

**Silvio Costa e Silva**

**DINÂMICA FOLICULAR E QUALIDADE DE EMBRIÕES DE NOVILHAS  
GIROLANDO SUBMETIDAS A PROTOCOLOS DE INSEMINAÇÃO  
ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal

Orientador: Prof. Álan Maia Borges

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Ricarda Maria dos Santos  
(Universidade Federal de Uberlândia)

**Belo Horizonte  
Escola de Veterinária da UFMG  
2017**

S586d Silva, Silvio Costa e, 1991-  
Dinâmica folicular e qualidade de embriões de novilhas Girolando submetidas a protocolos de inseminação artificial em tempo fixo / Silvio Costa e Silva. – 2017.

56 p. : il.

Orientador: Alan Maia Borges

Co-orientadora: Ricarda Maria dos Santos

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

I. Novilho – Inseminação artificial – Teses. 2. Bovino de leite – Reprodução – Teses.  
3. Embriões – Qualidade – Teses. I. Borges, Alan Maia. II. Santos, Ricarda Maria dos.  
III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

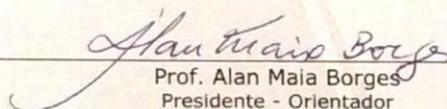
CDD – 636.214 082

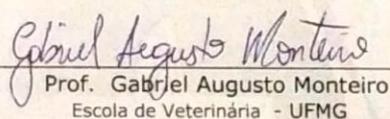
**FOLHA DE APROVAÇÃO**

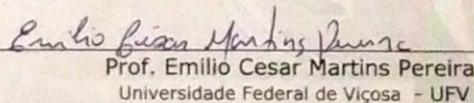
**SILVIO COSTA E SILVA**

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração REPRODUÇÃO ANIMAL.

Aprovada em 15 de Março de 2017, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof. Alan Maia Borges  
Presidente - Orientador

  
Prof. Gabriel Augusto Monteiro  
Escola de Veterinária - UFMG

  
Prof. Emilio Cesar Martins Pereira  
Universidade Federal de Viçosa - UFV

## DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho a todos os animais e todas aquelas pessoas que me apoiaram e me ajudaram de forma direta ou indireta, sejam elas familiares ou amigos.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar comigo, me guiando e auxiliando em todos os momentos;

Aos meus pais Romildo e Cleonice, por me apoiarem sempre, me dando todo suporte que necessito, estando perto ou longe; Além de meu irmão Edson e sua esposa Mariana, pelo companheirismo e me apoiarem nessa caminhada;

A minha noiva Ana Renata, por me ajudar e apoiar em todo o momento desse estudo, tendo paciência e compreensão;

Aos animais que participaram do experimento, pois sem eles nada disso seria possível de ser realizado;

Ao orientador Prof. Alan, por conceber a oportunidade de sua orientação, e pela confiança depositada em minha pessoa;

Ao Professor Emílio, por ter me ajudado imensamente nesse projeto, em todo o momento, no planejamento, na coleta dos dados, nas análises estatísticas, na escrita, além de abrir as portas de sua casa em Uberlândia para que eu pudesse morar enquanto coletava os dados;

Ao Professor Alex Matos, por abrir as portas da Fazenda Experimental do Glória, da Universidade Federal de Uberlândia, depositando confiança e me dando todo o suporte que precisava para executar o experimento;

A co-orientadora Professora Ricarda Santos, pelo auxílio na execução e escrita da dissertação;

Ao Professor Gabriel por ter aceitado em participar como membro da banca avaliadora;

Aos amigos João e Nat, que me ajudaram em muitos momentos, com as análises, e os procedimentos envolvendo os embriões e a todos os colegas da pós-graduação orientados pelo Prof. Alan, pela ajuda direta ou indireta;

Aos estagiários Jordana, Fernanda, Giselle, Mariana, Noelli, Vinicius e Rudi, que tive a oportunidade de trabalharmos juntos, e no qual me ajudaram profundamente nas coletas, além de toda a equipe de funcionários da Fazenda do Glória, Carla, Divino, Sr. Wilson, Vinicius, Dona Maria, Rogean e Gilmar, pelo auxílio e companheirismo;

À Deise, pela ajuda com as análises e coletas dos embriões, além de todos os colegas de pós-graduação do Laboratório de reprodução da UFU;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

À Escola de Veterinária da UFMG e ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, por contribuírem para minha formação profissional;

A todos aqueles que por eventualidade esqueci de citar, mas que me ajudaram de alguma forma, o meu muito obrigado. Sem vocês não conseguiria completar essa etapa tão importante de minha vida!

---

## SUMÁRIO

---

	<b>Pág.</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	7
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	8
<b>RESUMO</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1 DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA DURANTE O CICLO ESTRAL NATURAL.....	14
2.1.1 Ondas de crescimento folicular ovariano.....	25
2.2 PARTICULARIDADES DO CICLO ESTRAL ENTRE <i>BOS TAURUS TAURUS</i> , <i>BOS TAURUS INDICUS</i> E MESTIÇAS.....	16
2.3 MANIPULAÇÃO HORMONAL DA DINÂMICA OVARIANA.....	19
2.3.1 Ovsynch.....	20
2.3.2 CO-Synch.....	20
2.3.3 Select Synch.....	21
2.3.4 Heatsynch.....	23
2.3.5 5d-CO-Synch.....	23
2.3.6 Protocolos com associação de progesterona e estradiol.....	24
2.4 QUALIDADE DO FOLÍCULO NA SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO E OVULAÇÃO.....	25
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	32
4.1 DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA RELACIONADA AO CIO NATURAL DE NOVILHAS MESTIÇAS.....	32
4.2 DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE IATF EM NOVILHAS.....	36
4.3 QUALIDADE DE EMBRIÕES DE NOVILHAS SUBMETIDAS A DIFERENTES PROTOCOLOS DE IATF.....	43
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	47
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	48
<b>7. ANEXO 1</b> .....	56

---

## LISTA DE TABELAS

---

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1.</b> Parâmetros da dinâmica folicular ovariana de novilhas Girolando com ciclos estrais caracterizados por duas ou três ondas foliculares.-----	33
<b>Tabela 2</b> Características foliculares e luteais de novilhas Girolando de acordo com o estro natural ou induzido por dois diferentes protocolos de IATF.-----	35
<b>Tabela 3.</b> Características foliculares e luteais de novilhas da raça Girolando submetidas a dois diferentes protocolos de IATF.-----	36
<b>Tabela 4.</b> Taxas (%) de manifestação de estro e de ovulação de novilhas Girolando submetidas a dois diferentes protocolos de IATF. -----	41
<b>Tabela 5.</b> Taxa de recuperação e classificação morfológica de embriões (IETS, 1999) coletados de novilhas Girolando submetidas a dois protocolos de IATF.-----	43
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros de qualidade e tamanho de embriões de novilhas Girolando submetidas a dois protocolos de IATF. -----	44

---

## LISTA DE FIGURAS

---

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Representação gráfica do desenvolvimento folicular ovariano de fêmeas bovinas submetidas ao protocolo 5d-CO-Synch.....	22
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática dos protocolos hormonais para sincronização de estro e ovulação. GnRH.....	28
<b>Figura 3.</b> Representação gráfica do desenvolvimento dos folículos de novilhas Girolando com ciclo estral caracterizado por duas ondas foliculares. ....	32
<b>Figura 4.</b> Representação gráfica do desenvolvimento dos folículos de novilhas Girolando com ciclo estral caracterizado por três ondas foliculares. ....	33
<b>Figura 5.</b> Porcentagem de ovulação pelo número de horas entre a retirada do implante de P4 até a ovulação de novilhas Girolando submetidas a dois protocolos de IATF. ....	39
<b>Figura 6.</b> Dispersão de ovulações de novilhas Girolando submetidas a dois protocolos de IATF. -	39
<b>Figura 7.</b> Intervalo da inseminação artificial em tempo fixo até a ovulação de novilhas Girolando submetidas a dois protocolos de IATF. ....	40
<b>Figura 8.</b> Taxa de manifestação do estro em novilhas Girolando submetidas a dois protocolos de IATF. ....	41
<b>Figura 9.</b> Taxa de ovulação de novilhas Girolando submetidas a dois protocolos de IATF. ....	42
<b>Figura 10.</b> Visualização em microscópio de fluorescência de blastocistos bovinos produzidos através da IATF corados com DAPI e TUNEL. ....	44
<b>Figura 11.</b> Visualização em microscópio de fluorescência de blastocistos bovinos produzidos através da IATF corados com DAPI e TUNEL. ....	45

## RESUMO

O estudo avaliou a dinâmica folicular ovariana durante o ciclo estral natural e após dois protocolos hormonais visando Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) de novilhas Girolando, além da qualidade dos embriões provenientes de tais protocolos. O experimento foi constituído de duas etapas: a primeira composta por avaliações ultrassonográficas diárias de 30 novilhas, em período de 30 dias; e a segunda consistiu na avaliação da dinâmica folicular das mesmas novilhas submetidas a dois protocolos de IATF, além da avaliação dos embriões provenientes de tais protocolos. Foram utilizadas as mesmas 30 novilhas Girolando da primeira etapa, e as mesmas foram alocadas em dois tratamentos: T1 (n=15) as novilhas foram submetidas ao protocolo consistindo na manutenção de dispositivo de progesterona (P4) por nove dias (9d), sendo a inserção do implante de terceiro uso (utilizado previamente por 18 dias) no primeiro dia do protocolo (D0) e 2 mg de Benzoato de Estradiol (BE) intramuscular (IM). Em seguida, após sete dias, foi administrado 150µg Prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>); no nono dia após o começo do protocolo os dispositivos foram retirados e foi administrado 1 mg de Cipionato de Estradiol (CE) IM e, ao final, no décimo primeiro dia, foi feita a IATF pela manhã, alcançando um prazo de 48 horas entre a retirada do implante até a IATF; no T2 (n=15) as novilhas foram submetidas ao protocolo 5d-CO-Synch + Implante de progesterona, recebendo no D0 o dispositivo intravaginal de P4 de terceiro uso e 100µg de Hormônio liberador de Gonadotrofina (GnRH) IM. Após cinco dias os implantes foram retirados e foi administrado 150µg de PGF<sub>2α</sub> IM; no sexto dia foi repetida a dose de 150µg de PGF<sub>2α</sub> IM, no oitavo dia foi administrado 100µg de GnRH e feita a IATF na parte da manhã, obtendo um prazo de 72 horas da retirada do implante até a IATF. Sete dias após as inseminações as novilhas dos dois grupos foram submetidas a lavagens uterinas, para a coleta dos embriões. Exames ultrassonográficos foram realizados diariamente a partir do D0 até o dia da ovulação, de acordo com o grupo experimental. Durante o ciclo estral natural as novilhas apresentaram ciclos caracterizados por duas (6/11) ou três ondas foliculares (5/11), com duração média de 21,66 ± 1,36 e 22,40 ± 3,36 dias respectivamente. Para novilhas com duas ondas foliculares, a primeira onda obteve duração média de 18,33 ± 3,32 dias, com diâmetro máximo de folículo dominante de 14,05 ± 2,16 mm, com taxas de crescimento e regressão de 1,20 ± 0,42 mm/dia e 0,93 ± 0,17 mm/dia, respectivamente. A segunda onda teve duração média de 10,33 ± 2,65 dias, com diâmetro máximo do folículo dominante de 14,68 ± 2,23 mm que diferiu (P<0,05) entre os animais com duas e três ondas foliculares, e taxas de crescimento de 1,08 ± 0,33 mm/dia até a ovulação. Para novilhas com três ondas foliculares, a primeira onda teve duração média de 17,0 ± 1,87 dias, sendo que o diâmetro do folículo dominante foi de 13,70 ± 1,45 mm, possuindo taxa de crescimento de 1,00 ± 0,14 mm/dia, e posterior taxa de regressão de 1,1 ± 0,37 mm/dia. Na segunda onda folicular a duração foi de 12,2 ± 2,38 dias, possuindo folículo com diâmetro

