como criocapacitação (VADNAIS; ALTHOUSE 2011). Este processo mediado pela fosforilação de tirosina causa hiperativação, aumento da fluidez da membrana e, eventualmente, gera exocitose acrossômica (VADNAIS; ROBERTS 2007; VADNAIS; ALTHOUSE 2011). Conseqüentemente, a criocapacitação é um processo perturbador e não fisiológico que retrata a desordem interna causada pela criopreservação dos espermatozoides como resultado tanto dos danos físicos causados pelo congelamento quanto do início da geração excessiva de ROS, uma vez que estas células são trazidas de volta à temperatura ambiente (HUNGERFORD *et al.*, 2023).

Pesquisas recentes de meta-análise revelaram que estudos realizados entre 1990 e 2021 concordam em sua maioria que a capacitação espermática precoce tem uma relação inversa com a viabilidade espermática e a capacidade de fecundação em função do tempo (VIANA *et al.*, 2022). Os espermatozoides de touros de baixa fertilidade são frequentemente menos capazes de controlar o influxo de  $Ca^{2+}$ , sofrem exocitose acrossômica espontânea e, conseqüentemente, são mais propensos a sofrer a

criocapacitação (CORMIER *et al.*, 1997; DZIEKOŃSKA, 2022). Este fenômeno pode ser exibido principalmente por um número anormalmente alto de espermatozoides que sofrem uma reação acrossômica após a criopreservação (WATSON, 1995).

A taxa de descongelação também tem efeitos decisivos sobre a qualidade final das amostras de sêmen. Apesar de ter sido documentado que uma rápida taxa de descongelamento (temperaturas de até 70°C) resulta em maior motilidade espermática (HERNANDEZ *et al.*, 2007; MERCADO *et al.*, 2022), controlar esta temperatura pode ser problemático, especialmente em condições de campo, onde a temperatura de 37°C é preferentemente utilizada (CORREA *et al.*, 1997).

Em termos das técnicas utilizadas, das velocidades de congelamento e descongelamento das amostras e dos meios utilizados para preservar as células espermáticas funcionais, a criobiologia dos espermatozoides, sofreu mudanças significativas desde a descoberta incidental do glicerol como um crioprotetor eficaz em 1947 (POLGE *et al.*, 1949; PEGG 2002).

Na última década, uma ampla gama de meios crioprotetores e diluentes com suplementos foram pesquisados para salvaguardar os espermatozoides contra as inúmeras formas pelas quais estes podem sofrer danos durante a criopreservação. No entanto, vários estudos recentes focados neste tópico demonstram que o glicerol continua sendo o agente crioprotetor primário (HUNGERFORD *et al.*, 2023). Macromoléculas como a caseína do leite, proteoglicanos e lipoproteínas da gema de ovo, bem como agentes crioprotetores permeáveis às células como glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, destacam-se como protetores de membrana do espermatozoide (POLGE *et al.*, 1949; EVANS; MAXWELL, 1987; HUNGERFORD *et al.*, 2023). Entretanto, devido a sua toxicidade em altas concentrações e dependência da temperatura de exposição, estes agentes crioprotetores também podem danificar as células (GUTHRIE *et al.*, 2002).

### 2.6.1. Crioprotetores extracelulares ou não penetrantes

Também conhecidos como crioprotetores de membrana celular, caracterizam-se por elevar a osmolaridade do meio extracelular, o que dificulta a formação de cristais de gelo no interior da célula espermática (MEDEIROS *et al.*, 2002). Tipicamente, macromoléculas de alta massa molecular de origem animal (lipoproteínas da gema de ovo, proteínas do leite) e em alguns casos açúcares e aminoácidos, interagem com a membrana plasmática ou atuam como um solvente, limitando o meio extracelular de sua capacidade de formar cristais de gelo (AMANN; PICKETT, 1987; MEDEIROS *et al.*, 2002).

De acordo com Phillips & Lardy (1940), a gema de ovo protege os espermatozoides contra os efeitos da rápida refrigeração ou congelamento ao atuar como estabilizador de membrana. Acredita-se que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), especificamente os fosfolipídios, são os responsáveis pelo efeito protetor da membrana (AMIRAT *et al.*, 2005; LAYEK *et al.*, 2016) ao mitigar compensatoriamente a perda de fosfolipídios da membrana (PARKS; GRAHAM, 1992; LAYEK *et al.*, 2016; BUSTANI; BAIEE, 2021). Outras propriedades das LDL documentadas como relevantes no processo de criopreservação são o efeito como tampão osmótico (JONES; MARTIN, 1973) e como fonte proteica para o diluente, atuando também como um reservatório de colesterol e fosfolipídios (LAYEK *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2020). A porcentagem de gema de ovo utilizada nos diluentes varia de 5% a 30% (VISHWANATH; SHANNON, 2000; ANZAR *et al.*, 2019). De acordo com Moussa *et al.* (2002), a adição de 8% de LDL oriundas de gema de ovo também é eficaz na manutenção da viabilidade espermática após a criopreservação.

### 2.6.2. Crioprotetores intracelulares ou penetrantes

Agentes crioprotetores penetrantes (ACP) podem diminuir os danos celulares causados durante o processo de congelamento ao ingressar no compartimento intracelular (KAROW, 1969; PEGG, 2002). Os ACP caracterizam-se pela baixa massa molecular, alta solubilidade em água, além da baixa toxicidade

celular (NASH, 1966). Quando uma célula é exposta a um ACP, serão a concentração, o tempo de adição e a temperatura os fatores que determinarão a toxicidade do crioprotetor. Ao estabelecer ligações em pontes de hidrogênio com a molécula da água, o glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida (os ACP mais populares na área da criobiologia; ASHWOOD-SMITH, 1985) podem reduzir a formação de cristais de gelo, limitar o crescimento do tamanho dos cristais, diminuir a concentração de solutos em espaços extracelulares e intracelulares (DALIMATA; GRAHAM, 1997), ao mesmo tempo em que estimulam uma pequena retenção de água intracelular para prevenir a desidratação excessiva (BALL; VO, 2001; HOLT, 2000).

O glicerol foi o primeiro crioprotetor utilizado na criopreservação (POLGE *et al.*, 1949). É um álcool poliol que ao atravessar a membrana celular reduz o ponto de congelamento da solução, o que aumenta a concentração de solutos na fração não congelada (LOVELOCK; POLGE, 1954; FOROUZANFAR *et al.*, 2010). O glicerol pode se fixar às membranas, formando ligações de hidrogênio com as hidroxilas do crioprotetor e os grupos de ácidos graxos da membrana, o que afetaria a estabilidade da membrana celular (KUNDU *et al.*, 2000), resultando em uma menor dissociação com solutos e uma menor osmolaridade para o congelamento. Além disso, este ACP pode ser metabolizado pelas células, o que pode desempenhar uma função energética em nível secundário, fornecendo uma fonte alternativa de energia para os espermatozoides (MANN; WHITE, 1956; MOHRI, 1967; PAPA *et al.*, 2015).

A toxicidade do glicerol, que depende de sua taxa de refrigeração, velocidade de congelamento, composição diluidora e método de adição, limita a quantidade que pode ser usada como crioprotetor (FAHY, 1986; WOELDERS, 1997), variando entre 0,25 M (2,25%) a 1 M (9%) (VISHWANATH; SHANNON, 2000), com esta última concentração demonstrando toxicidade (FAHY, 1986). Embora o glicerol possa ser tóxico para os espermatozoides, mesmo em concentrações de 4%, foi documentado que este efeito pode ser atenuado quando a substância é adicionada a temperaturas próximas ao congelamento (FISER; FAIRFULL, 1984). Apesar de vários agentes crioprotetores como o etilenoglicol,

dimetilsulfóxido e dimetilformamida estejam disponíveis, o glicerol continua sendo o crioprotetor de eleição para a criopreservação espermática em bovinos (FOROUZANFAR *et al.*, 2010; HUNGERFORD *et al.*, 2023).

## 2.7. Avaliação da qualidade espermática

A fertilidade nos machos é um fenômeno multifatorial, que reflete nos parâmetros espermáticos, onde a interação sinérgica entre os parâmetros baseados em análise multianalítica pode determinar touros de baixa e alta fertilidade (DONNELLAN *et al.*, 2022; LEITE *et al.*, 2022). A causa da variação da fertilidade de touros ainda não foi totalmente elucidada (BARUSELLI *et al.*, 2021). De fato, não há consenso entre os estudos quando os resultados de fertilidade obtidos no campo são associados a parâmetros *in vitro* de amostras de sêmen após descongelamento (THUNDATHIL *et al.*, 1999; NAIB *et al.*, 2011; ATTIA *et al.*, 2016).

A avaliação da motilidade, morfologia e concentração espermática tem sido tradicionalmente considerada como base, especialmente em condições laboratoriais (ARRUDA *et al.*, 2010; 2011). Em geral, a análise da qualidade espermática pode avaliar as características estruturais e funcionais. As avaliações estruturais incluem as características físicas do sêmen como a cor, odor, pH, viscosidade e liquefação, assim como seu volume, concentração, e conteúdo de cromatina, enquanto a avaliação funcional é baseada em sua morfologia, motilidade progressiva, integridade plasmática da membrana e capacidade de resposta acrossômica (ARRUDA *et al.*, 2010; 2011).

Para medir a concentração espermática, usualmente são usados o hemocitômetro ou o espectrofotômetro, e em condições mais restritas, podem ser usadas a análise espermática assistida por computador (CASA) (VERSTEGEN *et al.*, 2002; CHRISTENSEN *et al.*, 2005), a citometria de fluxo (CHRISTENSEN *et al.*, 2005), e o NucleoCounter SP-100 (ANZAR *et al.*, 2009). É amplamente reconhecido que a morfologia espermática tem um impacto determinante na taxa de fecundidade tanto

*in vivo* quanto *in vitro* (EGGERT-KRUSE *et al.*, 1995; DONNELLY *et al.*, 1998). Casagrande *et al.* (1980) determinaram os valores-limite de patologias espermáticas totais (defeitos maiores e menores) com efeitos sobre a fertilidade. Uma correlação negativa ( $P = 0,0001$ ) entre a fertilidade e a patologia total ( $r = -0,48$ ) e os defeitos maiores ( $r = -0,51$ ) foram documentados. Para analisar a morfologia espermática, embora existam várias técnicas, nenhuma prova foi padronizada como a melhor. De fato, a avaliação adequada deste parâmetro é muito variável tanto dentro de um laboratório como entre laboratórios (TANGA *et al.*, 2021). Por ser um método objetivo, a análise automatizada de morfometria espermática, também conhecido como análise da morfologia espermática baseada em software (ASMA), é o preferido, pois este dispositivo pode distinguir células normais e anormais com maior precisão (RIJSSELAERE *et al.*, 2004).