máximo de  $11,22 \pm 1,21$  mm, proporcionando assim taxa de crescimento de  $0,94 \pm 0,19$  mm/dia e, posteriormente, taxa de regressão de  $1,04 \pm 0,60$  mm/dia. Em relação a terceira onda folicular a duração média foi de  $8,60 \pm 4,03$  dias, com diâmetro máximo de  $13,26 \pm 1,74$  mm, tendo como crescimento diário  $1,30 \pm 0,36$  mm até a ovulação. Quanto a dinâmica folicular ovariana nos protocolos de IATF, os animais apresentaram, para T1 e T2 respectivamente, diâmetro do folículo no D0 de  $12,01 \pm 3,17$  mm e  $12,79 \pm 3,33$  mm, diâmetro do folículo no segundo dia após a inserção do implante de P4 (D2) de  $11,29 \pm 3,23$  mm e  $8,29 \pm 3,58$  mm, diâmetro do folículo no dia da inseminação artificial de  $11,25 \pm 3,88$  mm e  $12,82 \pm 3,13$  mm e diâmetro do folículo pré-ovulatório de  $13,67 \pm 3,65$  mm e  $13,47 \pm 2,35$  mm. O intervalo da retirada do implante até a ovulação foi de  $70,67 \pm 15,33$  horas e  $105,60 \pm 16,24$  horas, e os volumes dos corpos lúteos no sétimo dia após a ovulação de  $3,97 \pm 1,81$  cm<sup>3</sup> e  $3,96 \pm 1,89$  cm<sup>3</sup>, diferindo ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos em relação a diâmetro do folículo no D2, diâmetro do folículo no dia da inseminação artificial, e horas da retirada do implante até a ovulação. As taxas de estros e ovulações foram de 90% e 48,3% e de 65% e 83,3% para T1 e T2, respectivamente. A qualidade embrionária não diferiu ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos, possuindo diâmetros após a coleta de  $0,18 \pm 0,25$  µm e  $0,11 \pm 0,035$  µm, respectivamente, volume (mm<sup>3</sup>) após a fixação em paraformaldeído de T1 =  $0,002 \pm 0,0005$ , e T2 =  $0,002 \pm 0,0007$ , número totais de células de T1 =  $54,00 \pm 13,91$ , e T2 =  $65,33 \pm 27,11$ , e número de células apoptóticas de T1 =  $9,47 \pm 7,03$  e T2 =  $13,39 \pm 5,55$ . Contudo em relação a dinâmica folicular dos animais em estro natural, única diferença encontrada foi o diâmetro do folículo dominante na segunda onda entre novilhas que possuem duas ou três ondas foliculares. Em relação aos protocolos hormonais que alteram a duração do proestro os mesmos implicam em modificações no diâmetro folicular das novilhas Girolando, e o aumento na duração do proestro implicou em ampliação no intervalo da retirada do implante de progesterona ao estro e à ovulação, que pode dificultar a programação de inseminações em tempo fixo, porém não modificaram a qualidade dos embriões. O GnRH aplicado no momento da inseminação artificial aumenta a taxa ovulatória em protocolos de IATF. Tratamento com CE ao final do protocolo hormonal induz alta taxa de estros, porém sem correspondência na taxa ovulatória.

**Palavras chave:** Dinâmica Folicular; Embrião; Folículo; Novilhas; Protocolos de IATF;

## ABSTRACT

The study evaluated the ovarian follicular dynamics during the natural estrous cycle and after two hormonal protocols aiming at Fixed Time Artificial Insemination (FTAI) of Girolando heifers, besides the quality of the embryos coming from such protocols. The experiment consisted of two stages: the first one consisted of daily ultrasonographic evaluations of 30 heifers, in a period of 30 days; and the second consisted in evaluating the follicular dynamics of the same heifers submitted to two FTAI protocols, besides the evaluation of the embryos coming from such protocols. Thirty Girolando heifers were used, allocated in two treatments: T1 (n = 15) heifers submitted to the protocol consisting of maintenance a progesterone implant (P4) for 9 days (9d) were used, with insertion of the third use implant (previously used for 18 days) on the first day of the protocol (D0) and 2 mg of intramuscular Estradiol Benzoate. Then, after 7 days, 150 $\mu$ g PGF2 $\alpha$  was given; on the ninth day after the start of the protocol the implant were withdrawn and 1 mg of intramuscular Estradiol Cypionate (EC) was administered and, at the end, on the eleventh day, FTAI was given; In T2 (n = 15) heifers were submitted to the 5d-CO-Synch + Progesterone Implant protocol, receiving in D0 the intravaginal implant of P4 third use (previously used for 18 days) and 100 $\mu$ g intramuscular GnRH. After five days the implants were removed and 150 $\mu$ g intramuscular PGF2 $\alpha$  was administered; on the sixth day the 150 $\mu$ g dose of intramuscular PGF2 $\alpha$  was repeated, on the eighth day 100 $\mu$ g of GnRH was administered and made the FTAI. Seven days after the inseminations the heifers of both groups were submitted to uterine washes, for the collection of the embryos. Ultrasound examinations were performed daily from D0 until the day of ovulation, according to the experimental group. During the natural estrous cycle, heifers presented cycles characterized by two (6/11) or three follicular waves (5/11), with a mean duration of  $21.66 \pm 1.36$  and  $22.40 \pm 3.36$  days respectively. For heifers with two follicular waves, the first wave had a mean duration of  $18.33 \pm 3.32$  days, with a maximum dominant follicle diameter of  $14.05 \pm 2.16$  mm, with growth and regression rates of  $1.20 \pm 0.42$  mm and  $0.93 \pm 0.17$  mm per day, respectively. The second wave had a mean duration of  $10.33 \pm 2.65$  days, with a maximum dominant follicle diameter of  $14.68 \pm 2.23$  mm, which differed (P <0.05) between animals with two and three follicular waves, and growth rates of  $1.08 \pm 0.33$  mm/day until ovulation. For heifers with three follicular waves, the first wave had an average duration of  $17.0 \pm 1.87$  days, and the diameter of the dominant follicle was  $13.70 \pm 1.45$  mm, with a growth rate of  $1.00 \pm 0.14$  mm/day, and later regression rate of  $1.1 \pm 0.37$  mm/day. In the second follicular wave, the duration was  $12.2 \pm 2.38$  days, with a follicle with a maximum diameter of  $11.22 \pm 1.21$  mm, thus providing a growth rate of  $0.94 \pm 0.19$  mm/day and, regression rate of  $1.04 \pm 0.60$  mm/day. In relation to the third follicular wave, the mean duration was  $8.60 \pm 4.03$  days, with a maximum diameter of  $13.26 \pm 1.74$  mm, with a daily growth of  $1.30 \pm 0.36$  mm until ovulation. For the follicular dynamics in the FTAI

protocols, for T1 and T2, respectively, the follicle diameter in the D0 was  $12.01 \pm 3.17$  mm and  $12.79 \pm 3.33$  mm, the follicle diameter on the second day after the insertion of the implant P4 (D2) of  $11.29 \pm 3.23$  mm and  $8.29 \pm 3.58$  mm, follicle diameter on the day of the artificial insemination of  $11.25 \pm 3.88$  mm and  $12.82 \pm 3.13$  mm and preovulatory follicle diameter of  $13.67 \pm 3.65$  mm and  $13.47 \pm 2.35$  mm. The interval from implant withdrawal to ovulation was  $70.67 \pm 15.33$  hours and  $105.60 \pm 16.24$  hours, and result of volumes to luteal bodies on the seventh day after ovulation of  $3.97 \pm 1.81$  cm<sup>3</sup> and  $3.96 \pm 1.89$  cm<sup>3</sup>, differing ( $P < 0.05$ ) between treatments in relation to follicle diameter in D2, follicle diameter on the day of artificial insemination, and hours from implant withdrawal to ovulation. The estrus and ovulation rates were 90% and 48.3% and 65% and 83.3% for T1 and T2, respectively. The embryo quality did not differ ( $P > 0.05$ ) between the treatments, having diameters after collection of  $0.18 \pm 0.25$   $\mu$ m and  $0.11 \pm 0.035$   $\mu$ m, respectively, after fixation in paraformaldehyde (mm<sup>3</sup>) of T1 =  $0.002 \pm 0.0005$ , and T2 =  $0.002 \pm 0.0007$ , total cell numbers of T1 =  $54.00 \pm 13.91$ , and T2 =  $65.33 \pm 27.11$ , and number of apoptotic cells of T1 =  $9.47 \pm 7.03$  and T2 =  $13.39 \pm 5.55$ . However, in relation to the follicular dynamics of the animals in natural estrus, the only difference found was the diameter of the dominant follicle in the second wave among heifers that have two or three follicular waves. In relation to the hormonal protocols that alter the duration of proestrus, they imply changes in the follicular diameter of the Girolando heifers, and the increase in the duration of proestrus implied an increase in the interval between the withdrawal of the progesterone implant from estrus and ovulation, which may hinder the programming of inseminations in fixed time, but did not modify the quality of the embryos. GnRH applied at the time of artificial insemination increases the ovulatory rate in FTAI protocols. Treatment with EC at the end of the hormonal protocol induces high estrus, but without correspondence in the ovulatory rate.

**Keywords:** Embryo; Follicle; Follicular Dynamics; FTAI protocols; Heifers.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem posição mundial de destaque no setor agropecuário devido, principalmente, por sua ampla área agricultável e disponibilidade de recursos naturais para a produção de alimentos. No setor da pecuária de leite o país está entre os cinco maiores produtores do mundo, com produção de 35.174.271 litros de leite no ano de 2015 (EMBRAPA, 2016) a partir de 23.064.495 de vacas ordenhadas, que perfaz média de 1.525 litros de leite por vaca ao ano. Quando comparamos com a produção de leite nos Estados Unidos, esse país produziu cerca de 94 bilhões de litros de leite em 2015, perfazendo uma produção média na lactação de 10.165 litros de leite/animal, o que demonstra que são bastante eficientes, quando comparado à produção Brasileira (SBA, 2016).

Segundo ABCG, (2016) animais provenientes de cruzamento entre as raças Holandesa e Gir, conhecidos como Girolando predominam no território nacional. Vacas de tal raça são responsáveis pela produção de 80% do leite no Brasil, e tal utilização no país se deve a diversas características, das quais se destacam: produtividade, rusticidade, fertilidade, e sua alta capacidade de adaptar a diversos tipos de manejo e clima.

A melhoria da eficiência produtiva e reprodutiva dos rebanhos nacionais depende do emprego de tecnologias e estudos, principalmente relacionados com a eficiência reprodutiva e, dentre elas, as biotécnicas da reprodução, como é o caso da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) (Binelli *et al.*, 2014).

A IATF é uma biotecnica da reprodução amplamente utilizada em território nacional, tanto em rebanhos de carne quanto leiteiros. A utilização dessa ferramenta apresenta vantagens substanciais no manejo reprodutivo de gado leiteiro, permitindo a melhoria dos índices reprodutivos. Tal método consiste na administração de vários hormônios buscando o controle das ondas foliculares do animal, e fazendo com que o mesmo ovule em momento pré-determinado. Neste sentido, é possível sincronizar a ovulação e, conseqüentemente, a inseminação artificial, permitindo uma de suas maiores vantagens que seria a inseminação sem a observação da expressão do estro (Baruselli *et al.*, 2016).

No mercado estão disponíveis várias opções de protocolos hormonais, porém, deve-se investigar em quais situações cada um se enquadra, principalmente para a raça Girolando, que ainda carece de avaliações experimentais sobre sua fisiologia ovariana e resposta à utilização hormonal como prática de manejo reprodutivo. Os estudos das características reprodutivas fisiológicas, associadas ao acompanhamento dos eventos endócrinos que controlam a reprodução, podem fornecer informações que ajudem nos programas de IATF.

Diante do pressuposto, esse trabalho se propôs estudar a dinâmica folicular ovariana de novilhas Girolando durante o ciclo estral natural e submetidas a dois protocolos de IATF, com diferentes intervalos de proestro (5d – CO-Synch + P4, vs. Dispositivo de P4-9d), como ferramenta para melhorar o manejo da IATF e a eficiência reprodutiva dos rebanhos. Para isso obteve como objetivos as avaliações do número de ondas foliculares, diâmetros dos folículos ovulatórios, taxa de crescimentos foliculares, taxa de ovulações, taxa de manifestações de estros, número de horas entre a retirada do implante de progesterona até a inseminação artificial, e até a ovulação, além da qualidade dos embriões provenientes dos protocolos de IATF em estudo.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 – DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA DURANTE O CICLO ESTRAL NATURAL**

A ultrassonografia facilitou e aperfeiçoou a compreensão da fisiologia ovariana das fêmeas bovinas, pois proporciona a possibilidade de avaliação e acompanhamento diário do aparelho reprodutivo, uma vez que permite observar folículos com tamanho superiores a 4-5 mm e corpos lúteos (Kastelic, 1994), favorecendo estudos da fisiologia ovariana durante o ciclo estral.

O ciclo estral da fêmea bovina é compreendido entre duas ovulações consecutivas, caracterizado por alterações hormonais sincronizadas entre os hormônios produzidos no hipotálamo (hormônio liberador de gonadotrofinas - GnRH); na adenohipófise (hormônio luteinizante - LH e o hormônio folículo estimulante - FSH); nos ovários (estrógeno - E2 e a progesterona - P4); no útero (prostaglandina -  $PGF_{2\alpha}$ ); além de alterações anatômicas (vulva edemaciada e hiperêmica) e de comportamento (aumento da vocalização, maior atenção ao meio, e aceitação da monta). Esses eventos envolvem órgãos como o útero, ovários, eixo hipotálamo-hipófise e sistema nervoso central (González, 2002).

De acordo com Gonçalves (2001), a duração média do ciclo estral em bovinos é de 21 dias quando mantidas em condições ambientais adequadas, sendo o mesmo dividido em proestro (3 dias), estro (18 horas), metaestro (2-3 dias) e diestro (14 dias). Tal duração de ciclo é confirmada por Almeida, (1998) onde avaliou a dinâmica folicular ovariana em novilhas Holandesas, Gir e mestiças Girolando, obtendo resultados médios de 20,78; 20,41; e 21,21 dias de duração respectivamente.

A fase de proestro tem duração em média 72 horas e tem como principal evento a lise do corpo lúteo e consequente queda na concentração sanguínea de P4. Com a diminuição deste hormônio, estimula-se liberação de GnRH e consequentemente de FSH e LH, o que acarreta um aumento no desenvolvimento folicular, e posteriormente um aumento na concentração de E2 (Noakes, 1997). Já o estro consiste em uma fase de máxima liberação de E2, causada pelo intenso crescimento folicular, com duração aproximada entre 12 e 18 horas para espécie bovina. Durante esta fase, a fêmea muda seu comportamento e deixa ser montada, tanto por machos quanto por outras fêmeas (sinal indicativo de cio). Nesta fase a concentração sérica de P4 estará em níveis basais (Grunert e Gregory, 1989).

Segundo Noakes (1997), o metaestro se inicia pela recusa da fêmea a monta. Nesta fase, a fêmea bovina ovula, e após a ovulação, as células remanescentes do folículo dão início a formação do corpo hemorrágico, que evolui e torna-se corpo lúteo. O corpo lúteo é a estrutura responsável pela produção de P4, que aumenta seus níveis até alcançar seu pico em aproximadamente 12 dias, quando se encontra na fase do diestro. Nesta última fase nota-se presença do corpo lúteo funcional, mantido até a próxima fase, onde ocorrerá a sua lise por ação da  $PGF_{2\alpha}$ , por volta do 17º dia (Noakes, 2001).

### 2.1.1 – ONDAS DE CRESCIMENTO FOLICULAR OVARIANO

Durante o ciclo estral bovino ocorrem sucessivas ondas de crescimento e regressão de folículos ovarianos, que culmina, no dia do estro, na presença de um folículo dominante que será ovulado. Este padrão de crescimento folicular é denominado dinâmica folicular (Borges, 2001), de modo que cada onda possui fases de recrutamento, seleção, dominância e atresia ou ovulação do folículo dominante.

A duração do ciclo estral é estabelecida em razão do período de funcionalidade do corpo lúteo, secretor de progesterona, cuja ação é inibitória à liberação de LH e, portanto, limitando o potencial ovulatório do folículo dominante e, desta forma, leva à atresia folicular e às sucessivas ondas foliculares (Fortune, 1994). Para que ocorra ovulação é necessária a regressão luteal, permitindo aumento na produção de estradiol, responsável por desencadear o pico pré-ovulatório de LH e, consequentemente, a ocorrência de ovulação (Fortune *et al.*, 1994). O recrutamento é a fase inicial de uma onda folicular, quando, cerca de cinco a dez folículos cresce simultaneamente em cada ovário (Kastelic, 1994). Essa fase é precedida pelo aumento transitório da liberação de FSH hipofisário e, consequentemente, atua nos ovários proporcionando a estimulação do crescimento de novos folículos (Senger, 2003).

Dentre o grupo de folículos antrais recrutados, por meio da interação das gonadotrofinas FSH e LH, de fatores de crescimento e outras substâncias intra-ovarianas (Oliveira *et al.*, 2011), ocorrerá a segunda etapa da onda folicular conhecida por seleção, divergência ou desvio (Castilho, 2005), e é o momento no qual dentre os folículos recrutados, há a determinação de qual folículo continuará crescendo para chegar até a dominância. Um dos fatores que determinam o crescimento desse folículo selecionado é mudança na dependência pelas gonadotrofinas, de FSH para LH, devido ao surgimento de receptores de LH nas células da granulosa (Driancourt, 2001), além da presença da maior concentração de estrógeno e inibina, responsáveis em promover feedback negativo hipofisário à secreção de FSH, limitando o crescimento dos demais folículos (Bao e Garverick, 1998).

A terceira fase de uma onda folicular é denominada de dominância. É quando o folículo, após a divergência, passa a ser o dominante e continua seu crescimento constante até a ovulação, enquanto os outros folículos recrutados irão regredir. Caso o folículo dominante não ovule, devido ao bloqueio progesterônico da secreção de LH durante a fase luteal, o mesmo sofrerá regressão. O folículo dominante adquire capacidade de crescimento aumentada devido sua maior capacidade de resposta ao LH/FSH que, por sua vez, está diretamente relacionado à esteroidogênese e, especialmente, a capacidade de produção de estradiol (Fortune *et al.*, 1994). Logo, quanto maior o diâmetro folicular, maior sua capacidade de produção de estradiol, e maior sua capacidade de resposta ao FSH e LH, já que possui maior número de receptores para essas gonadotrofinas, além da relação com diversos fatores locais como o fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I), responsável pela maturação e proliferação das células foliculares (Oliveira *et al.*, 2011), além de potencializar e amplificar a resposta do folículo às gonadotrofinas (Driancourt, 2001).

## 2.2 - PARTICULARIDADES DO CICLO ESTRAL DE FÊMEAS BOVINAS *BOS TAURUS TAURUS*, *BOS TAURUS INDICUS*, E MISTIÇAS.

Certas características reprodutivas de fêmeas bovinas, tais como comportamento estral, concentração de hormônios esteróides, diâmetro do folículo dominante, diâmetro de folículo ovulatório e subordinado, área de tecido luteal, e características reprodutivas do pós-parto apresentam particularidades entre zebuínos, taurinos, e seus cruzamentos (Barros *et al.*, 1995; Figueiredo *et al.*, 1997; Pinheiro *et al.*, 1998; Sartori *et al.*, 2010).

O estro normalmente tem menor duração em fêmeas *Bos taurus indicus*, o que dificulta sua detecção em relação a *Bos taurus taurus* (Bó *et al.*, 2003). Em fêmeas *Bos taurus taurus* a duração do estro é de 18 a 19 horas e, em fêmeas *Bos taurus indicus*, de 13 a 16 horas, apesar de que a duração desta fase pode variar entre fêmeas do mesmo grupo genético (Adams *et al.*,

2008). Além disto, segundo Membrievé (2000), a maioria das vacas *Bos taurus indicus* iniciam os sinais de cio no período noturno.

Em um estudo realizado por Mizuta (2003), avaliou-se o comportamento estral em vacas de corte taurina e zebu, sob condições de manejo no clima tropical e com a utilização de radiotelemetria (HeatWatch), e foi verificado que a duração do estro em *Bos taurus taurus* foi maior que em *Bos taurus indicus*. O estro na raça Angus teve duração de  $26,1 \pm 6,3$  h enquanto que em Nelore foi de  $12,9 \pm 2,9$  horas. Quanto ao intervalo de estros e ovulações não diferiu entre as duas raças (Angus  $26,1 \pm 6,3$  h vs Nelore,  $27,1 \pm 3,3$  h).

Em vacas leiteiras de alta produção (acima de 40kg de leite/dia), como vacas da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*), deve-se levar em consideração a alta taxa metabólica hepática, que faz com que eles apresentem menor concentração sanguínea dos hormônios ligados à reprodução, dentre eles estrógeno e progesterona. Conseqüentemente, com a metabolização de estradiol, a duração do estro será menor. Essas informações fortalecem a ideia de que é preciso ter conhecimento das características comportamentais do estro e ovulação de *Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus*, e mestiços para que a aplicação de programas e biotécnicas de reprodução sejam bem sucedidas (Wiltbank *et al.*, 2006).

Quanto aos aspectos da dinâmica folicular, também existem diferenças entre as duas subespécies (Martins, 2007), e seus cruzamentos (Almeida, 1998). Taurinos podem apresentar menor número de ondas que os zebuínos, com predominância de duas ondas em *Bos taurus taurus* (Ginther *et al.*, 1989) e três em *Bos taurus indicus* (Borges, 2001). Já os animais mestiços não possuem uma predominância perante o número de ondas foliculares, podendo apresentar tanto duas (Borges, 1999) quanto três ondas (Alves *et al.*, 2002). Animais que apresentam três ondas foliculares tendem a apresentar maior duração do ciclo estral (Baruselli *et al.*, 2007). O número das ondas foliculares também interfere no intervalo dos recrutamentos foliculares, sendo que em ciclos com duas ondas há relatos de intervalo de nove dias entre elas e, em ciclos de três ondas, esse intervalo é menor, de sete dias (Martins, 2005).

Zebuínos, taurinos, e mestiços também apresentam diferenças quanto ao diâmetro máximo do folículo dominante (Martins, 2007). Segundo Baruselli *et al.* (2007), em animais que possuem duas ondas de crescimento folicular, os diâmetros máximos em *Bos taurus indicus* chegam até 11,3 na primeira onda e 12,1 na segunda onda, enquanto *Bos taurus taurus* alcançam 17,1 e 16,5 mm respectivamente. Em animais com três ondas de crescimento folicular obteve-se 16,0; 12,9 e 13,9 mm para taurinos, e de 10,4; 9,4 e 11,6 mm para zebuínos. Se tratando de animais mestiços, aqueles que apresentam duas ondas de crescimento folicular os diâmetros máximos chegam a 12,67 mm na primeira onda, e 13,33 mm na segunda, enquanto

aqueles de três ondas foliculares apresentam 12,24, 9,95, e 11,76 mm na primeira, segunda e terceira onda respectivamente (Borges, 1999). Portanto, o diâmetro do folículo dominante e ovulatório em taurinos são maiores que em zebuínos, que por sua vez se assemelha com os resultados obtidos pelos mestiços.