Tipicamente, um microscópio de luz regular ou um microscópio de contraste de fase em 200-400X são os métodos mais comuns para determinar a motilidade geral e a motilidade progressiva dos espermatozoides (TANGA *et al.*, 2021). O resultado é dado como uma porcentagem de espermatozoides móveis segundo a observação de vários campos. No entanto, os resultados podem ser influenciados por múltiplas variáveis, incluindo circunstâncias operacionais, experiência do avaliador e influências ambientais (HERING *et al.*, 2014; LOVE, 2016). Após o descongelamento, verificou-se que a motilidade espermática e a fertilidade estavam correlacionadas ( $r = 0,53$ ;  $P = 0,01$ ), com uma diferença significativa entre touros de baixa ( $r = 0,39$ ;  $P < 0,01$ ) e alta fertilidade ( $r = 0,61$ ;  $P < 0,01$ ) (CORREA *et al.*, 1997). Em comparação com a microscopia de contraste de fase, o sistema CASA pode gerar resultados mais precisos e altamente repetíveis sobre várias das características cinéticas do espermatozoide (GÜNZEL-APEL *et al.*, 1993; VAN DER HORST, 2020).

Quanto ao seu papel na manutenção da homeostase, a integridade da membrana plasmática é crucial para a atividade normal e para a capacidade fecundante dos espermatozoides (DE ANDRADE *et al.*, 2007), devido a sua importância em uma variedade de processos fisiológicos, incluindo a reação

acrossômica e capacitação, e a ligação com a zona pelúcida (KANG *et al.*, 2020). Em geral, as técnicas para análise da membrana plasmática são baseadas na determinação da permeabilidade das membranas (YÁNIZ *et al.*, 2008). O teste de *inchaço* hipo-osmótico (HOST) (JEYENDRAN *et al.*, 1984; CORREA *et al.*, 1997; RAMU; JEYENDRAN, 2013), coloração com eosina-nigrosina (BARTH; OKO, 1989), e uso de sondas fluorescentes (HARRISON; VICKERS, 1990) são algumas das técnicas mais empregadas. O HOST se baseia na estimativa da capacidade de troca osmótica da membrana com o meio circundante. Os espermatozoides são dispostos em uma solução com uma osmolaridade inferior à intracelular (100-150 mOsm/kg) e, portanto, permitem a passagem de água do exterior para o interior da célula se a membrana plasmática estiver funcional (REVELL; MRODE 1994). No caso das sondas fluorescentes, um método amplamente utilizado é o do 6-CFDA/Hoescht-33258, onde o 6-CFDA (6-diacetato de carboxifluorosceína) é metabolizado por esterases do espermatozoide que se acumulam na cabeça, liberando fluoresceína, o que gera um padrão de fluorescência verde, que só ocorre quando a membrana é íntegra. No caso contrário, o Hoescht-33258 se difunde, gerando um padrão de fluorescência azul (HERNÁNDEZ-AVILÉS *et al.*, 2019). Além disso, a determinação automatizada da integridade da membrana plasmática também pode ser realizada pelo sistema CASA (SCHÄFER-SOMI; AURICH, 2007).

A precisão dos diversos métodos de avaliação da viabilidade espermática (supravital) baseados na coloração vivos/mortos não é clara (FISCHER *et al.*, 2020). De fato, a qualidade e reprodutibilidade destes métodos dependem de vários fatores, tais como o conteúdo de sais ionizáveis, a osmolalidade, o pH, a concentração dos agentes da coloração, o tempo de coloração e a secagem (EMIK; SIDWELL, 1947; MAYER *et al.*, 1951). A eosina-nigrosina é um corante supravital e tem sido tradicionalmente usado como um corante para diferenciar espermatozoides vivos e mortos. A eosina ingressa na célula morta (com membrana danificada) e cora de violeta, enquanto a nigrosina tingem o fundo; a célula viva não assume nenhuma cor. Outro método é a coloração de azul de tripano/Giemsa, baseado na

impermeabilidade ou exclusão de moléculas de azul de tripano em células vivas (VAZQUEZ *et al.*, 1997). Didion *et al.* (1989) forneceram a primeira descrição do uso desta técnica para avaliar simultaneamente a viabilidade e a condição acrossômica dos espermatozoides. Enquanto os espermatozoides intactos (vivos) não coram, o azul de tripano entra na célula morta (TALBOT; CHACON, 1981; SUTTIYOTIN; THWAITES, 1994). A coloração de Giemsa, por outro lado, marca a ausência ou presença do acrossoma por colorir o acrossoma intacto em tons que vão do vermelho ao rosa (TARTAGLIONE; RITTA, 2004).

Sondas fluorescentes combinadas com citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência constituem a maioria das abordagens para avaliar o *status* mitocondrial (HERNÁNDEZ-AVILÉS *et al.*, 2019). Em geral, estes testes se baseiam na capacidade das mitocôndrias espermáticas de metabolizar as moléculas fluorescentes (por exemplo, MitoTracker Green FM). Assim, o fluorocromo é retido dentro das mitocôndrias e se acumula em toda a peça intermediária (gerando um intenso padrão verde). Quando há perda da função mitocondrial, o MitoTracker se difunde lentamente através da membrana mitocondrial, de modo que nenhuma fluorescência forte pode ser identificada, ou nenhuma fluorescência pode ser visualizada (HERNÁNDEZ-AVILÉS *et al.*, 2019).

As mesmas metodologias anteriores (microscopia, citometria de fluxo, ou sondas fluorescentes) podem ser usadas também para determinar o *status* acrossômico (CROSS; MEIZEL, 1989). Um exemplo de teste baseado em fluorescência para determinar a reatividade acrossômica é o ensaio de clorotetraciclina (CTC). No entanto, o CTC também tem sido usado para identificar o *status* de capacitação espermática (VARNER *et al.*, 1993; RATHI *et al.*, 2001). O CTC se liga ao cálcio da membrana, o qual varia durante o processo de capacitação em nível molecular (VARNER *et al.*, 1993). O CTC permite distinguir três estados funcionais do *status* de capacitação espermática: espermatozoides não capacitados, espermatozoides capacitados com acrossomos intactos e espermatozoides com reação acrossômica. Como o mecanismo de ação é baseado na afinidade do CTC ao cálcio, quando os

espermatozoides fluorescem uniformemente (não capacitados) significa que as reservas de cálcio estão uniformemente distribuídas. Ao contrário, durante a capacitação, o cálcio é mobilizado principalmente na região pós-acrossômica, o que faz com que não se apresente o padrão de fluorescência, especialmente na região pós-acrossômica. Outras provas com sondas fluorescentes, como com o Alexa-488, que se conjuga a uma lectina extraída de uma planta (*Arachis hypogaea*), liga-se durante a reação acrosomal aos glicoconjugados da membrana acrosomal. Portanto, os espermatozoides com fluorescência verde na região acrossômica são considerados como células que estão sofrendo a reação acrossômica (HERNÁNDEZ-AVILÉS *et al.*, 2019).

Em síntese, grandes foram os avanços no melhoramento de diferentes estratégias diagnósticas para determinar o potencial de fertilidade dos rebanhos, além do aprimoramento de biotécnicas da reprodução, como a IA e a IATF, neste último caso, usando distintos hormônios para controlar a função reprodutiva, em especial ovariana, mimetizando processos e eventos fisiológicos. Porém, ainda há margem para o aumento da eficiência do processo, e o estudo multifatorial das respostas dos animais quando usado o sêmen refrigerado parece ser o caminho que poderia permitir avançar o conhecimento e o desenvolvimento de estratégias para intervir nas atuais limitações dos protocolos de IATF. Assim, com base no estado atual do conhecimento, fatores inerentes ao sêmen refrigerado, como maior viabilidade e sobrevivência, podem representar vantagens decisivas para manter a capacidade fecundante durável e melhorar a taxa de P/IA quando comparado ao sêmen criopreservado. No entanto, até a presente data não há relato de estudos aleatórios e controlados demonstrando a associação entre a taxa de P/IA usando sêmen refrigerado e congelado, levando em consideração o *status* de ciclicidade, a expressão do estro, a morfometria folicular e parâmetros de ecotextura e os efeitos sobre a probabilidade de concepção em vacas de corte. Segundo as considerações anteriores, o presente trabalho apresenta informações que visam abordar e adicionar ao conhecimento dentro do escopo destes tópicos.

### **3. HIPÓTESES E OBJETIVOS**

#### **3.1. Hipótese**

A IATF com sêmen refrigerado a 5°C por 12 h determina maiores taxas de P/IA em vacas multíparas de corte com folículos que não atingiram a divergência folicular (<8,5 mm) no momento da remoção do dispositivo intravaginal de progesterona (P4) durante o protocolo hormonal baseado em ésteres de estradiol e P4.

#### **3.2. Objetivo geral**

Avaliar os efeitos e associações entre a ciclicidade reprodutiva, o estado de condição corporal, e morfometria folicular sobre a probabilidade de prenhez em bovinos de corte após a IATF com sêmen refrigerado ou congelado.

##### **3.2.1. Objetivos específicos**

- a) Caracterizar a ciclicidade reprodutiva em bovinos de corte antes de ingressar num programa de IATF baseado em BE com P4;
- b) Avaliar a resposta ovariana e as taxas de P/IA ao protocolo baseado em BE com P4 de acordo com a ciclicidade e tipo de sêmen; e
- c) Determinar a relação entre a morfometria folicular e as taxas de P/IA quando é utilizado sêmen refrigerado e congelado em bovinos de corte submetidos à IATF.

#### 4. CONCLUSÕES

Este estudo visou determinar a relação entre as taxas de P/IA e o *status* de ciclicidade, expressão do cio, e tamanho folicular e seus efeitos sobre a probabilidade de concepção em vacas multíparas de corte inseminadas em tempo fixo com sêmen refrigerado ou congelado.

Baseados nos resultados apresentados pode-se concluir que:

- 1) O sêmen refrigerado apresentou parâmetros espermáticos superiores ao sêmen criopreservado, o que aumentou significativamente a probabilidade de P/IA.
- 2) O uso de sêmen refrigerado alcançou maiores taxas de P/IA em fêmeas com diâmetro folicular menor (<8.5 mm) ou maior (>11 mm) no dia 8 do protocolo, com uma maior probabilidade de prenhez independentemente do *status* de ciclicidade e da expressão de estro.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Ressalta-se que o sêmen refrigerado neste estudo foi empregado como modelo para a avaliação de fatores potenciais relacionados ao sucesso ou falha na obtenção de prenhez em programas de IATF que incluem fatores relacionados a fêmea e ao sême. Desta forma, os achados deste trabalho não devem ser interpretados como uma recomendação para retornar ao uso de sêmen refrigerado em programas de IATF. Entretanto, de uma perspectiva comercial, este estudo reforça que o sêmen congelado na IATF pode reduzir as taxas de concepção. Enquanto ainda se busca determinar a interação de fatores causais de menor prenhez com o sêmen congelado para fins de mitigação técnica, o sêmen refrigerado pode ser uma alternativa ocasional quando o critério é alcançar melhores taxas de P/IA, compensando as limitações existentes dos regimes de tratamento baseados no BE e P4.