O folículo subordinado de taurinos também tende a possuir maior diâmetro que dos zebuínos, e mestiços (Martins, 2007). Em zebuínos, a divergência da primeira onda folicular acontece 2,5 a 2,7 dias transcorridos da ovulação, e inicia quando o folículo dominante alcança diâmetro entre 5,4 a 6,2 mm e o subordinado 5,3 a 5,9 mm. Porém Borges (1999) avaliando respostas ovarianas em fêmeas Girolando obteve um resultado de divergência folicular em média 2,8 a 2,9 dias após a ovulação com um diâmetro de 6,7 a 7,1 mm para o folículo subordinado. Corroborando com o encontrado para taurinos onde o início da divergência ocorre 2,8 dias após a emergência folicular, quando o folículo subordinado apresenta 7,2 mm e o dominante atinge 8,3mm (Baruselli *et al.*, 2007).

O diâmetro do corpo lúteo de *Bos taurus taurus* parece ser maior que em *Bos taurus indicus*, variando de 20 a 30 mm e 17 a 21 mm de diâmetro para taurinos e zebuínos, respectivamente (Baruselli *et al.*, 2007). Alves (2002) em estudo com animais Taurinos e mestiços, também obteve valores maiores de área dos corpos lúteos para animais taurinos (42,4 mm<sup>2</sup>) quando comparado com os mestiços (26,2 mm<sup>2</sup>). Além disso, estudos indicam que, a concentração de P4 produzida pelo corpo lúteo também é superior em taurinos, em relação aos zebuínos, provavelmente decorrente da proporcionalidade de seus diâmetros (Segerson *et al.*, 1984). De acordo com Randel (1976) fêmeas zebuínas puras ou cruzadas possuem menor concentração de P4 por grama de tecido luteal do que fêmeas *Bos taurus taurus*.

Fêmeas *Bos taurus indicus* recrutam mais folículos por onda de crescimento folicular ( $33,4 \pm 3,2$ ) (Carvalho *et al.*, 2008), assim como mestiças (Almeida, 1998) do que fêmeas *Bos taurus taurus* ( $25,4 \pm 2,5$ ), o que tornam as fêmeas zebuínas mais eficientes que as taurinas com relação à Superovulação (SOV), *Ovum pick up* (OPU) e Produção *In Vitro* de Embriões (PIV) (Carvalho *et al.*, 2008). Há estudos que indicam que a quantidade de folículos recrutados por onda difere de animal para animal, e é uma característica com alta repetibilidade durante a vida reprodutiva de uma fêmea (Boni *et al.*, 1997).

Diversos estudos têm mostrado que animais com menor reserva ovariana de folículos antrais possuem baixa fertilidade, ovários menores, menor reserva folicular ovariana, menor quantidade de hormônio anti-Mulleriano (AMH), e concentração de progesterona durante o ciclo estral, menor espessura endometrial e maior quantidade de marcadores de células do *cummulus*, que estão associados a menor qualidade dos oócitos (Seneda *et al.*, 2016).

### 2.3 – MANIPULAÇÃO HORMONAL DA DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA

A inseminação artificial é a biotécnica mais utilizada no mundo, na busca de disseminar o mérito genético dos touros nos rebanhos, buscando, assim, o melhoramento genético. No entanto, a cada dia, essa técnica vem sendo utilizada em associação com a manipulação hormonal do ciclo estral, como forma de sincronizar o estro e a ovulação, em protocolos conhecidos por IATF (Baruselli *et al.*, 2012).

De acordo com Wiltbank *et al.* (2016), a aplicação desses protocolos vem crescendo devido seu poder em sincronizar a ovulação aumentando, assim, a taxa de animais gestantes por serviço, pois, por meio dos protocolos de IATF pode-se estabelecer “Programas de fertilidade” na fazenda. Segundo Vasconcelos (2006), os protocolos tem a vantagem de utilizar a inseminação artificial sem a observação de cio, considerada um entrave dentro dos sistemas de produção de gado de corte e leite, principalmente devido a escassez de mão-de-obra.

Dados atuais (Baruselli, 2016) no Brasil mostram que a cada 100 inseminações artificiais de bovinos de corte e de leite, 77% são via IATF. Para rebanhos leiteiros, cerca de 50% do rebanho nacional, no ano de 2015, foi submetido a IATF, totalizando volume de 2,3 milhões de fêmeas inseminadas. Entre os anos de 2002 a 2015 houve aumento de 50% no número de animais submetidos a protocolos de IATF, enquanto ocorreu redução de 27% no número de animais inseminados com observação visual do estro.

A utilização de hormônios para indução e sincronização de estros e ovulações de bovinos tem como objetivo o controle do crescimento folicular e da função do corpo lúteo (Silva *et al.*, 2009). Segundo Larson *et al.* (2006), quando a utilização de hormônios é empregada corretamente, observa-se aumento do número de vacas em estro e inseminadas, com consequente redução no período de serviço e do intervalo de partos.

Segundo Teixeira (2010), a IATF trouxe grande avanço no manejo reprodutivo dos rebanhos leiteiros, aumentando a taxa de gestação, culminando em maior eficiência reprodutiva e produtiva, até mesmo quando comparada com a inseminação convencional após a observação do estro.

Os protocolos hormonais desenvolvidos atualmente buscam, de certa forma, utilizar algumas estratégias para ajustar os processos endócrinos do animal, das quais cita-se: controle das concentrações de progesterona durante o crescimento folicular, para a favorecer a qualidade do ovócito; reduzir a concentração de progesterona circulante antes da inseminação artificial, de forma a aumentar a taxa de gestação; e proporcionar maior concentração de estrógeno antes da

inseminação, ou seja, no proestro, para beneficiar a fecundação do ovócito, e reduzir a mortalidade embrionária precoce (Binelli *et al.*, 2014).

Atualmente, inúmeros são os protocolos de sincronização de estros disponíveis no mercado que foram, de alguma forma, norteados pelo primeiro protocolo hormonal difundido comercialmente, o Ovsynch (“sincronizador da ovulação”).

### 2.3.1- Ovsynch

A metodologia do protocolo Ovsynch consiste na associação de duas doses de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e uma dose de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ). A primeira dose de GnRH é aplicada no dia 0 (D0) do protocolo e tem como objetivo induzir a ovulação de um possível folículo dominante. Adicionalmente, essa aplicação possibilitará o surgimento de nova onda de crescimento folicular dentro de dois a três dias e, sete dias após, será administrada dose de  $PGF_{2\alpha}$  com o objetivo de causar a luteólise, permitindo o crescimento e a maturação final do folículo dominante. Após 48 horas da aplicação da  $PGF_{2\alpha}$  é procedida a aplicação da segunda dose de GnRH relacionada com o pico do LH, permitindo a ovulação do folículo pré-ovulatório. A inseminação artificial é recomendada de 16 a 20 horas após a última aplicação do GnRH (Pursley *et al.*, 1995).

Pursley *et al.* (1997) não encontram diferença significativa nas taxas de gestação quando compararam resultados do protocolo Ovsynch (38,9%) com a inseminação convencional após observação visual do estro (37,8%) em vacas leiteiras de alta produção. Segundo os autores, o resultado mostra a possibilidade de inseminar os animais através da IATF, sem a observação de estro.

### 2.3.2– CO-Synch

O protocolo CO-Synch foi desenvolvido com o intuito de melhorar a qualidade do ovócito e, conseqüentemente, aumentar a fertilidade e a taxa de gestação. O CO-Synch é um protocolo de sincronização de estro e ovulação no qual a aplicação da segunda dose do GnRH coincide com o dia da inseminação artificial, com conseqüente otimização da maturidade do folículo pré-ovulatório e, portanto, da taxa de gestação. Estudo realizado com 665 vacas em lactação pré-sincronizadas avaliou a eficiência da administração do GnRH juntamente com a inseminação artificial (protocolo CO-Synch). Foi observado aumento de 8% na taxa de gestação, ou seja, 31% para CO-Synch e 23% para o OvSynch (Portaluppi *et al.*, 2005).

Larson *et al.* (2006) e Wiltbank *et al.* (2012) verificaram relação da concentração plasmática de progesterona (P4) antes da IATF e a fertilidade subsequente, tornando-se

necessário assegurar concentrações de P4 em momentos antes da inseminação artificial a fim de melhorar a fertilidade. Quando os autores utilizaram implantes intravaginais de progesterona, obtiveram um aumento de 11 pontos percentuais nas taxas gestacionais, onde obtiveram 43,4% no protocolo CO-Synch e 53,8% no CO-Synch associado ao implante de progesterona (Larson *et al.*, 2006). Essa medida torna-se relevante principalmente para o gado leiteiro de alta produção que apresenta alta metabolização de hormônios esteróides pelo sistema hepático (Wiltbank *et al.*, 2012). Com isso, alguns estudos foram realizados com intuito de avaliar a suplementação de P4 nos animais durante os protocolos de sincronização usando implantes intravaginais com liberação lenta do hormônio, sendo observada melhoria nas taxas de gestação, como em estudo feito por Lamb *et al.*, (2001), onde autores tiveram uma taxa gestacional de 44% em vacas multíparas de corte submetidas ao protocolo CO-Synch, e 60% para vacas submetidas ao protocolo CO-Synch associado ao implante intravaginal de progesterona

Larson *et al.* (2006) compararam as taxas de gestação de protocolos de IATF (CO-Synch e CO-Synch + implante de P4) com aquelas obtidas em protocolos que eram submetidos a detecção de estro e, posteriormente, inseminação artificial (Select Synch e Select Synch + implante de P4 - tais protocolos serão abordados no próximo tópico). Os autores observaram que ao adicionar o implante de P4 ao protocolo de IATF obtiveram maior taxa de gestação, (CO-Synch – 43,4%, e CO-Synch + implante de P4 – 53,8%). Ademais, observaram que a utilização do protocolo CO-Synch + implante de P4 resultou em taxas de gestação semelhantes à de protocolos com detecção de estro, tendo como resultados 53,8% e 53,0% respectivamente, tornando-o um protocolo de sincronização confiável e que elimina a detecção de estros.

### 2.3.3 – 5d-CO-Synch

Recentemente foi desenvolvido um protocolo similar ao CO-Synch + implante de P4 que proporciona maior duração do proestro, ou seja, período maior entre o início da luteólise e o estro. No entanto, para que isso ocorra é necessário que haja a retirada antecipada do implante de P4 no quinto dia do protocolo. Conforme a Figura 1, o protocolo consiste na aplicação de uma dose de GnRH no primeiro dia juntamente com o implante de P4, com o objetivo de proporcionar o recrutamento de uma nova onda folicular, seja pela ovulação de um folículo dominante ou regressão dos folículos que não possuem capacidade ovulatória, posteriormente terá uma aplicação de PGF<sub>2α</sub>, juntamente com a retirada do implante no quinto dia, acarretando no aumento do intervalo de proestro e reduzindo o período de dominância folicular, no sexto dia terá novamente aplicação de PGF<sub>2α</sub> com o intuito de reafirmar a lise do Corpo Lúteo proveniente de uma possível ovulação pela primeira dose de GnRH, e por final a inseminação concomitante com a aplicação GnRH no oitavo dia.

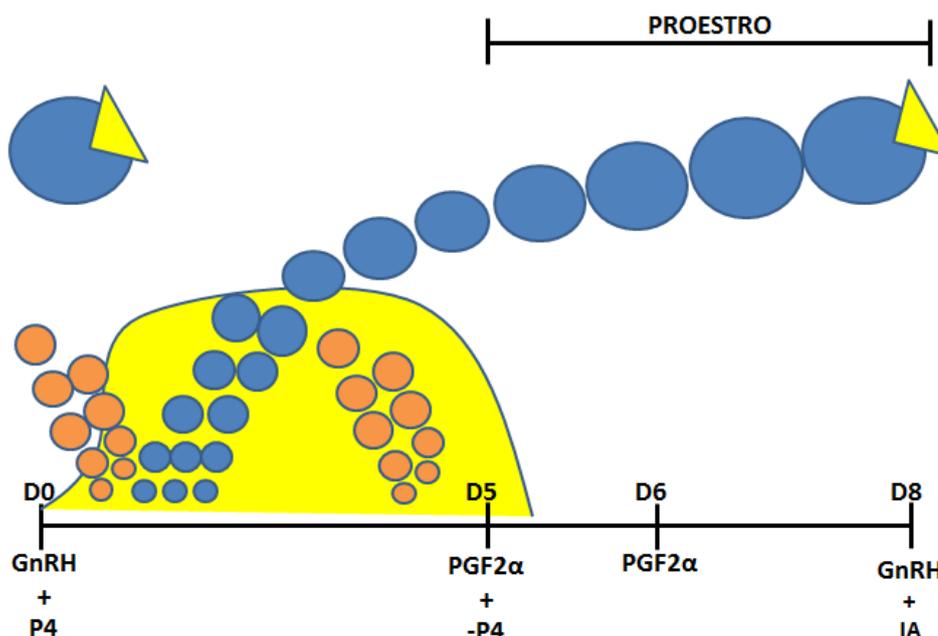


Figura 1: Representação gráfica do desenvolvimento folicular ovariano de fêmeas bovinas submetidas ao protocolo 5d-CO-Synch. GnRH = hormônio liberador de gonadotrofinas;  $PGF_{2\alpha}$  = prostaglandina  $F_{2\alpha}$ ; P4 = progesterona; D0 = dia zero: dia da inserção do implante de progesterona; D5 = dia 5; D6 = Dia 6; D8 = dia 8; símbolos azuis = folículos em crescimento; símbolos alaranjados = folículos em regressão; curva amarela = concentração de progesterona; símbolo azul com triângulo amarelo = folículo dominante ovulatório.

Esse protocolo é conhecido como 5d-CO-Synch + Implante de P4 e foi inicialmente desenvolvido para gado de corte, mas, posteriormente, utilizado em novilhas leiteiras. A antecipação dos dias de administração de GnRH e da  $PGF_{2\alpha}$ , de sete para cinco dias, resultou em aumento da fertilidade dos animais com diferenças na taxa de gestação de 9,1% (Bridges *et al.*, 2008).

Santos *et al.* (2010) realizaram estudo semelhante e observaram efeito da redução no período da dominância do folículo com a taxa de gestação em vacas de aptidão leiteira. Foi observado que o protocolo que aumentava o período do proestro (5dias – CO-Synch) resultou em melhoria de 7% na taxa de gestação, quando comparado com o protocolo de sete dias (CO-Synch). Por fim, os autores observaram que ao reduzir o tempo dominância do folículo ovulatório em protocolos de IATF, promoveu-se melhoria na fertilidade de vacas em lactação.

Pesquisas realizadas com vacas lactantes de alta produção onde foram avaliadas a influência do período de dominância folicular sobre o processo de fecundação e qualidade embrionária, observaram que o aumento do período de dominância do folículo não alterou o processo de fecundação. Por outro lado, observaram redução da qualidade embrionária, mesmo quando o período de dominância foi estendido por 1,5 a dois dias. Vacas inseminadas após a sincronização do estro tiveram maior proporção de embriões degenerados, o que esteve associado com o maior tempo de dominância do folículo, devido ao aumento do tempo da

regressão do corpo lúteo até o estro e a inseminação artificial (Cerri *et al.*, 2009). Revah e Butler (1996) verificaram que ovócitos provenientes de folículos com maior período de dominância possuem ativação prematura da meiose, sugerindo que tal fato pode ser um dos responsáveis pela baixa fertilidade encontrada em protocolos de sincronização de estro e ovulação, onde o uso de progestágenos pode prolongar a vida útil do folículo.

Além da relação existente entre o aumento do proestro e a qualidade do folículo, Bridges *et al.* (2010) observaram que animais tratados com protocolos que aumentam o proestro obtiveram concentrações de estradiol maiores, mesmo não havendo diferença entre os diâmetros dos folículos ovulatórios. Além disso, as concentrações de estradiol durante o proestro afetaram diretamente o ambiente uterino, auxiliando o desenvolvimento embrionário nos primeiros dias de gestação. Contudo, a maior duração do proestro e, conseqüentemente, a maior concentração de estradiol, proporcionaram maior expressão de genes referentes à codificação para receptores de estradiol e progesterona no útero durante os primeiros 15,5 dias de gestação (Bridges *et al.*, 2012).

#### 2.3.4– Select Synch

O protocolo Select Synch tem a particularidade de incluir a observação de estro previamente à inseminação artificial. No entanto, ainda continua tendo como base a administração do GnRH no primeiro dia com o intuito de ovulação e, após sete dias, a aplicação de PGF<sub>2α</sub>, para induzir a luteólise de eventual corpo lúteo existente. Após a aplicação da prostaglandina, Stevenson *et al.* (2000), por meio de seus estudos, afirmaram que a maioria das vacas manifestam estro após 36 a 72 horas, estando aptas a serem inseminadas. No entanto, segundo Geary *et al.* (2000), cerca de 8 a 10% dos animais demonstraram estro fora desse período de tempo. Além disso, a literatura demonstra que nem todas as vacas apresentarão estro, variando de 7 a 61% de expressão de estro (Kesler *et al.*, 2005).

Rabiee *et al.* (2005) mostraram que o protocolo Select Synch possui eficiência semelhante ao Ovsynch porém, o Select synch precisa ter a observação de cio, o que é considerado ponto crítico para o protocolo. Em contrapartida, Jobst *et al.* (2000) relataram menor taxa de prenhes em protocolos Ovsynch, do que Select Synch, devido a fertilidade ser maior quando se observa o cio do que inseminar em tempo fixo.

#### 2.3.5 – Heatsynch

O protocolo HeatSynch é mais uma variação do Ovsynch, tendo como diferença a substituição do agente indutor da ovulação no último manejo, de GnRH para Cipionato de

estradiol (CE). Com isso a inseminação artificial que ocorreria após 16 horas do GnRH, passa a ser 48 horas após a administração do CE (Rablee *et al.*, 2005). Esta substituição tem grande vantagem devido ao menor valor comercial do CE quando comparado ao GnRH. Além disso, na literatura encontra-se a afirmação desta substituição não ocasionar em perdas na eficiência do protocolo, mensurada pela taxa de gestação. Segundo Bartolome *et al.* (2005), em estudo feito com vacas em lactação foram comparadas as taxas de gestação de animais submetidos a protocolos Ovsynch e Heatsynch, não sendo verificadas diferenças entre eles, sendo de 25,2%, 17,5% e 13,9% para Ovsynch, e de 25,8%, 19,9% e 16,1% para o HeatSynch aos 27, 45 e 90 dias de gestação.

### 2.3.6 – Protocolos com associação de Progesterona e Estradiol

No Brasil, a maioria dos protocolos de IATF são baseados na associação de progesterona e estradiol, tanto pelo menor valor comercial desses protocolos, quanto por sua utilização legal de esteroides em rebanhos leiteiros e de corte nacionais.

As sincronizações de estro e ovulação de bovinos, com utilização de progesterona, foram desenvolvidas com base na sua ação fisiológica inibitória da manifestação comportamental do estro e da ovulação (Christian *et al.*, 1948).

A progesterona vem sendo utilizada por períodos prolongados, desde a década de 60, com o intuito de provocar a regressão espontânea do corpo lúteo. Conseqüentemente, cerca de dois a quatro dias após a remoção da fonte de P4 ocorre a sincronização do estro (Rathbone *et al.*, 2001). Porém, quando se utiliza dessa metodologia de sincronização, buscando a regressão espontânea do corpo lúteo, o implante de P4 fica atuando por 14 a 21 dias. Essa longa ação da P4 é eficiente na sincronização, porém, estudos mostram que essa mesma ação acarreta em formação de folículos maiores e persistentes, que são “velhos” e de baixa fertilidade (Kinder *et al.*, 1996).

Quando a progesterona é associada ao estrógeno, eles são responsáveis pela regressão dos folículos em crescimento, e sincronizam o surgimento de uma nova onda folicular (Caccia *et al.*, 1995).

Dentre os ésteres de estradiol disponíveis no mercado nacional verifica-se o 17 $\beta$  estradiol, Benzoato de Estradiol (BE), Cipionato de Estradiol (CE), e Valerato de Estradiol (VE), cujas diferenças estão ligadas ao tempo de ação entre eles. De acordo com Bó *et al.*, (1995), a administração de 5mg de 17 $\beta$  estradiol, associado a implantes de P4, sincronizam a emergência de uma nova onda folicular cerca de 4,3  $\pm$  0,2 dias após a administração dos fármacos. O BE

administrado via intramuscular em combinação com 50mg de P4 sincronizam nova onda folicular, em média, após  $4,1 \pm 0,1$  dias (Moreno *et al.*, 2001).

A associação de P4 com VE (Mapletoft *et al.*, 1999) e o CE (Colazo *et al.*, 2003) também proporciona regressão dos folículos, porém, a emergência de uma nova onda folicular acontece em momentos imprevisíveis, e tal fato ocorre porque suas meias-vidas são mais longas, quando comparamos com os outros ésteres já citados (Bó *et al.*, 1995).

## 2.4 – QUALIDADE DO FOLÍCULO NA SINCRONIZAÇÃO

Diversas mudanças endócrinas nos hormônios sexuais acontecem nos momentos antes e após a ovulação, estando relacionadas à elevação de estradiol antes da ovulação e de progesterona pós-ovulação. Essas variações estão diretamente relacionadas ao crescimento do folículo pré-ovulatório e, conseqüentemente, ao tamanho do corpo lúteo (Binelli *et al.*, 2014).

Folículos pré-ovulatórios de diâmetros maiores produzem maior concentração de estrógeno no proestro e estro e, conseqüentemente, desenvolvem corpo lúteo de maior diâmetro e com maior capacidade de produção de progesterona no diestro (Mesquita *et al.*, 2014). Ao contrário, aqueles folículos menores que ovularam resultarão corpos lúteos menores e de baixa produção de progesterona, levando a insuficiência no desenvolvimento embrionário e acarretando em baixa fertilidade (Lonergan *et al.*, 2013).

De acordo com Sá Filho *et al.*, (2010), vacas de corte que possuem folículos pré-ovulatórios maiores, apresentam maiores taxas de gestação que podem, dentre outras coisas, estarem ligadas ao maior tamanho do corpo lúteo e à maior produção de progesterona para manter a gestação. A progesterona possui efeitos benéficos no tecido endometrial, responsável pela produção de histotrofo ou “leite uterino”, que tem como função “nutrir” o embrião (Bazer, 2008). As mudanças no ambiente uterino também estão relacionadas à melhora do transporte espermático, aumentando, assim, a taxa de concepção (Sá Filho *et al.*, 2011).

Uma das estratégias para incrementar os índices de fertilidade em protocolos hormonais para IATF é aumentar o crescimento do folículo até a ovulação, reduzindo a concentração de P4 durante o desenvolvimento folicular, e aumentando a duração do proestro, que é o intervalo compreendido entre a regressão do corpo lúteo e a ovulação (Bridges *et al.*, 2008). Quando se reduz a concentração de P4 tem-se o aumento da pulsatilidade do LH que acarreta no desenvolvimento folicular (Kojima *et al.*, 2003).