A hipótese que sustentou o presente trabalho foi que haveria uma maior probabilidade de P/IA usando o sêmen refrigerado do que o sêmen criopreservado, especificamente em vacas que não alcançassem a divergência folicular (pequenos folículos, <8,5 mm) no momento da remoção do dispositivo de P4, o que poderia estar associado ao estado de ciclicidade antes do início do protocolo hormonal, bem como a expressão do estro antes da IA. Em geral, foi obtida maior taxa de P/IA utilizando sêmen refrigerado, o que se refletiu principalmente em maior prenhez em vacas com folículos menores (<8,5 mm) e maiores (>11,0 mm), o que suporta parcialmente a hipótese inicial do experimento.

Não foi possível aplicar métodos analíticos multi-variáveis para realizar análises *in vitro* das amostras de sêmen refrigerado e congelado devido a dificuldades logísticas que envolveram a realização deste tipo de avaliação nas condições de campo em um programa de IATF em escala. Contudo, a bateria de testes aplicada permitiu detectar diferenças na qualidade seminal dos touros, o que se refletiram no resultado final de P/IA. Mais estudos

são necessários para explorar o efeito do touro, diferentes tempos de refrigeração, além do tipo de diluentes usados e seus efeitos na P/IA.

Maiores estudos também se fazem necessários para confirmar a real vantagem do uso do sêmen refrigerado usando diferentes regimes de protocolos hormonais, especificamente focados em determinar os efeitos das fêmeas cujos folículos não chegam à divergência folicular no 8º dia de protocolo, bem como nos folículos persistentes. Parte dos resultados dedesenvolvimento folicular podem estar associados a falhas na sincronização da onda folicular no início do protocolo e a um padrão de desenvolvimento folicular mais lento no crescimento da onda, o que leva a uma maior assincronia entra a IATF e a ovulação. Tal característica está relacionada a vários fatores, como por exemplo, o balanço energético/ECC e o número de dias pós-parto, mas a influência efetiva destes fatores no sucesso da IATF com sêmen congelado ainda necessita maior investigação.

Embora a compreensão da repetibilidade entre sistemas de classificação do *status* de ciclicidade seja crucial porque permitiria aos veterinários e pesquisadores reconhecer a variabilidade inerente entre métodos e como eles podem afetar a interpretação como preditores de fertilidade, até agora nenhum estudo explorou esta questão em busca de uma maior acurácia. Certamente, a avaliação de parâmetros dinâmicos nutricionais e reprodutivos na pré-temporada e na temporada reprodutiva auxiliarão no refinamento destes sistemas, para uma maior previsibilidade nos resultados de P/IA.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, B.; TARNAVSKY, G.K.; PLATT, T.E.; HAMERNIK, D.L.; BROWN, J.L.; SCHOENEMANN, H.M. & REEVES, J.J. Nursing enhances the negative effect of estrogen on LH release in the cow. **J Anim Sci**, v. 57, p. 1530-6, 1983.
- ADAMS, G.P.; JAISWAL, R.; SINGH, J. & MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 69, p. 72-80, 2008.
- 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.; 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. & SINGH, J. Ovarian follicular and luteal dynamics in cattle. In: **Bovine reproduction**, HOPPER, R.M. (Ed.), John Wiley & Sons Inc, Ames, IA, pp. 219-244, 2015.
- 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.
- AITKEN, R.J.; FISHER, H.M.; FULTON, N.; GOMEZ, E.; KNOX, W.; LEWIS, B. & IRVINE, S. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. **Mol Reprod Dev**, 47,468–482, 1997.
- ALLRICH, R.D. Endocrine and neural control of estrus in dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 77, p. 2738-2744, 1994.

- ANDERSEN, K.J.; LEFEVER, D.G.; BRINKS, J.S. & ODD, K.G. The use of reproductive tract scoring in beef heifers. **Agri Pract**, v. 12, p. 19-26, 1991.
- ANDERSON, J. The periodicity and duration of estrus in Zebu and grade cattle. **J Agr Sci**, v. 34, p. 57, 1944.
- ANZAR, M.; KROETSCH, T. & BUHR, M.M. Comparison of different methods for assessment of sperm concentration and membrane integrity with bull semen. **J Androl**, v. 30, p. 661-8, 2009.
- ARAGUNDE, V. R.; VIÑOLES, G.C.; GASTAL, G.D.A. & CAVESTANY, D. Equine chorionic gonadotropin administered on day 5 of a 7-days fixed-time artificial insemination program improves ovulation synchrony and corpus luteum function in anestrous beef cows. **Theriogenology**, v. 195, p. 62-68, 2023.
- ARCHBOLD, H.; BUCKLEY, F.; PIERCE, K.M.; BEGLEY, N. & MEE, J.F. Ultrasonography and progesterone concentration at a single time point for the detection of puberty in dairy heifers. **Reprod Domest Anim**, v. 47, p. 407-11, 2012.
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; OLIVEIRA, L.Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M. & JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 35, p. 145-151, 2011.
- ASHWOOD-SMITH, M.J. Genetic damage is not produced by normal cryopreservation procedures involving either glycerol or dimethyl sulfoxide: a cautionary note, however, on possible effects of dimethyl sulfoxide. **Cryobiology**, v. 22, p. 427-33, 1985.
- ATKINS, J.A.; SMITH, M.F.; MACNEIL, M.D.; JINKS, E.M.; ABREU, F.M.; ALEXANDER, L.J. & GEARY, T.W. Pregnancy establishment and maintenance in cattle. **J Anim Sci**, v. 91, p. 722-733, 2013.
- ATKINS, J.A.; SMITH, M.F.; WELLS, K.J. & GEARY, T.W. Factors affecting preovulatory follicle diameter and ovulation rate after gonadotropin-releasing hormone in postpartum beef cows. Part I: Cycling cows. **J Anim Sci**, v. 88, p. 2300-10, 2010.
- ATTIA, S.; KATILA, T. & ANDERSSON, M. The Effect of Sperm Morphology and Sire Fertility on Calving Rate of Finnish Ayrshire AI Bulls. **Reprod Domest Anim**, v. 51, p.

54-8, 2016.

- BALL, B. A. MEDINA, V.; GRAVANCE, C.G. & BAUMBE, J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 C. **Theriogenology**, v. 56, n. 4, p. 577-589, 2001.
- 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.
- BARTH, A.D. & OKO, R.J. Preparation of semen for morphological evaluation. In: Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames, IA: Iowa State University Press, 1989. p.285.
- BARUSELLI, P.S.; ABREU, L.Â.; CATUSSI, B.L.C.; SANTOS, G.F.F.; DOS, F.L.; FELISBINO, N.A.R.; FRIGONI, F.G. & CREPALDI, G.A. Mitos e realidades sobre a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bovinos de corte. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 45, p. 625-646, 2021.
- 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.
- 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 Domest Anim**, v. 47, p. 134–141, 2012.
- BARUSELLI, P.S.; SANTOS, G.F.F; CREPALDI, G.A.; CATUSSI, B.L.C. & OLIVEIRA,

- A.C. IATF em números: evolução e projeção futura. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 46, p. 76-83, 2022.
- BATTOCCHIO, M.; GABAI, G.; MOLLO, A.; VERONESI, M.C.; SOLDANO, F.; BONO, G. & CAIROLI, F. Agreement between ultrasonographic classification of the CL and plasma progesterone concentration in dairy cows. **Theriogenology**, v. 15, n. 6, p. 1059-69, 1999.
- BEG, M.A.; BERGFELT, D.R. KOT, K. & GINTHER, O.J. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. **Biol Reprod**, v. 66, p. 120–6, 2002.
- BERGFELD, E.G.; KOJIMA, F.N.; WEHRMAN, M.E.; CUPP, A.S.; PETERS, K.E.; MARISCAL, V.; SANCHEZ, T.; KITOK, R.J.; GARCIA-WINDER, M. & KINDER, J.E. Frequency of luteinizing hormone pulses and circulating 17 $\beta$ -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.; KASTELIC, J.P. & GINTHER, O.J. Continued periodic emergence of follicular waves in non-bred progesterone-treated heifers. **Anim Reprod Sci**, v. 24, p. 193-204, 1991.
- 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. Advances in reproductive technologies in cattle: from artificial insemination to cloning. **Revis Fac Med Vet Zootecnia**, v. 56, n. 3, p. 184–94, 2009.
- 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. 2015. Status of embryo production in the world. **Anim. Reprod.** v. 12, p. 356–358, 2015.
- BÓ, G.A. & BARUSELLI, P.S. Synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Animal**, v.8, p.144-150, 2014.
- BÓ, G.A., BARUSELLI, P.S., MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRÍBULO, R.; TRÍBULO, H. & MAPLETOFT, R.J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 53-72, 2002.
- 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.; 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.; BARUSELLI, P.S. & MARTÍNEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Anim Reprod Sci**, v. 78, p. 307-26, 2003.
- BÓ, G.A.; CUTAIA, L.; PERES, L.C.; PINCINATO, D.; MARAÑA, D. & BARUSELLI, P.S. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. **Soc Reprod Fertil Suppl**, v. 64, p. 223–236, 2007.
- BÓ, G.A.; 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, p. 952–962, 2018.
- BÓ, G.A.; ROGAN, D. & MAPLETOFT, R.J. Pursuit of a method for single administration of pFSH for superstimulation in cattle: what we have learned. **Theriogenology**, v. 112, p. 26–33, 2018.
- 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.
- BONAFOS, L.D.; KOT, K. & GINTHER, O.J. Physical characteristics of the uterus during the bovine estrus cycle and early pregnancy. **Theriogenology**, v. 43, p. 713–21, 1995.
- BORCHARDT, S.; SCHÜLLER, L.; WOLF, L.; WESENAUER, C. & HEUWIESER, W. Comparison of pregnancy outcomes using either an Ovsynch or a Cosynch protocol for the first timed AI with liquid or frozen semen in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 107, p. 21–26, 2018.
- BORGES-SILVA, J.C.; SILVA, M.R.; MARINHO, D.B.; NOGUEIRA, E.; SAMPAIO, D.C.; OLIVEIRA, L.O.F.; ABREU, U.G.P.; MOURÃO, G.B. & SARTORI, R. Cooled semen for fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Reprod Fertil Dev**, v. 28, p. 1004–1008, 2016.
- BRAGG, N.D.; WEVER, R.A. & PIERSON, C.E. Card Relationship between estradiol 17-beta and endometrial echotexture during natural and hormonally manipulated estrus in mares. **Proceedings of the 48th AAEP**, p. 41–7, 2002.
- BREWSTER, J.E. & COLE, C.L. The time of ovulation in cattle. **J Dairy Sci**, v. 21, p. 111–115, 1941.
- BRINKS, J.S. Genetic influences on reproductive performance of two-year-old beef females. *In: Factors Affecting Calf Crop. Fields, M.J. & Sand, R.J.*, CRC Press, Boca Raton, FL. P. 45–53, 1994.
- BRUINJÉ, T.C.; ROSADIUK, J.P.; MOSLEMIPUR, F.; CARRELLI, J.E.; STEELE, M.A. & AMBROSE, D.J. Carryover effects of pre- and postweaning planes of nutrition on reproductive tract development and estrous cycle characteristics in Holstein heifers. **J Dairy Sci**, v. 102, p. 10514–10529, 2019.