Basicamente, a melhoria nos índices de fertilidade de animais submetidos aos protocolos de IATF, está associada aos mecanismos relacionados ao ambiente uterino. Por sua vez, devido

às exposições sequenciais de maiores concentrações de E2 no proestro e de P4 no diestro, permite-se melhor ambiente uterino para a recepção do embrião (Bridges *et al.*, 2013).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no período de janeiro a junho de 2016, na Fazenda Experimental do Glória da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), localizada no município de Uberlândia-MG. Os animais permaneceram em piquetes de *Brachiaria decumbens*, recebendo suplementação mineral e água *ad libitum* durante todo o experimento, sendo apenas contidos para a administração de fármacos, avaliações ultrassonográficas, coletas de sangue e lavagem uterina para coleta dos embriões. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA – UFU; protocolo de número 056/16).

Foram utilizadas 30 novilhas Girolando (3/4 a 7/8 Holandês x Gir), não gestantes, com média de 22 meses de idade, cíclicas, com escore de condição corporal em média  $3,0 \pm 0,34$  (escore 1 = muito magra e escore 5 = muito gorda; de acordo com Ferreira, 1990), e peso vivo médio de  $390 \pm 62$  kg. Os animais foram selecionados por meio de exame ginecológico (palpação retal, exame ultrassonográfico e vaginoscopia). Foram utilizadas as novilhas que estavam ciclando regularmente, sem qualquer alteração clínica ou reprodutiva.

O estudo da dinâmica folicular ovariana foi feito por meio de ultrassonografia transretal diária realizada por um único operador, sendo registrados os diâmetros (milímetros) do maior e segundo maior folículo presentes em cada ovário, e o diâmetro (milímetros) do corpo lúteo.

A avaliação da dinâmica folicular ovariana foi realizada em duas etapas: na primeira, avaliou-se o padrão de crescimento e regressão folicular durante o ciclo estral natural; e na segunda etapa, o padrão de crescimento e a regressão folicular foram avaliados durante dois protocolos hormonais distintos para indução do estro e da ovulação.

Para o estudo da dinâmica folicular ovariana durante o ciclo estral, as novilhas receberam injeção intramuscular de 150µg de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  (D-Cloprostenol), com o objetivo de induzir a ovulação do maior número de novilhas, para acompanhamento da dinâmica folicular, a partir de então, foi realizado diariamente exame ultrassonográfico transretal (Ultrassom Mindray®, modelo DP2200vet, acoplado a transdutor linear de 5,0MHz) durante 30 dias consecutivos, com o intuito de avaliar as alterações ovarianas durante um ciclo estral completo das novilhas.

O intervalo estral foi definido como o número de dias compreendidos entre duas ovulações consecutivas, caracterizadas pela não detecção do folículo de maior diâmetro no exame subsequente e pela posterior formação do corpo lúteo.

A emergência da onda folicular foi estabelecida quando ocorreu a visualização, no exame ultrassonográfico, de um ou mais folículos com diâmetro entre 4 a 5 mm. Cada onda folicular foi dividida em três fases: crescimento, estática e regressão. A fase de crescimento (dias) compreendeu o período de visualização inicial do folículo até o dia em que atingiu diâmetro máximo, ou seja, quando cessou seu crescimento. A fase estática foi considerada entre o último dia de crescimento máximo até o início da fase de regressão de seu diâmetro, e a fase de regressão foi desde o último dia do diâmetro estático até atingir o diâmetro de 4 a 5 mm (Ginther *et al.*, 1989).

O folículo dominante (FD) foi aquele que obteve o maior diâmetro (milímetros) dentre os outros presentes nos ovários. Foi considerado apenas um folículo subordinado por onda, sendo classificado como um que apareceu simultaneamente ao folículo dominante, porém de diâmetro inferior ao considerado dominante, e superior aos demais folículos encontrados (Borges, 1999).

Os diâmetros dos folículos dominante e subordinado foram medidos pela maior distância (mm) entre dois pontos da cavidade antral dos folículos a partir de 4 ou 5 mm. Quando o folículo atingiu seu diâmetro máximo, foi obtida a duração em dias de seu crescimento e foi calculada a taxa de crescimento (mm/dia), por meio da diferença dos diâmetros final e inicial, dividido pelo número de dias. Da mesma forma, foi analisada a duração em dias de sua atresia e a taxa de regressão folicular, esta última obtida pela diferença dos diâmetros devido à redução diária nas medidas foliculares (mm) até o valor de 4 e 5 mm, dividido pelo número de dias (Borges, 1999).

Os volumes dos corpos lúteos (VCL, cm<sup>3</sup>) e das cavidades dos corpos lúteos, quando presentes, foram calculadas pela fórmula matemática:  $V = \frac{4}{3} \pi \cdot a/2 \cdot (b/2)^2$ , onde a = eixo longitudinal e b = eixo transversal, modificada por Borges (2001).

A duração da onda de crescimento folicular foi determinada pelo número de dias entre a emergência e a regressão do folículo dominante até o diâmetro de 4 e 5 mm. O dia da divergência folicular foi considerado como o dia em que as curvas de crescimento dos folículos dominante e subordinados diferiram ao decorrer do crescimento folicular na respectiva onda folicular. A partir do dia da divergência foi calculada a duração da dominância folicular, que compreende o intervalo do dia da divergência até o surgimento de uma nova onda folicular (Borges, 2001).

Para o estudo da segunda etapa da dinâmica folicular ovariana, foram utilizadas 30 novilhas Girolando, considerando as mesmas metodologias da primeira etapa. Os animais foram distribuídos uniformemente em dois grupos experimentais ( $n = 15$ ), representados por dois diferentes protocolos de sincronização do estro e da ovulação. Cada novilha foi submetida, sucessivamente, a quatro repetições do mesmo protocolo, compreendendo 120 observações, 60 de cada protocolo. Entre cada repetição do protocolo foi feita administração IM de  $150\mu\text{g}$  de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , além de respeitar um período de descanso de 10 dias, com intuito de minimizar o efeito residual do protocolo anterior.

Dois protocolos de sincronização dos estros e das ovulações (Figura 2) foram utilizados: protocolo convencional utilizando dispositivo intravaginal de progesterona durante nove dias (P4-9d); e protocolo curto utilizando cinco dias de dispositivo intravaginal de progesterona associado ao CO-Synch (5d – CO-Synch + P4). Para cada protocolo foram utilizadas 15 novilhas.

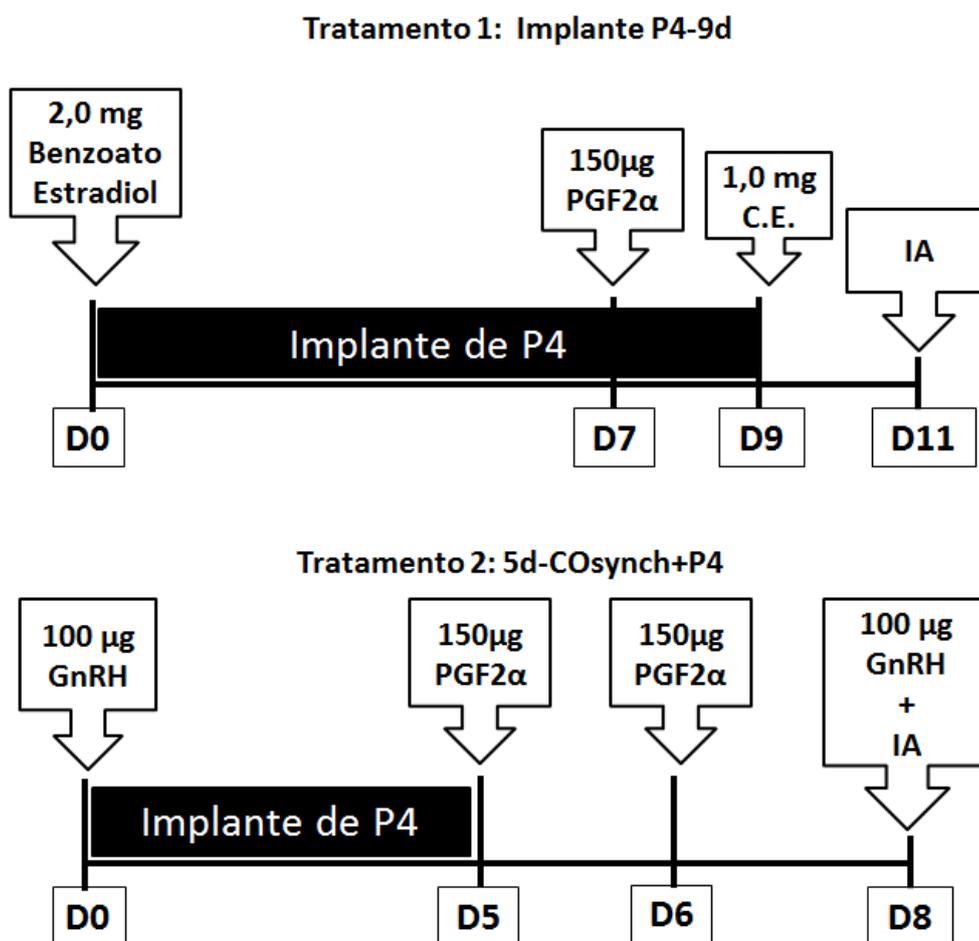


Figura 2. Representação esquemática dos dois protocolos hormonais utilizados para a sincronização de estros e ovulações.

GnRH: hormônio liberador de gonadotrofinas;  $\text{PGF}_{2\alpha}$ : prostaglandina  $\text{F}_{2\alpha}$ ; C. E.: Cipionato de Estradiol; IA: inseminação artificial.

No tratamento 1 as novilhas receberam no dia zero (D0) inserção do dispositivo de progesterona<sup>1</sup> que foi mantido durante nove dias (P4-9d), associado à aplicação IM de 2 mg de Benzoato de Estradiol (BE). Após sete dias (D7) foram administradas IM 150µg PGF<sub>2α</sub> e, no nono dia (D9) após o início do protocolo, o dispositivo foi retirado e cada animal recebeu 1 mg de Cipionato de Estradiol (CE) IM. No décimo primeiro dia (D11), foi realizada a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), compreendendo um intervalo de 48 horas entre a retirada do implante até a IATF.

No tratamento 2, as novilhas receberam no D0 100µg de GnRH intramuscular e inserção do dispositivo de progesterona<sup>2</sup> que foi mantido durante cinco dias (5d-CO-Synch + CIDR). Após cinco dias (D5) os implantes foram retirados e cada novilha recebeu 150µg de PGF<sub>2α</sub> intramuscular. No sexto dia (D6) foi repetida a dose de 150µg de PGF<sub>2α</sub> intramuscular e, no oitavo dia (D8) do protocolo, foi administrado 100µg de GnRH e realizada a IATF, obtendo um intervalo de 72 horas entre a retirada do implante e a IATF. Os implantes intravaginais utilizados foram o Sincrogest<sup>®</sup> (OuroFino, Cravinhos, São Paulo, Brasil) e os hormônios GnRH (Gonaxal<sup>®</sup>), BE (Bioestrogen<sup>®</sup>), CE (Croni-cip<sup>®</sup>), PGF<sub>2α</sub> (Croniben<sup>®</sup>) da Biogenesis Bagó SA (Garín, Buenos Aires, Argentina).

Para estudo da dinâmica folicular ovariana e desenvolvimento luteal de novilhas Girolando durante os protocolos hormonais para sincronização do estro e da ovulação, foram realizados exames ultrassonográficos transretais (Mindray<sup>®</sup>, modelo DP2200vet, acoplado a transdutor linear de 5,0MHz) em momentos pré-determinados como no dia da inserção do dispositivo de progesterona (D0), no segundo dia após o início dos protocolos (D2), nos dias de administrações das prostaglandinas (D7 para tratamento 1, e D5 para tratamento 2), nos dias das retiradas dos implantes (D9 para tratamento 1, e D5 para tratamento 2), e no dia da IATF (D11 para tratamento 1, e D8 para tratamento 2). Sete dias após a IATF, os animais foram submetidos a nova avaliação ultrassonográfica, com o objetivo de confirmar a ovulação, e avaliar o diâmetro e volume do corpo lúteo. Foram avaliados os diâmetros máximos dos maiores folículos no D0, no dia 2 (D2) e no dia da inseminação artificial (DIA), e as medidas de VCL (cm<sup>3</sup>), usando da mesma metodologia citada no experimento 1. Também foram mensurados os diâmetros dos folículos até a ovulação (DOv), com o objetivo de avaliar o diâmetro do folículo ovulatório e o intervalo da retirada do dispositivo de progesterona (P4) à ovulação, considerado como o intervalo médio da última avaliação que o folículo esteve presente até a sua não detecção no ovário.

---

<sup>1</sup> Implante de progesterona de terceiro uso, utilizado anteriormente por 18 dias.

<sup>2</sup> Implante de progesterona de terceiro uso, utilizado anteriormente por 18 dias.

Com o objetivo de avaliação da manifestação do estro, os animais no dia anterior a IATF, foram marcados com bastão marcador na base da cauda de acordo com o seu tratamento (D10 nos animais do tratamento 1, e D7 nos animais do tratamento 2). No dia da inseminação artificial eram submetidos a avaliação visual, sendo aqueles animais que apresentassem ausência do bastão marcador eram considerados que haviam aceitado a monta, e portanto manifestado estro. E em contrapartida aqueles animais que ainda estavam com a presença do bastão marcador eram considerados que não haviam aceitado a monta e, portanto não manifestaram o estro.

Passados sete dias da inseminação artificial, as novilhas foram submetidas a lavagens uterinas para coleta dos prováveis embriões, com o intuito de avaliar a qualidade dos mesmos. O processo de lavagem foi realizado depois de ser realizada a anestesia epidural baixa, com aplicação de 3 ml de Lidocaína 2% sem vasoconstritor. Logo em seguida da anestesia foi utilizado sonda do tipo Foley de número 18 acoplada ao circuito em Y, para a lavagem utilizando solução fisiológica 0,9% de NaCl à temperatura de 37° C.

Após a lavagem o filtro coletor foi lavado com solução fisiológica 0,9% de NaCl, a solução foi transferida para uma placa de Petri visando o rastreamento embrionário em microscópio estereoscópio (SZ 40, Olympus, Washington, EUA). Quando encontrado, o mesmo foi classificado de acordo com *International Embryo Technology Society* (IETS, 1999) e, então, fixados em paraformaldeído 4% por 60 minutos em temperatura ambiente. Depois da fixação, os embriões foram acondicionados em tubos tipo Eppendorf contendo solução salina fosfatada (DMPBS) + BSA, 0,01g de BSA para 10 ml de PBS. Ao término das coletas, no fim de todas as repetições, os embriões foram avaliados e as imagens capturadas em microcomputador para realização de aferições do diâmetro e volume dos embriões, no programa HL-image-97 (Western Vision Software, L.C.).

Em seguida das capturas das imagens, os embriões foram submetidos ao Teste de Tunel, o qual avalia a fragmentação do DNA. Para o teste, as células foram coradas e seus núcleos evidenciados, permitindo a contagem de células íntegras e em apoptose (morte celular programada). Os procedimentos foram feitos de acordo com Pereira (2015). Foi utilizado o Kit comercial *Dead End Fluorimetric TUNEL System* (Promega, Madison, WI, EUA).

Para a confecção das lâminas, os embriões foram inicialmente permeabilizados por imersão em solução de 0,2% de Triton X-100 em solução salina fosfatada e incubados em gotas de tampão de equilíbrio (180 µl), juntamente com mistura de nucleotídeos (20µl), enzima rTdT (4µl) e corante de fluoresceína-12-dUTP, que é responsável por corar o DNA fragmentado. Os embriões permaneceram por 1 hora a 37°C em câmara úmida, coberta com papel alumínio. No

controle negativo, os embriões foram incubados com tampão de equilíbrio sem a enzima rTdT. Já no controle positivo, os embriões foram incubados com tampão de equilíbrio, com as enzimas DNase (2,7U/ $\mu$ l) e fluoresceína-12-dUTP, responsáveis por promover a degradação do DNA das células embrionárias.

Na etapa seguinte as estruturas foram transferidas para lâminas secas e desengorduradas em solução álcool:éter 1:1 e coradas com fluorescência 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) em Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, EUA) e, em seguida, foram recobertas com lamínulas. Todas as células do embrião (embrioblasto, trofoblasto, blastômeros) foram marcadas pelo DAPI e visualizadas na cor azul no filtro de 460nm no microscópio de epifluorescência (Bx 52, Olympus, Washington, EUA). As células apoptóticas foram identificadas no filtro de  $520 \pm 20$ nm corando-se de cor verde pela fluoresceína. As lâminas foram observadas em microscópio de epifluorescência e realizou-se o registro fotográfico através do programa Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). Em seguida, as células íntegras e apoptóticas foram analisadas utilizando o programa Image J (versão 1.42e, dezembro de 2008). O índice apoptótico foi calculado a partir da relação do número total de células e número de células contendo corpos apoptóticos (Kidson *et al.*, 2004).

#### *Análises estatísticas*

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado e todas as variáveis estudadas foram submetidas ao teste de Shapiro Wilk para avaliar sua normalidade.

As variáveis do estro natural (intervalo de ovulações, diâmetro do folículo dominante da 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> onda, duração da 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> onda, taxa de crescimento da 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> onda, taxa de regressão da 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> onda, diâmetro do folículo ovulatório, e volume do corpo lúteo sete dias após a ovulação) que atenderam as premissas da normalidade, as mesmas foram submetidas ao Teste Mann-Whitney.

Os parâmetros relacionados aos protocolos de IATF como: diâmetro do folículo no D0, D2 e no DIA, e o intervalo da retirada do implante até a ovulação foram submetidos ao Teste de Mann-Whitney com grau de significância de 5%. O diâmetro do folículo pré-ovulatório e o VCL sete dias após a ovulação foram submetidos ao teste T de Student. Para a expressão de estro e taxa de ovulação foi utilizado o teste do Qui-quadrado.

As características avaliadas em relação aos embriões, como: taxa de recuperação embrionária, e taxa de apoptose, foram submetidos ao Teste T de Student. O número total de células, diâmetro dos embriões recém-coletados, e volume dos embriões após a fixação foram submetidos ao Teste de Mann-Whitney.

As análises foram realizadas com a versão 17.0 do programa SPSS (SPSS Inc, Chicago, EUA), e o nível de significância considerado foi de 5%.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.1 – DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA RELACIONADA AO ESTRO NATURAL DE NOVILHAS MESTIÇAS

De 30 novilhas estudadas foi possível realizar análises da dinâmica folicular ovariana relacionada ao estro natural de 11 novilhas, pois as 19 restantes não obtiveram duas ovulações consecutivas no intervalo de 30 dias no qual foram avaliadas, por isso as mesmas foram desconsideradas para fazer as análises referente a dinâmica folicular do ciclo estral natural. Desse modo, novilhas Girolando apresentaram padrão de duas a três ondas foliculares, sendo que seis novilhas apresentaram duas e cinco apresentaram três ondas foliculares. O parâmetro de crescimento folicular dos animais com duas e três ondas está sendo representado nas figuras abaixo (Figura 3 e 4).

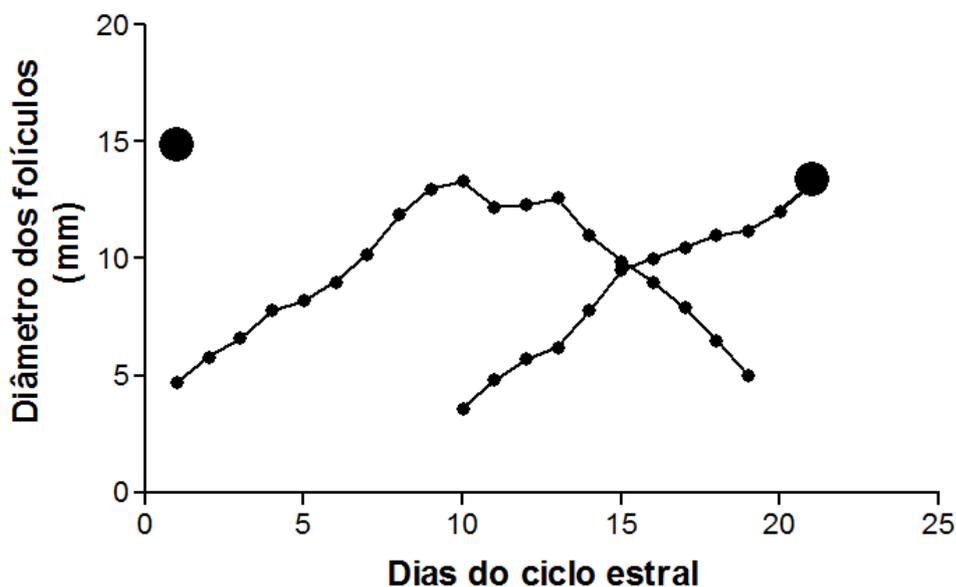


Figura 3: Representação gráfica do desenvolvimento dos folículos de novilhas Girolando com ciclo estral caracterizado por duas ondas foliculares.

Legenda: Pontos no gráfico indicam as médias obtidas.

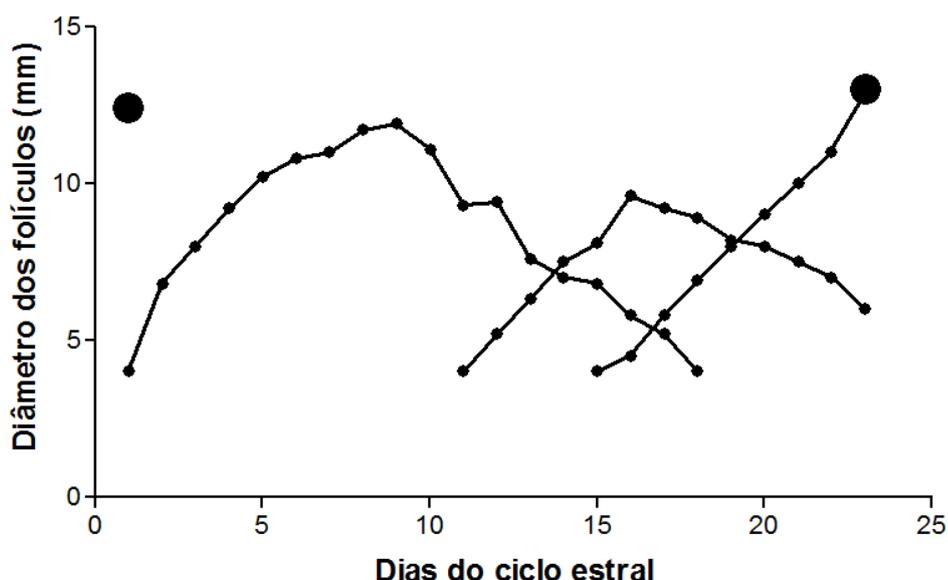


Figura 4: Representação gráfica do desenvolvimento dos folículos de novilhas Girolando com ciclo estral caracterizado por três ondas foliculares.