- BUCHER, A.; KASIMANICKAM, R.; HALL, J. B.; DEJARNETTE, J. M.; WHITTIER, W. D.; KÄHN, W.; XU, Z. Fixed-time AI pregnancy rate following insemination with frozen-thawed or fresh-extended semen in progesterone supplemented CO-Synch protocol in beef cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 7, p. 1180–1185, 2009.
- 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, n. 3-4, p. 161-174, 2001.
- BURKE, C.R.; MUSSARD, M.L.; GASSER, C.L.; GRUM, D.E.; DAY, M.L. 2003. Estradiol benzoate delays new follicular wave emergence in a dose-dependent manner after ablation of the dominant ovarian follicle in cattle. **Theriogenology**, v. 60, p. 647-58, 2003.
- CASAGRANDE, J.F.; PINHEIRO, L.E.L.; ALMEIDA, C.A. & FERRAZ, J.B.S. Patologia espermática agrupada segundo Blom (1972) na avaliação de sêmen para congelação. **Rev Bras Reprod Anim**, v.3, p.19-23, 1980b.
- CHRISTENSEN, P.; HANSEN, C.; LIBORIUSSEN, T. & LEHN-JENSEN, H. Implementation of flow cytometry for quality control in four Danish bull studs. **Anim Reprod Sci**, v. 85, p. 201-8, 2005.
- 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.
- COHEN-DAYAG, A.; TUR-KASPA, I.; DOR, J.; MASHIACH, S. & EISENBACH, M. Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 224, p. 11039-43, 1995.
- CONSENTINI, C.E.; WILTBANK, M.C. & SARTORI, R. Factors that optimize reproductive efficiency in dairy herds with an emphasis on timed artificial insemination programs. **Animals**, v. 25, p. 301, 2021.
- CORMIER, N. & BAILEY, J.L. A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa. **Biol Reprod**, v. 69, p. 177–185, 2003.
- CORMIER, N.; SIRARD, M.A. & BAILEY, J.L. Premature capacitation of bovine

- spermatozoa is initiated by cryopreservation. **J Androl**, v. 18, p. 461-8, 1997.
- CORREA, J.R.; PACE, M.M. & ZAVOS, P.M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination programs. **Theriogenology**, v. 48, p.721-731, 1997.
- CRESPILHO, A.M.; NICHI, M.; GUASTI, P.N.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; SÁ FILHO, M.F.; MAZIERO, R.R.; DELL'AQUA, J.A. & PAPA, F.O. Sperm fertility and viability following 48h of refrigeration: Evaluation of different extenders for the preservation of bull semen in liquid state. **Anim Reprod Sci**, v. 146, p. 126–133, 2014.
- CRESPILHO, A.M.; PAPA, F.O.; SANTOS, M.P. & SÁ FILHO, M.F. Use of cooled bull semen as a strategy to increase the pregnancy rate in fixed-time artificial insemination programs – case report. **Am J Anim Vet Sci**, v. 7, p. 175-179, 2012.
- CROSS N.L. & MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrossomal status of mammalian sperm. **Biol Reprod**, v. 41, p. 635-641, 1989.
- CUPP, A.S.; STUMPF, T.T.; KOJIMA, F.N.; WERTH, L.A.; WOLFE, M.W.; ROBERSON, M.S.; KITTOK, 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 $\beta$ -oestradiol. **Anim Reprod Sci**, v. 37, p. 109-119, 1995.
- CUSHMAN, R.A.; ALLAN, M.F.; KUEHN, L.A.; SNELLING, W.M.; CUPP, A.S. & FREETLY, H.C. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. **J Anim Sci**, v. 87, p. 1971-80, 2009.
- CUSHMAN, R.A.; MCNEEL, A.K. & FREETLY H.C. The impact of cow nutrient status during the second and third trimesters on age at puberty, antral follicle count, and fertility of daughters. **Livest Sci**, v. 162, p. 252-258, 2014.
- D'OCCHIO, M.J.; NEISH, A. & BROADHURST, L. Differences in gonadotrophin secretion postpartum between Zebu and European breed cattle. **Anim Reprod Sci**. v. 22, p. 311-317, 1990.
- DADARWAL, D.; MAPLETOFT R.J.; ADAMS. G.P.; PFEIFER, L.F.; CREELMAN, C. & SINGH, J. Effect of progesterone concentration and duration of proestrus on fertility

- in beef cattle after fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v. 79, p. 859-66, 2013.
- DALIMATA, A.M. & GRAHAM, J.K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, v. 48, p. 831-41, 1997.
- DE ANDRADE, A.F.C.; DE ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; NASCIMENTO, J.; MARTINS, S.M.; RAPHAEL, C.F. & MORETTI, A.S. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. **Reprod Domest Anim**, v. 42, p. 190-4, 2007.
- DE LA MATA, J.J.; NÚÑEZ-OLIVERA, R.; CUADRO, F.; BOSOLASCO, D.; DE BRUN, V.; MEIKLE, A.; BÓ, G.A. & MENCHACA, A. Effects of extending the length of pro-oestrus in an oestradiol- and progesterone-based oestrus synchronisation program on ovarian function, uterine environment and pregnancy establishment in beef heifers. **Reprod Fertil Dev**, v. 30, n. 11, p. 1541-1552, 2018.
- DE MERCADO, E.; TOMÁS-ALMENAR, C. & GÓMEZ-IZQUIERDO, E. Improvement of the motility of boar sperm after cryopreservation. **Anim Reprod Sci**, v. 222, p. 106610, 2020.
- DE MORAES, F.L.Z.; MOROTTI, F.; COSTA, C.B.; LUNARDELLI, P.A. & SENEDA, M.M. Relationships between antral follicle count, body condition, and pregnancy rates after timed-AI in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 136, p. 10-14, 2019.
- DI SANTO, M.; TAROZZI N, N.M. & BORINI, A. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. **Adv Urol**, v. 2012, p. 854837, 2012.
- DIDION, B.A.; DOBRINSKY, J.R. GILES, J.R. & GRAVES, C.N. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. **Gamete Res**, v. 22, p. 51-7, 1989.
- DISKIN, M.G. Review: Semen handling, time of insemination and insemination technique in cattle. **Animal**, v. 12, p. s75-s84, 2018.
- DISKIN, M.G.; AUSTIN, E.J. & ROCHE, J.F. Exogenous hormonal manipulation of

- ovarian activity in cattle. **Domest Anim Endocrinol**, v. 23, n. 1-2, p. 211-28, 2002.
- 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.
- DONNELLAN, E.M.; PERRIER, J.P.; KEOGH, K.; ŠTIAVNICKÁ, M.; COLLINS, C.M.; DUNLEAVY, E.M.; SELLEM, E.; BERNECIC, N.C.; LONERGAN, P.; KENNY, D.A. & FAIR, S. Identification of differentially expressed mRNAs and miRNAs in spermatozoa of bulls of varying fertility. **Front Vet Sci**, v. 5, p. 993561, 2022.
- DONNELLY, E.T.; LEWIS, S.E.; MCNALLY, J.A. & THOMPSON, W. In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. **Fertil Steril**, v. 70, p. 305-14, 1998.
- 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.
- DROBNIS, E.Z.; CROWE, L.M.; BERGER, T.; ANCHORDOGUY, T.J.; OVERSTREET, J.W. & CROWE, J.H. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. **J Exp Zool**, v. 265, p. 432-7, 1993.
- DUNN, T.G.; INGALLS, J.E.; ZIMMERMAN, D.R. & WILTBANK, J.N. Reproductive performance of 2-year-old Hereford and Angus heifers as influenced by pre- and post-calving energy intake. **J Anim Sci**, v. 29, n. 5, p. 719-26, 1969.
- DUTTA, S.; MAJZOUB, A. & AGARWAL, A. Oxidative stress and sperm function: a systematic review on evaluation and management. **Arab J Urol**, v. 17, p. 87–97, 2019.
- ECHTERNKAMP, S.E.; CUSHMAN, R.A. & ALLAN, M.F. Size of ovulatory follicles in cattle expressing multiple ovulations naturally and its influence on corpus luteum development and fertility. **J Anim Sci**, v. 87, p. 3556-68, 2009.
- EGGERT-KRUSE, W.; REIMANN-ANDERSEN, J.; ROHR, G.; POHL, S.; TILGEN, W. & RUNNEBAUM, B. Clinical relevance of sperm morphology assessment using strict

- criteria and relationship with sperm-mucus interaction in vivo and in vitro. **Fertil Steril**, v. 63, p. 612-24, 1995.
- EMIK, L.O. & SIDWELL, G.M. (1947). Refining methods for using opal blue stain in evaluating ram semen. **J Anim Sci**, v. 6, p. 67–71, 1947.
- EVANS, G. & MAXWELL W.M.C. Frozen storage of semen. *In: Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*, Butterworths, p. 122–141, 1987.
- FAHY, G.M. Vitrification: a new approach to organ cryopreservation. **Prog Clin Biol Res**, v. 224, p. 305-35, 1986.
- FAIR, S. & P. LONERGAN. 2018. 'Review: Understanding the causes of variation in reproductive wastage among bulls', **Animal**, v. 12, p. s53-s62, 2018.
- FIKE, K.E.; DAY, M.L.; INSKEEP, E.K.; KINDER, J.E.; LEWIS, P.E.; SHORT, R.E. & HAFS, H. D. Estrus and luteal function in suckled beef cows that were anestrous when treated with an intravaginal device containing progesterone with or without a subsequent injection of estradiol benzoate. **J Anim Sci**, v. 75, n. 8, p. 2009-2015, 1997.
- FISCHER, D.; SCHNEIDER, H.; FAILING. K.; MEINECKE-TILLMANN, S.; WEHREND, A. & LIERZ, M. Viability assessment of spermatozoa in large falcons (*Falco spp.*) using various staining protocols. **Reprod Domest Anim**, v. 55, p. 1383-1392, 2020.
- FISER, P.S. & FAIRFULL, R.W. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. **Cryobiology**, v. 21, p. 542-51, 1984
- FOOTE, RH. The history of artificial insemination: selected notes and notables. **J Anim Sci**, v. 80, p. 1-10, 2002.
- 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.
- FOROUZANFAR, M.; SHARAFI, M.; HOSSEINI, S.M.; OSTADHOSSEINI, S.; HAJIAN, M.; HOSSEINI, L.; ABEDI, P.; NILI, N.; RAHMANI, H.R. & NASR-ESFAHANI, M.H. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. **Theriogenology**, v. 73, n. 4, p. 480-487, 2010.

- FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biol Reprod**, v. 50, p. 225-232, 1994.
- GAO, D.; CRITSER, J. K. Mechanisms of cryoinjury in living cells. **ILAR Journal**, v. 41, n. 4, p. 187-196, 2000.
- GARCIA, A.R.; ARRUDA, R.P.; MADUREIRA, E.H. et al. Influência do uso de sêmen resfriado e da aplicação de GnRH sobre a taxa de prenhez de novilhas Nelore inseminadas em tempo-fixo. **Rev Bras Reprod Anim**, v.23, n.3, p.342-344, 1999.
- 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.
- GICQUEL, E.; BOETTCHER, P.; BESBES, B.; FURRE, S.; FERNÁNDEZ, J.; DANCHINBURGE, C.; BERGER, B.; BAUMUNG, R.; FEIJÓO, J. & LEROY, G. 2020. Impact of conservation measures on demography and genetic variability of livestock breeds. **Animal**, v. 14, p. 670–680, 2020.
- GINTHER OJ. Ultrasonic imaging and animal reproduction: book 3, cattle. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing;. p. 9–72, 1998.
- GINTHER, O.J. How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 112-25, 2014.
- 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.; 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. A review. **Anim Reprod Sci**, v. 78, p. 239–57, 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.; 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.
- GODDE, C.; MASON-D’CROZ, D.; MAYBERRY, D.; THORNTON, P. & HERRERO, M. 2021. Impacts of climate change on the livestock food supply chain; a review of the evidence. **Glob Food Sec**, v. 28, 100488, 2021.
- GONG, J.G.; CAMPBELL, B.K.; BRAMLEY, T.A.; GUTIERREZ, C.G.; PETERS, A.R. & WEBB R. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. **Biol Reprod**, v. 55, n. 1, p. 68-74, 1996.
- GRIFFIN, P.G. & GINTHER, O.J. Research applications of ultrasonic imaging in reproductive biology. **J Anim Sci**, v. 70, n. 3, p. 953-72, 1992.
- GRÖTTER, L.G.; CATTANEO, L.; MARINI, P.E.; KJELLAND, M.E. & FERRÉ, L.B. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. **Reprod Domest Anim**, v. 54, n. 4, p. 655-665, 2019.
- GÜNZEL-APEL, A.; GÜNTHER, C.; TERHAER, P. & BADER, H. Computerassisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa. **J Reprod Fertil Supplement**, v. 47, p. 271-8, 1993.
- GUTHRIE, H. D.; LIU, J. & CRITSER, J. K. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. **Biol Reprod**, v. 67, n. 6, p. 1811-

1816, 2002.

GUTIERREZ, K.; KASIMANICKAM, R.; TIBARY, A.; GAY, J.M.; KASTELIC, J.P.; HALL, J.B. & WHITTIER, W.D. Effect of reproductive tract scoring on reproductive efficiency in beef heifers bred by timed insemination and natural service versus only natural service. **Theriogenology**, v. 81, n. 7, p. 918-24, 2014.

HAFEZ, E.S.E. & HAFEZ B. Reprodução animal. 7.ed. São Paulo: Manole, 2004.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **J. Androl**, v. 11, n. 1, p. 73-88, 1990.

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.

HANSEL, W. & EEHTERNKAMP, S.E. Control of ovarian function in domestic animals. **Amer Zool**, v. 12, p. 225, 1972.

HARRISON, R.A. & VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J Reprod Fertil**, v. 88, n. 1, p. 343-52, 1990.

HARSTINE, B.R.; UTT, M.D. & DEJARNETTE, J.M. Review: Integrating a semen quality control program and sire fertility at a large artificial insemination organization. **Animal**, v. 22, 1-12, 2018.

HERING, D.M.; OLENSKI, K. & KAMINSKI, S. Genome-wide association study for poor sperm motility in Holstein-Friesian bulls. **Anim Reprod Sci**, v. 146, p. 89-97, 2014.

HERNÁNDEZ, M.; ROCA, J.; GIL, M.A.; VÁZQUEZ, J.M. & MARTÍNEZ, E.A. Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. **Theriogenology**, v. 67, n. 9, p. 1436-45, 2007.

HERNÁNDEZ-AVILÉS, C.; ZAMBRANO-VARÓN, J. & JIMÉNEZ-ESCOBAR, C. Current trends on stallion semen evaluation: What other methods can be used to improve our capacity for semen assessment? **J Vet Androl**, v. 4, p. 1–19, 2019.

HEZAVEHEI, M.; SHARAFI, M.; KOUCHESFAHANI, H.M.; HENKEL, R.;

- AGARWAL, A.; ESMAEILI, V. & SHAHVERDI, A. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. **Reprod Biomed Online**, v. 37, n. 3, p. 327-339, 2018.
- HINDMAN, M.S.; HUEDEPOHL, B.; DEWELL, G.A.; BRICK, T.A.; SILVA, G.S. & ENGELKEN, T.J. Physical Traits and Reproductive Measurements Associated with Early Conception in Beef Replacement Heifers. **Animals**, v. 12, n. 15, p. 1910, 2022.
- HODGEN, G.D. The dominant ovarian follicle. **Fert Steril**, v. 39, p. 54-73, 1982.
- HOLM, D.E.; NIELEN, M.; JORRITSMA, R.; IRONS, P.C. & THOMPSON, P.N. Evaluation of pre-breeding reproductive tract scoring as a predictor of long term reproductive performance in beef heifers. **Prev Vet Med**, v. 118, n. 1, p. 56-63, 2015.
- HOLM, D.E.; NIELEN, M.; JORRITSMA, R.; IRONS, P.C. & THOMPSON, P.N. Ultrasonographic reproductive tract measures and pelvis measures as predictors of pregnancy failure and anestrus in restricted bred beef heifers. **Theriogenology**, v. 85, n. 3, p. 495-501, 2016.
- HOLM, D.E.; THOMPSON, P.N. & IRONS, P.C. The value of reproductive tract scoring as a predictor of fertility and production outcomes in beef heifers. **J Anim Sci**, v. 87, n. 6, p. 1934-40, 2009.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Anim Reprod Sci**, v. 62, p. 3-22, 2000.
- HONARAMOOZ, A.; ARAVINDAKSHAN, J.; CHANDOLIA, R.K.; BEARD, A.P.; BARTLEWSKI, P.M.; PIERSON, R.A. & RAWLINGS, N.C. Ultrasonographic evaluation of the pre-pubertal development of the reproductive tract in beef heifers. **Anim Reprod Sci**, v. 80, n. 1-2, p. 15-29, 2004.
- HOWELL, J.L.; FUQUAY, J.W. & SMITH, A.E. Corpus luteum growth and function in lactating Holstein cows during spring and summer. **J Dairy Sci**, v. 77, n. 3, p. 735-9, 1994.
- HUNGERFORD, A.; BAKOS, H.W. & AITKEN, R.J. Sperm cryopreservation: current status and future developments. **Reprod Fertil Dev**, v. 35, n. 3, p. 265-281, 2023.

- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Censo Agropecuário, 2021 – Resultados Definitivos. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/21814-2017-censo-agropecuario.html?=&t=resultados>
- 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.; SMITH, G.W.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F., FOLGER, J.K.; IRELAND, J.L.; MOSSA, F.; LONERGAN, P. & EVANS, A.C. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. **Reprod Fertil Dev**, v. 23, n. 1, p. 1-14, 2011.
- IVANOFF, E.I. On the use of artificial insemination for zootechnical purposes in Russia. **J Agric Sci**, v. 12, p. 244–256, 1922.
- 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.
- JAMIL, M.; DEBBARH, H.; ABOULMAOUAHIB, S.; ANIQ FILALI, O.; MOUNAJI, K.; ZARQAOU, M.; SAADANI, B.; LOUANJLI, N. & CADI, R. Reactive oxygen species in reproduction: harmful, essential or both? **Zygote**, v. 28, n. 4, p. 255–269, 2020.
- JANUSKAUSKAS, A. & RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm viability by measurement of ATP, membrane integrity and motility in frozen/thawed bull semen. **Acta Vet Scand**, v. 36, n. 4, p. 571-4, 1995.
- JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G. & ZANEVELD, L.J.D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J Reprod Fertil**, v. 70, p. 219-228, 1984.
- JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.K.; IRELAND, J.L.; SMITH, G.W.; HOU, X.; DAVIS, J.S.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C. & IRELAND, J.J. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus

- luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. **Biol Reprod**, v. 80, n. 6, p. 1272-81, 2009.
- JONES, R.C.; & MARTIN, I.C.A. 1973. The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5°C on the ultrastructure of ram spermatozoa. **J Reprod Fertil**, v. 35, p. 311-320, 1973.
- KÄHN, W.; FRAUNHOLZ, J.; KASPAR, B. & PYCZAK, T. Sonographic diagnosis of early pregnancy in horses, cattle, sheep, goats, swine, dogs and cats. Standard values and limitations. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v. 103, n. 6, p. 206-11, 1990.
- KANG, S.S.; KIM, U.H.;, LEE MS, LEE SD, CHO SR. Spermatozoa motility, viability, acrosome integrity, mitochondrial membrane potential and plasma membrane integrity in 0.25 mL and 0.5 mL straw after frozen-thawing in Hanwoo bull. **J Anim Reprod Biotechnol**, v. 35, p. 307-14, 2020.
- KAROW, A.M. Cryoprotectants – a new class of drugs. **J Pharm Pharmacol**, v. 21, p. 209–223, 1969.
- KASIMANICKAM, R.K.; KASIMANICKAM, V.R.; OLDHAM, J. & WHITMORE, M. Cyclicity, estrus expression and pregnancy rates in beef heifers with different reproductive tract scores following progesterone supplementation. **Theriogenology**, v. 145, p. 39-47, 2020.
- KASIMANICKAM, R.K.; WHITTIER, W.D.; HALL, J.B. & KASTELIC, J.P. Estrous synchronization strategies to optimize beef heifer reproductive performance after reproductive tract scoring. **Theriogenology**, v. 86, n. 3, p. 831-8, 2016.
- KATKOV, II. A two-parameter model of cell membrane permeability for multisolute systems. **Cryobiology**, v. 40, p. 64–83, 2000.
- 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.
- KOJIMA, F.N. The Estrous cycle in cattle: Physiology, endocrinology, and follicular waves. **Prof Anim Scient**, v. 19, p. 83-95, 2003.
- KORNMATITSUK, B. & KORNMATITSUK, S. Circulating progesterone concentrations and preovulatory follicle diameters affecting ovulatory response in crossbred dairy

- heifers, following a 7-day progesterone-based synchronization protocol. **Trop Anim Health Prod**, v. 53, n. 1, p. 102, 2021.
- KUMARESAN, A.; JOHANNISSON, A.; AL-ESSAWE, E.M. & MORRELL, J.M. Sperm viability, reactive oxygen species, and DNA fragmentation index combined can discriminate between above- and below-average fertility bulls. **J Dairy Sci**, v. 100, n. 7, p. 5824-5836, 2017.
- KUNDU, C.N.; CHAKRABORTY, J.; DUTTA, P.; BHATTACHARYYA, D.; GHOSH, A. & MAJUMDER, G.C.. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. **Cryobiology**, v. 40, n. 2, p. 117-125, 2000.
- LAMB, G.C.; DAHLEN, C.R.; LARSON, J.E.; MARQUEZINI, G. & STEVENSON, J.S. Control of the estrous cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle: a review. **J Anim Sci**, v. 88, p. E181-92, 2010.
- LAMB, G.C.; STEVENSON, J.S.; KESLER, D.J.; GARVERICK, H.A.; BROWN, D.R. & SALFEN, B.E. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F2alpha for ovulation control in postpartum suckled beef cows . The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide We. **J Anim Sci**, v. 79, p. 2253–2259, 2001.
- 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.
- LEFEVER, D. G. & ODDE, K.G. Predicting reproductive performance in beef heifers by reproductive tract evaluation before breeding. In: Colorado State University Beef Program Report. Colorado State University, Fort Collins. p. 13–15. 1986.
- LEITE, R.F.; LOSANO, J.D.A.; KAWAI, G.K.V.; RUI, B.R.; NAGAI, K.K.; CASTIGLIONI, V.C.; SIQUEIRA, A.F.P.; D'AVILA, A.M.; BARUSELLI, P.S. & NICHI, M. Sperm function and oxidative status: Effect on fertility in *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls when semen is used for fixed-time artificial insemination. **Anim Reprod Sci**, v. 237, p. 106922, 2022.
- LONERGAN, P. Review: Historical and futuristic developments in bovine semen technology. **Animal**, v. 12, n. 1, p. s4-s18, 2018.

- LOVE, C.C. Modern techniques for semen evaluation. **Vet Clin North Am Equine Pract**, v. 32, p. 531-46, 2016.
- LOVELOCK, J. E. & POLGE, C. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. **Biochem J**, v. 58, n. 4, p. 618, 1954.
- 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.
- 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.
- MADUREIRA, G.; CONSENTINI, C.E.C.; MOTTA, J.C.L.; DRUM, J.N.; PRATA, A.B.; MONTEIRO, P.L.J.; MELO, L.F.; GONÇALVES, J.R.S.; WILTBANK, M.C. & SARTORI, R. Progesterone-based timed AI protocols for *Bos indicus* cattle II: Reproductive outcomes of either EB or GnRH-type protocol, using or not GnRH at AI. **Theriogenology**, v. 145, p. 86-93, 2020a.
- MADUREIRA, G.; MOTTA, J.C.L.; DRUM, J.N.; CONSENTINI, C.E.C.; PRATA, A.B.; MONTEIRO, 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, 2020b.
- MAJUMDER, K.; GELBAYA, T.A.; LAING, I. & NARDO, L.G. The use of anti-Müllerian hormone and antral follicle count to predict the potential of oocytes and embryos. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 150, n. 2, p. 166-70, 2010.
- MANN, T. & WHITE, I.G. Metabolism of glycerol, sorbitol and related compounds by spermatozoa. **Nature**, v. 178, n. 45252, p. 142-3, 1956.
- 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, p. 1003-1014, 2018.
- MARTIN, A.A.A.; DE OLIVEIRA, G.JR.; MADUREIRA, A.M.L.; MIGLIOR, F.; LEBLANC, S.J.; CERRI, R.L.A.; BAES, C.F. & SCHENKEL, F.S. Reproductive tract

- size and position score: Estimation of genetic parameters for a novel fertility trait in dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 105, n. 10, p. 8189-8198, 2022.
- MARTINEZ, M.F., ADAMS, G.P.; KASTELIC, J.P.; BERGFEL, D.R. & MAPLETOFT, R.J. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. **Theriogenology**, v. 54, n. 5, p. 757-69, 2000.
- MARTINEZ, M.F.; SANDERSON, N.; QUIRKE, L.D.; LAWRENCE, S.B. & JUENGEL, J.L. Association between antral follicle count and reproductive measures in New Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system. **Theriogenology**, v. 85, n. 3, p. 466-75, 2016.
- MASTROMONACO, G.F. & GONZALEZ-GRAJALES, A.L. 2020. Reproduction in female wild cattle: Influence of seasonality on ARTs. **Theriogenology**, v. 150, p. 396–404, 2020.
- MAYER, D.T.; DALE SQUIRES, C.; BOGART, R. & OLOUFA, M. M. The technique for characterizing mammalian spermatozoa as dead or liv-ing. **J Anim Sci**, v. 10, p. 226–235, 1951.
- MAZUR P. Cryobiology: the freezing of biological systems. **Science**, v. 168, n. 3934, p. 939-49, 1970.
- MCDUGALL, S.; COMPTON, C.W.R. & ANNISS, F.M. Effect of exogenous progesterone and oestradiol on plasma progesterone concentrations and follicle wave dynamics in anovulatory anoestrous post-partum dairy cattle. **Anim Reprod Sci**, v. 84, p. 303–314, 2004.
- MCNEEL, A.K. & CUSHMAN, R.A. Influence of puberty and antral follicle count on calving day in crossbred beef heifers. **Theriogenology**, v. 84, n. 7, p. 1061-6, 2015.
- MCNEEL, A.K.; SOARES, É.M.; PATTERSON, A.L.; VALLET, J.L.; WRIGHT, E.C.; LARIMORE, E.L.; AMUNDSON, O.L.; MILES, J.R.; CHASE, C.C.JR.; LENTS, C.A.; WOOD, J.R.; CUPP, A.S.; PERRY, G.A. & CUSHMAN, R.A. Beef heifers with diminished numbers of antral follicles have decreased uterine protein concentrations. **Anim Reprod Sci**, v. 179, p. 1-9, 2017.
- MEDEIROS, C.M.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T. & RODRIGUES, J.L. Current status of

- sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 327-344, 2002.
- MEE, J.F.; BUCKLEY, F.; RYAN, D. & DILLON, P. Pre-breeding ovaro-uterine ultrasonography and its relationship with first service pregnancy rate in seasonal-calving dairy herds. **Reprod Domest Anim**, v. 44, n. 2, p. 331-7, 2009.
- MENCHACA, A. Sustainable food production: The contribution of genome editing in livestock. **Sustain**, v. 13, p. 1–16, 2021.
- MENCHACA, A.; NÚÑEZ-OLIVERA, R.; DE CASTRO, T.; GARCÍA-PINTOS, C. & CUADRO, F. Implementación de programas de IATF en rodeos de cría. **Semin Actual Técnica Cría Vacuna INIA**, v. 208, p. 229–46, 2013.
- MENEGHETTI, M.; FILHO, O.G.S.; PERES, R.F.G.; LAMB, G.C. & VASCONCELOS, J.L.M. 2009. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols. **Theriogenology**, v. 72, p. 179–189, 2009.
- 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.; 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.
- MILOVANOV, V. K. Artificial Insemination of Livestock in the U.S.S.R. Trans. by A. Birron and Z. S. Cole. S. Monson, Jerusalem. Tech. Services, U.S. Dept. Commerce, Washington, DC. 1964.
- MOENTER, S.M.; CARATY, A. & KARSCH, F.J. The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. **Endocrinology**, v. 127, n. 3, p. 1375-84, 1990.
- MOHRI, H. & MASAKI, J. Glycerokinase and its possible role in glycerol metabolism of bull spermatozoa. **Reproduction**, v. 14, n. 2, p. 179-194, 1967.
- MONDAY, J.D.; LARSON, R.L.; LAFLIN, S.; WHITE, B.J. & THEURER, M.E.

- Determining potential pregnancy status differences based on a new method of yearling heifer prebreeding examination. **Theriogenology**, v. 105, p. 164-168, 2018.
- MONTEIRO, F.M.; MERCADANTE, M.E.; BARROS, C.M.; SATRAPA, R.A.; SILVA, J.A.; OLIVEIRA, L.Z.; SARAIVA, N.Z.; OLIVEIRA, C.S. & GARCIA, J.M. Reproductive tract development and puberty in two lines of Nellore heifers selected for postweaning weight. **Theriogenology**, v. 80, n. 1, p. 10-7, 2013.
- MONTEIRO, 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. 3826-3839, 2015.
- MOORE, S.G. & HASLER, J.F. A 100-Year Review: reproductive technologies in dairy science. **J Dairy Sci**, v. 100, p.10314-10331, 2017.
- MOOREY, S.E. & BIASE, F.H. Beef heifer fertility: importance of management practices and technological advancements. **J Anim Sci Biotechnol**, v. 11, p. 97, 2020.
- MOSSA, F.; WALSH, S.W.; BUTLER, S.T.; BERRY, D.P.; CARTER, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G.W.; IRELAND, J.J. & EVANS, A.C. Low numbers of ovarian follicles  $\geq 3$  mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 95, n. 5, p. 2355-61, 2012.
- MUELLER, M.L. & VAN EENENNAAM, A.L. Synergistic power of genomic selection, assisted reproductive technologies, and gene editing to drive genetic improvement of cattle. **CABI Agric Biosci**, v. 3, p. 13, 2022.
- MURPHY, C.; FAHEY, A.; SHAFAT, A. & FAIR, S. 2013. Reducing sperm concentration is critical to limiting the oxidative stress challenge in liquid bull semen. **J Dairy Sci**, v. 96, p. 1–8, 2013.
- MURPHY, E.M.; MURPHY, C.; O'MEARA, C.; DUNNE, G.; EIVERS, B.; LONERGAN, P. & FAIR, S. A comparison of semen diluents on the in vitro and in vivo fertility of liquid bull semen. **J Dairy Sci**, v. 100, p. 1541–1554, 2017.
- NALBANDOV, A. & CASIDA, L.E. Ovulation and its relation to estrus in cows. **J Anim Sci**, v. 1, p. 189-198, 1942.

- NAIB, A.; HANRAHAN, J.P.; LONERGAN, P. & FAIR, S. In vitro assessment of sperm from bulls of high and low field fertility. **Theriogenology**, v. 76, p. 161-7, 2011.
- NASH, T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. **Cryobiology**, v. 46, p. 179-211, 1966.
- NASSER, L.F.; ADAMS, G.P.; BO, G. & MAPLETOFT, R.J. Ovarian superovulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. **Theriogenology**, v. 40, p. 713-724, 1993.
- NOGUEIRA, E.; SILVA, M.R.; SILVA, J.C.B.; ABREU, U.P.G.; ANACHE, N.A.; SILVA K.C.; CARDOSO, C.J.T.; SUTOVSKY, P. & RODRIGUES, W.B. Timed artificial insemination plus heat I: effect of estrus expression scores on pregnancy of cows subjected to progesterone-estradiol-based protocols. **Animal**, v. 10, p. 2305-2312, 2019.
- OECD-FAO. OECD-FAO Agricultural Outlook 2021–2030, OECD-FAO Agricultural Outlook 2021–2030, 2021.
- OLDENHOF, H.; GOJOWSKY, M.; WANG, S.; HENKE, S.; YU, C.; ROHN, K.; WOLKERS, W.F. & SIEME, H. Osmotic stress and membrane phase changes during freezing of stallion sperm: mode of action of cryoprotective agents. **Biol Reprod**, v. 88, p. 68, 2013.
- OLIVEIRA, L.Z.; DE ARRUDA, R.P.; DE ANDRADE, A.F.C.; CELEGHINI, E.C.C.; DOS SANTOS, R.M.; BELETTI, M.E.; PERES, R.F.G.; OLIVEIRA, C.S. & HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. Assessment of field fertility and several in vitro sperm characteristics following the use of different Angus sires in a timed-AI program with suckled Nelore cows. **Livest. Sci**, v. 146, p. 38–46, 2012.
- ORLAND, B. The invention of artificial fertilization in the eighteenth and nineteenth century. **Hist Philos Life Sci**, v. 39, n. 2, p. 11, 2017.
- O'SHEA, J.D.; RODGERS, R.J. & D'OCCHIO, M.J. Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. **J Reprod Fertil**, v. 85, n. 2, p. 483-7, 1989.
- PAPA, P.M.; MAZIERO, R.D.; GUAISTI, P.N.; JUNQUEIRA, C.R.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; PAPA, F.O.; VIANNA, F.P.; ALVARENGA, M.A.; CRESPILO, A.M. & DELL'AQUA, J.A. Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. **Theriogenology**, v. 83, p. 107–113, 2015.

- PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 209-222, 1992.
- PEGG, D. E. Principles of cryopreservation. *In: Cryopreservation and Freeze Drying Protocols*, 3rd ed. New York: Springer-Verlag; p. 39-57, 2007.
- PEGG, D.E. The history and principles of cryopreservation. **Semin Reprod Med**, v. 20, n. 1, p. 5-13, 2002.
- PENCE, M. & BRED AHL, R. Clinical use of reproductive tract scoring to predict pregnancy outcome. *In: Proc. 31st Annu. Conf. AABP, Spokane, WA. Am. Assoc. Bov. Pract.*, Stillwater, MN. p. 259–260, 1998.
- PENCE, M.; ENSLEY, D.; BERGHAUS, R.; ROSSI, J.; WILSON, T. & CANNON, P.T. Improving reproductive efficiency through the use of reproductive tract scoring in a group of beef replacement heifers. **Bov Pract**, v. 41, p. 35–40, 2007.
- PERRY, G.A.; SMITH, M.F.; LUCY, M.C.; GREEN, J.A.; PARKS, T.E.; MACNEIL, M.D.; ROBERTS, A.J. & GEARY, T.W. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. **Proc Natl Acad Sci**, v. 102, p. 5268–5273, 2005.
- PERRY, G.A.; SMITH, M.F.; ROBERTS, A.J.; MACNEIL, M.D. & GEARY, T.W. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. **J Anim Sci**, v. 85, p. 684–689, 2007.
- PETER, A.T.; LEVINE, H.; DROST, M. & BERGFELT, D.R. Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 71, p. 1343–1357, 2009.
- PFEIFER, L.F.M.; CASTRO, N.A.; MELO, V.T.O.; NEVES, P.M.A.; CESTARO, J.P. & SCHNEIDER, A. Timed artificial insemination in blocks: A new alternative to improve fertility in lactating beef cows. **Anim Reprod Sci**, v. 163, p. 89–96, 2015.
- PHILLIPS, P.H. & LARDY, H.A. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. **J Dairy Sci**, v. 23, p. 399–404, 1940.
- PHILLIPS, K.M.; READ, C.C.; KRIESE-ANDERSON, L.A.; RODNING, S.P.; BRANDEBOURG, T.D.; BIASE, F.H.; MARKS, M.L.; ELMORE, J.B.; STANFORD, M.K. & DYCE, P.W. Plasma metabolomic profiles differ at the time of artificial

- insemination based on pregnancy outcome, in *Bos taurus* beef heifers. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 13196, 2018.
- PIERSON, R. & GINTHER, O. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, v. 29, p. 21–37, 1988.
- PIERSON, R.A. & ADAMS, G.P. Computer-assisted image analysis: diagnostic ultrasonography and ovulation induction: strange bedfellows. **Theriogenology**, v. 43, p. 105–12, 1995.
- PINI, T.; FARMER, K.; DRUART, X.; TEIXEIRA-GOMES, A.P.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; LEAHY, T. & DE GRAAF, S.P. Binder of Sperm Proteins protect ram spermatozoa from freeze-thaw damage. **Cryobiology**, v. 82, p. 78-87, 2018.
- POLGE, C.; SMITH, A.U. & PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, n. 4172, p. 666, 1949.
- PUGLIESI, G.; SANTOS, F.B.; LOPES, E.; NOGUEIRA, É.; MAIO, J.R. & BINELLI, M. Improved fertility in suckled beef cows ovulating large follicles or supplemented with long-acting progesterone after timed-AI. **Theriogenology**, v. 85 n. 7, p. 1239-48, 2016.
- PURSLEY, J.R.; MEE, M.O. & WILTBANK, M.C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF<sub>2α</sub> and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, p. 915-923, 1995.
- PYTLÍK, J.; STÁDNÍK, L.; DUCHÁČEK, J. & CODL, R. Comparative study of pregnancy rate of dairy cows inseminated with fresh or frozen-thawed semen. **Acta Univ Agric Silvic Mendelianae Brun**, v. 68, p. 573–581, 2020.
- QUINTANS, G. 2016. Diagnóstico de actividad ovárica: Una herramienta que debemos conocer. **Revista INIA**, n. 47, p. 13–14, 2016.
- RAHE, C.H.; OWENS, R.E.; FLEEGER, J.L.; NEWTON, H.J. & HARMS, P.G. Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle. **Endocrinology**, v. 107, n. 2, p. 498-503, 1980.
- RAMU, S. & JEYENDRAN, R.S. The hypo-osmotic swelling test for evaluation of sperm membrane integrity. **Methods Mol Biol**, v. 927, p. 21-5, 2013.
- RANDEL, D.R. Nutrition and postpartum rebreeding in cattle. **J Anim Sci**, v. 68, p. 853-862, 1990.

- RASBY, R.J.; WETTEMANN, R.P.; HARMS, P.G.; LUSBY, K.S. & WAGNER, J.J. GnRH in the infundibular stalk-median eminence is related to percentage body fat in carcasses of beef cows. **Domest Anim Endocrinol**, v. 9, n. 1, p. 71-6, 1992.
- 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.
- RATHI, R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M. & GADELLA, B.M. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. **Biol Reprod**, v. 65 n. 2, p. 462-70, 2001.
- RATHMANN, R.J.; SPROTT, L.R.; HOLLOWAY, J.W.; WARRINGTON, B.G.; BARLING, K. & FORREST, D.W. Relationship of reproductive tract scores in heifers with two-year reproductive performance. *Beef Cattle Research in Texas*. p. 179 – 184, 2007.
- RESENDE, O.A.; ALVES, P.A.P.M.; FAJARDO, R.S.L.; ALMEIDA, J.; SILVA, O.R.; MELLO, M.R.B. Eficiência do sêmen refrigerado na IATF de vacas Girolando. Annual Meeting Of The Brazilian Embryo Technology Society, 32., Florianópolis. Proceedings. **SBTE**, p. 209, 2018.
- REVELL, S.G., MRODE, R.A., 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. **Anim Reprod Sci**, v. 36, p. 77–86, 1994.
- RICHARDS, M.W.; SPITZER, J.C. & WARNER, M.B. Effect of Varying Levels of Postpartum Nutrition and Body Condition at Calving on Subsequent Reproductive Performance in Beef Cattle, **J Anim Sci**, v. 62, n. 2, p. 300–306, 1986.
- RICHARDSON, B.N.; LARIMORE, E.L.; WALKER, J.A.; UTT, M.D.; DEJARNETTE, J.M. & PERRY, G.A. Comparison of fertility of liquid or frozen semen when varying the interval from CIDR removal to insemination. **Anim Reprod Sci**, v. 178, p. 61-66, 2017.
- RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; HOFLACK, G.; MAES, D. & DE KRUIF, A. Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyser. **Theriogenology**, v. 62, p. 1292-306, 2004.
- ROCHE, J.F.; CROWE, M.A. & BOLAND M.P. Postpartum anestrus in dairy and beef

- cows. **Anim Reprod Sci**, v. 28, p. 371-378, 1992.
- 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.
- ROELOFS, J.B.; VAN EERDENBURG, F.J.; SOEDE, N.M. & KEMP, B. Various behavioral signs of estrous and their relationship with time of ovulation in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1366-77, 2005.
- ROSENKRANS, K.S. & HARDIN, D.K. Repeatability and accuracy of reproductive tract scoring to determine pubertal status in beef heifers. **Theriogenology**, v. 59, n. 5-6, p. 1087-92, 2003.
- 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 F<sub>2</sub> $\alpha$ -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.
- ROYERE, D.; BARTHELEMY, C.; HAMAMAH, S. & LANSAC, J. Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review. **Hum Reprod Update**, v. 2, n. 6, p. 553-9, 1996.
- SÁ FILHO, M.F.; CRESPILO, A.M.; SANTOS, J.E.; PERRY, G.A. & BARUSELLI, P.S. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Anim Reprod Sci**, v. 120, n. 1-4, p. 23-30, 2010.
- SALAMON, S. & MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Anim Reprod Sci**, v. 62, n. 1-3, p. 77-111, 2000.
- 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. 2012. 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.; FULLER, H.K. & WILLETT, E.L. Preservation of bovine spermatozoa in yolk-citrate diluent and field results from its use. **J Dairy Sci**, v. 24, n. 11, p. 905–10, 1941.
- SALISBURY, G.W. VANDEMARK, N.L. & LODGE, J.R. Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle. 2nd ed. W. H. Freeman Co., San Francisco, 1978.
- SANTOS, J.E.; RUTIGLIANO, H.M. & SÁ FILHO, M.F. Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. **Anim Reprod Sci**, v. 110, n. 3-4, p. 207-21, 2009.
- SARTORI, R. & BARROS, C.M. Reproductive cycles in Bos indicus cattle. **Anim Reprod Sci**, v. 124, n. 3-4, p. 244-50, 2011.
- SARTORI, R.; GIMENES, L.U.; MONTEIRO, P. L.; MELO, L.F.; BARUSELLI, P.S. & BASTOS, M.R. Metabolic and endocrine differences between Bos taurus and Bos indicus females that impact the interaction of nutrition with reproduction', **Theriogenology**, v. 86, p. 32-40, 2016.
- SATAKE, N.; EDWARDS, S.A.A.; TUTT, D.; MCGOWAN, M.R. & BOE-HANSEN, G.B. 2018. Investigation of in vitro measurable sperm attributes and their influence on electroejaculated bull semen with a fixed-time artificial insemination protocol in Australian Bos indicus cattle. **Reprod Domest Anim**, v. 53, p. 414–422, 2018.
- SAVIO, J.D.; THATCHER, W.W.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R.L. & WOLFENSON, D. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. **J Reprod Fertil**, v. 97, n. 1, p. 197-203, 1993.
- SCHÄFER-SOMI, S. & AURICH, C. Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. **Anim Reprod Sci**, v. 102, n. 1, p. 13, 2007.
- SCHNOBRICH, M.R. Disorders of the Reproductive Tract, *In: Equine Internal Medicine: Fourth Edition*. Elsevier Inc., p. 1217–1364, 2016.
- SCHWALBACH, L.M.J.; GREYLING, J.P.C. & TAYLOR, G.J. Postpartum reproductive tract score in beef cows – a proposed method. **S Afr J Anim Sci**, v. 30, p. 120–121, 2000.
- SCULLY, S.; EVANS, A.C.; CARTER, F.; DUFFY, P.; LONERGAN, P. & CROWE, M.A.

- Ultrasound monitoring of blood flow and echotexture of the corpus luteum and uterus during early pregnancy of beef heifers. **Theriogenology**, v. 83 n. 3, p. 449-58, 2015.
- SHORT, R.E.; BELLOWS, R.A.; MOODY, E.L. & HOWLAND, B.E. Effects of suckling and mastectomy on bovine postpartum reproduction. **J Anim Sci**, v. 34, n. 1, p. 70-4, 1972.
- SHORT, R.E.; BELLOWS, R.A.; STAIGMILLER, R.B.; BERARDINELLI, J.G. & CUSTER, E.E. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. **J Anim Sci**, v. 68, n. 3, p. 799-816, 1990.
- SMITH, E.G.; BONACKER, R.C.; ANDERSEN, C.M.; VANWYBE, G.M.; SPINKA, C. & THOMAS, J.M. Implications of disparate uterine and ovarian development observed among heifers evaluated during the peripubertal period. **Anim Reprod Sci**, v. 247, p. 107098, 2022.
- SOUZA, A.H.; GÜMEN, A.; SILVA, E.P.B.; CUNHA, A.P.; GUENTHER, J.N.; PETO, C.M.; CARAVIELLO, D.Z. & WILTBANK, M.C. Supplementation with estradiol-17 $\beta$  before the last gonadotropin-releasing hormone injection of the ovsynch protocol in lactating dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 90, p. 4623–4634, 2007.
- SPECKHART, S.L.; OLIVEIRA, F.R.V.; FRANCO, G.A.; VASCONCELOS, J.L.M.; SCHRICK, F.N.; EDWARDS, J.L.; POHLER, K.G. Short Communication: Influence of estrus activity and reproductive tract size and position scores on fertility in *Bos indicus* and *Bos taurus* suckled beef cows. **J Anim Sci**, v. 100, n. 6, p. 141, 2022.
- STEVENSON, J.L.; RODRIGUES, J.A.; BRAGA, F.A.; BITENTE, S.; DALTON, J.C.; SANTOS, J.E. & CHEBEL, R.C. Effect of breeding protocols and reproductive tract score on reproductive performance of dairy heifers and economic outcome of breeding programs. **J Dairy Sci**, v. 91, n. 9, p. 3424-38, 2008.
- STEVENSON, J.S. & BRITT, J.H. A 100-Year Review: Practical female reproductive management. **J Dairy Sci**, v. 100, p. 10292–10313, 2017.
- ŠTIAVNICKÁ, M.; HOŠEK, P.; ABRIL-PARREÑO, L.; KENNY, D.A.; LONERGAN, P. & FAIR, S. Membrane remodulation and hyperactivation are impaired in frozen-thawed sperm of low-fertility bulls. **Theriogenology**, v. 195, p. 115-121, 2023.

- SUTTIYOTIN, P. & THWAITES, C.J. Effect of storage of smears on the staining of ram spermatozoa by eosin or trypan blue. **Aust Vet J**, v. 71, n. 3, p. 87, 1994.
- TALBOT, P. & CHACÓN, R. A triple staining technique for evaluating normal acrosome reaction of human sperm. **J Exp Zool**, v. 215, 201-208, 1981.
- TANGA, B.M.; QAMAR, A.Y.; RAZA, S.; BANG, S.; FANG, X.; YOON, K. & CHO, J. Semen evaluation: methodological advancements in sperm quality-specific fertility assessment - A review. **Anim Biosci**, v. 34, n. 8, p. 1253-1270, 2021.
- TARTAGLIONE, C.M. & RITTA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 62, n. 7, p. 1245-52, 2004.
- THIBIER M. The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. **Reprod Nutr Dev**, v. 45, n. 3, p. 235-42, 2005.
- THUNDATHIL, J.; GIL, J.; JANUSKAUSKAS, A.; LARSSON, B.; SODERQUIST, L.; MAPLETOFT, R. & RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Relationship between the proportion of capacitated spermatozoa present in frozen-thawed bull semen and fertility with artificial insemination. **Int J Androl**, v. 22, n. 6, p. 366-73, 1999
- TIPPENHAUER, C.M.; PLENIO, J.L.; MADUREIRA, A.M.L.; CERRI, R.L.A.; HEUWIESER, W.; BORCHARDT, S. Timing of artificial insemination using fresh or frozen semen after automated activity monitoring of estrus in lactating dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 104, p. 3585-3595, 2021
- UNGERFELD, R.; KMAID, S.; BALDI, F.; & SALVERAGLIO. Probability of pregnancy to artificial insemination either after detected oestrus or at a fixed time in dairy cows: Influence of intrinsic and extrinsic factors in a large-scale, on-farm study, **Reprod Domest Anim**, v. 56, p. 783-91, 2021.
- USDA. 2020. Beef 2017, Beef cow-calf management practices in the United States, Report 1. USDA-APHIS-VS-CEAH-NAHMS. Fort Collins, CO, 2017.
- VADNAIS, M.L. & ALTHOUSE, G.C. Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm. **Theriogenology**, v. 76, p. 1508-1516, 2011.
- VADNAIS, M.L. & ROBERTS, K.P. Effects of seminal plasma on cooling-induced

- capacitative changes in boar sperm. **J Androl**, v. 28, p. 416–422, 2007.
- VAN DER HORST, G. Computer Aided Sperm Analysis (CASA) in domestic animals: current status, three D tracking and flagellar analysis. **Anim Reprod Sci**, v. 2020, p. 106350, 2020.
- VAN EERDENBURG, F.J.; LOEFFLER, H.S. & VAN VLIET, J.H. Detection of oestrus in dairy cows: a new approach to an old problem. **Vet Q**, v. 18, n. 2, p. 52-4, 1996.
- VARNER, D.D.; BOWEN, J.A. & JOHNSON, L. Effect of heparin on capacitation/acrosome reaction of equine sperm. **Arch Androl**, v. 31, p. 199-207, 1993.
- VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; MARTINEZ, P.; GARCIA-ARTIGA, C. & ROCA, J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane. **Theriogenology**, v. 47, p. 913-922, 1997.
- VERBERCKMOES, S.; VAN SOOM, A.; DEWULF, J. & DE KRUIF, A. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. **Theriogenology**, v. 63, n. 3, p. 912-22, 2005.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M. & ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-79, 2002.
- VISHWANATH, R.; & SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Anim Reprod Sci**, v. 62, n. 1-3, p. 23-53, 2000.
- VIZCARRA, J.A.; WETTEMANN, R.P.; SPITZER, J.C. & MORRISON, D.G. Body condition at parturition and postpartum weight gain influence luteal activity and concentrations of glucose, insulin, and nonesterified fatty acids in plasma of primiparous beef cows. **J Anim Sci**, v. 76, n. 4, p. 927-36, 1998.
- WALKER, W.L.; NEBEL, R.L. & MCGILLIARD, M.L. Time of ovulation relative to mounting activity in dairy cattle. **J Dairy Sci**, v. 79, n. 9, p. 1555-61, 1996.
- WALTERS, D.L.; SCHAMS, D. & SCHALLENBERGER, E. Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the luteal phase of the oestrous cycle in the cow. **J Reprod Fertil**, v. 71, n. 2, p. 479-91, 1984.
- WALTON, A. The Technique of Artificial Insemination. Imperial Bureau Anim. Genetics. Oliver and Boyd, Edinburgh, 1933.

- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod Fertil Dev**, v. 7, n. 4, p. 871-91, 1995.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim Reprod Sci**, v. 60-61, p. 481-92, 2000.
- 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, 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, 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, M.C. & PURSLEY, J.R. The cow as an induced ovulator: Timed AI after synchronization of ovulation. **Theriogenology**, v. 81, p. 170–185, 2014.
- WISHART, D.F. Observations on the oestrous cycle of the friesian heifer. **Vet Rec**, v. 90, p. 595-597, 1972.
- WOELDERS, H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. **Vet Q**, v. 19, n. 3, p. 135-138, 1997.
- WRIGHT, P.J. & MALMO, J. Pharmacologic manipulation of fertility. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 8, n. 1, p. 57-89, 1992.
- YÁNEZ-ORTIZ, I.; CATALÁN, J.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; MIRÓ, J. & YESTE, M. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. **Anim Reprod Sci**, v. 246, p. 106904, 2022.
- YANG, D.H.; STANDLEY, N.T. & XU, Z.Z. Application of liquid semen technology under the seasonal dairy production system in New Zealand. **Anim Reprod Sci**, v. 194, p. 2–10, 2018.
- YÁNIZ, J.L.; SANTOLARIA, P.; MARCO-AGUADO, M.A. & LÓPEZ-GATIUS, F. Use

of image analysis to assess the plasma membrane integrity of ram spermatozoa in different diluents. **Theriogenology**, v. 70, p. 192-8, 2008.

YAVAS, Y. & WALTON, J.S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. **Theriogenology**, v. 54, n. 1, p. 25-55, 2000.

YE, H.; JIANHONG, A.N.; SISI, Z.; HONG, S. Image-Pro Plus and ImageJ: Comparison and application in image analysis of biological tissues. **Chin J Stereol Image Anal**, v. 20, p. 185–196, 2015.

YOUNG, C.D.; SCHRICK, F.N.; POHLER, K.G.; SAXTON, A.M.; DI CROCE, F.A.; ROPER, D.A.; WILKERSON, J.B. & EDWARDS, J.L. Short communication: A reproductive tract scoring system to manage fertility in lactating dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 100, n. 7, p. 5922-5927, 2007.

ZHANG, K.; LENSTRA, J.A.; ZHANG, S.; LIU, W.; & LIU, J. 2020. Evolution and domestication of the bovine species. **Anim Genet**, v. 51, p. 637–657, 2020.