Legenda: Pontos no gráfico indicam as médias obtidas.

A tabela 1 apresenta parâmetros da dinâmica folicular ovariana considerando o número de ondas foliculares no ciclo estral natural.

Tabela 1: Parâmetros da dinâmica folicular ovariana de novilhas Girolando com ciclos estrais caracterizados por duas ou três ondas foliculares.

VARIÁVEIS AVALIADAS	DUAS ONDAS FOLICULARES	TRÊS ONDAS FOLICULARES
*Intervalo de ovulações (dias)	21,66 ± 1,36a	22,40 ± 3,36a
*Diâmetro do folículo dominante 1ª onda (mm)	14,05 ± 2,16a	13,70 ± 1,45a
* Diâmetro do folículo dominante 2ª onda (mm)	14,68 ± 2,23a	11,22 ± 1,21b
* Diâmetro do folículo dominante 3ª onda (mm)	-	13,26 ± 1,74
*Duração da 1ª onda (dias)	18,33 ± 3,32a	17,0 ± 1,87a
*Duração da 2ª onda (dias)	10,33 ± 2,65a	12,2 ± 2,38a
*Duração da 3ª onda (dias)	-	8,60 ± 4,03
*Taxa de crescimento folículo dominante 1ª onda (mm/dia)	1,20 ± 0,42a	1,00 ± 0,14a
*Taxa de crescimento folículo dominante 2ª onda (mm/dia)	1,08 ± 0,33a	0,94 ± 0,19a
*Taxa de crescimento folículo dominante 3ª onda (mm/dia)	-	1,30 ± 0,36
*Taxa de regressão folículo dominante 1ª onda (mm/dia)	0,93 ± 0,17a	1,1 ± 0,37a
*Taxa de regressão folículo dominante 2ª onda (mm/dia)	-	1,04 ± 0,60
*Diâmetro do folículo ovulatório (mm)	14,68 ± 2,23a	13,26 ± 1,74a
*Volume do corpo lúteo no sétimo dia após a ovulação (cm³)	5,50 ± 2,27a	3,80 ± 0,63a

Dados expressos em médias ± desvio padrão.

Letras minúsculas diferentes dentro da mesma linha representam diferenças entre as variáveis ( $P < 0,05$ ).

\*Teste de Mann-Whitney.

As novilhas de duas ondas foliculares no presente estudo tiveram intervalo de ovulação semelhante ( $P > 0,05$ ) aos animais de três ondas (21,66±1,36, e 22,40±3,36 respectivamente).

Diferente disso Borges (2001), observou que ciclos estrais de duas ondas foram significativamente menores que três ondas, ao avaliar comparativamente animais das raças Gir e Nelore (Gir =  $18,6 \pm 0,8$  e  $20,6 \pm 1,3$  dias; Nelore =  $18,7 \pm 0,8$  e  $20,7 \pm 1,0$  dias, para duas e três ondas respectivamente). Esse dado corrobora com o observado por Fortune (1993), onde a mesma observou intervalos de  $19,7 \pm 0,5$  dias para animais de duas ondas e  $21,5 \pm 0,3$  dias para animais de três ondas ( $P < 0,05$ ). Tal diferença pode estar relacionada à raça estudada, por se tratar de raça mestiça (taurina x zebu), já que nos outros estudos os autores utilizaram raças puras, seja taurina ou zebuína.

De acordo com as características avaliadas, somente o diâmetro do folículo dominante na segunda onda apresentou diferença significativa entre os animais de duas ( $14,68 \pm 2,23$  mm) e três ondas ( $11,22 \pm 1,21$  mm) foliculares. Tal achado pode estar relacionado ao fato dos animais de duas ondas foliculares apresentarem na primeira onda a formação do corpo lúteo, enquanto a última onda coincide com a redução da função do corpo lúteo, que está em regressão nessa fase (Sávio *et al.*, 1992). Com isso tem-se a retirada do efeito negativo da progesterona sobre o crescimento folicular, permitindo o crescimento dos folículos dominantes até a ovulação (Sávio *et al.*, 1992). Além disso, em animais de três ondas foliculares o folículo dominante da segunda onda sempre será menor que aqueles encontrados na primeira e terceira onda, devido à alta concentração plasmática de progesterona. A segunda onda ocorre na presença de um corpo lúteo totalmente formado, que secreta elevada concentração de progesterona, que inibe a liberação do hormônio LH, um dos hormônios responsáveis pela ovulação (Sávio *et al.*, 1992). A primeira (corpo lúteo em formação) e a terceira onda folicular (corpo lúteo em regressão) coincidem com baixas concentrações de progesterona (Adams *et al.*, 1992).

Mediante a análise dos diâmetros dos folículos ovulatórios de animais Girolando realizada no presente estudo verificou-se semelhança com os resultados encontrados por Borges (2001) em animais Nelore e Gir, nos quais animais de duas ondas tiveram diâmetros de  $15,0 \pm 1,4$  mm, e os de três ondas diâmetros de  $13,2 \pm 2,1$  mm, e do presente estudo os animais apresentaram  $14,95 \pm 2,38$  mm para duas ondas, e  $14,14 \pm 1,24$  mm para animais de três ondas. Tal estudo demonstra semelhanças em relação aos diâmetros dos folículos ovulatórios entre raças zebuínas e mestiças (taurina x zebu). Entretanto Figueiredo *et al.*, (1997) em estudo com animais da raça Nelore encontrou diferença nos valores de folículos ovulatórios para animais de duas ( $15,90 \pm 0,45$  mm) e três ondas foliculares ( $17,69 \pm 0,40$  mm).

Assim como o diâmetro dos folículos ovulatórios, os volumes dos corpos lúteos não diferiram entre os animais de duas e três ondas foliculares ( $P > 0,05$ ), supostamente devido aos

valores dos diâmetros ovulatórios também não diferirem, pois o diâmetro do corpo lúteo está diretamente relacionado ao diâmetro folicular (Mesquita *et al.*, 2014).

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados referentes ao diâmetro do folículo pré-ovulatório e ao volume do corpo lúteo, comparando o estro natural (Tratamento 1) ou induzido por protocolos de IATF (Tratamento 2 e 3).

Tabela 2: Características foliculares e luteais de novilhas Girolando de acordo com o estro natural ou induzido por dois diferentes protocolos de IATF.

VARIÁVEIS AVALIADAS	ESTRO NATURAL	TRATAMENTO 1	TARTAMENTO 2
* Diâmetro do folículo pré-ovulatório (mm)	13,8 ± 1,73a	13,67 ± 3,65a	13,47 ± 2,35a
* Volume do corpo lúteo sete dias após a ovulação (cm <sup>3</sup> )	4,74 ± 1,88a	3,97 ± 1,81a	3,96 ± 1,89a

Dados foram expressos em médias ± desvio padrão.

Tratamento 1- Estro natural, Tratamento 2 - BE + implante intravaginal de progesterona (P4) no D0, PGF<sub>2α</sub> no D7, retirada do implante de P4 + CE no D9, IA no D11, Tratamento 3 – GnRH + implante intravaginal de P4 no D0, PGF<sub>2α</sub>, e retirada do implante de P4 no D5, PGF<sub>2α</sub> no D6, IA e aplicação de GnRH no D8.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças entre as variáveis (P<0,05).

\*Teste T/Anova.

Não houve diferença (P>0,05) entre as características de diâmetro do folículo pré-ovulatório e VCL sete dias após a ovulação, independente se para o ciclo estral natural ou após indução hormonal com diferentes protocolos. Borges (2001) analisou a dinâmica do estro natural de fêmeas das raças Gir e Nelore e obteve diâmetros de folículos ovulatórios de 12,8 a 15 mm respectivamente, semelhante ao achado no presente estudo, para o estro natural (13,8 ± 1,73 mm) e para protocolos de IATF (Tratamento 1: 13,67 ± 3,65; e Tratamento 2: 13,47 ± 2,35 mm). No entanto, a literatura demonstra que, em animais de raças europeias, os diâmetros dos folículos ovulatórios são aproximadamente de 15 a 20 mm (Sávio *et al.*, 1988). Desse modo, esse menor valor encontrado comparado aos valores achados por Sávio *et al.*, (1988) pode estar relacionado à raça estudada, pois o presente estudo foi desenvolvido em animais mestiços Girolando 3/4 e 7/8, e sabe-se que animais provenientes de raças taurinas possuem maior taxa de crescimento folicular (Murphy *et al.*, 1990) quando comparados a raças zebuínas (Figueiredo *et al.*, 1997). Contudo, os resultados sugerem que não existem diferenças entre os diâmetros dos folículos ovulatórios de estros naturais ou induzidos com hormônios visando IATF quando analisado entre animais da mesma raça.

Os animais do Estro natural obtiveram VCL (4,74 ± 1,88 cm<sup>3</sup>) semelhantes (P>0,05) aos animais dos Tratamentos 1 (3,97 ± 1,81) e 2 (3,96 ± 1,89). Esses achados corroboram com o estudo de Borges (2001) em que foram encontrados volumes de aproximadamente 4,0 cm<sup>3</sup> para animais das raças Gir e Nelore na ovulação do estro natural. A literatura relata que corpos lúteos

de animais de raças taurinas são maiores quando comparadas a raças zebuínas, provavelmente pelo fato de possuírem maior diâmetro de folículo ovulatório (Rhodes *et al.*, 1982). Este dado sugere que os volumes dos corpos lúteos não diferem entre animais da mesma raça submetidos ou não a protocolos de IATF.

#### 4.2 – DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA DE NOVILHAS SUBMETIDAS A DIFERENTES PROTOCOLOS DE IATF

Os resultados das avaliações da dinâmica folicular ovariana entre os dois protocolos de IATF estudados no presente trabalho estão apresentados na Tabela 3, tendo como características analisadas: diâmetro do folículo no D0, diâmetro do folículo pré-ovulatório, diâmetro do folículo no D2, diâmetro do folículo no dia da inseminação artificial, volume do corpo lúteo sete dias após a ovulação e período (horas) da retirada do implante de progesterona até a ovulação.

Tabela 3: Características foliculares e luteais de novilhas da raça Girolando submetidas a dois diferentes protocolos de IATF.

VARIÁVEIS AVALIADAS	TRATAMENTO 1	TRATAMENTO 2
+ Diâmetro do folículo pré-ovulatório (mm)	13,67 ± 3,65a	13,47 ± 2,35a
* Diâmetro do folículo no D0 (mm)	12,01 ± 3,17a	12,79 ± 3,33a
* Diâmetro do folículo no D2 (mm)	11,29 ± 3,23a	8,29 ± 3,58b
* Diâmetro do folículo no dia da inseminação artificial (mm)	11,25 ± 3,88a	12,82 ± 3,13b
+ Volume do corpo lúteo sete dias após a ovulação (cm <sup>3</sup> )	3,97 ± 1,81a	3,96 ± 1,89a
* Intervalo da retirada do implante até a ovulação (horas)	70,67 ± 15,33a	105,60 ± 16,24b

Dados foram expressos em médias ± desvio padrão.

Tratamento 1- BE + implante intravaginal de progesterona (P4) no D0, PGF<sub>2α</sub> no D7, retirada do implante de P4 + CE no D9, IA no D11, Tratamento 2 – GnRH + implante intravaginal de P4 no D0, PGF<sub>2α</sub>, e retirada do implante de P4 no D5, PGF<sub>2α</sub> no D6, IA e aplicação de GnRH no D8.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças entre as variáveis (P<0,05).

\*-P<0,0001

\*Mann-Whitney.

+Teste T/Anova.

Os diâmetros foliculares no D0 (início do protocolo) não apresentaram diferenças (P>0,05) entre os Tratamentos 1 e 2, preservando a homogeneidade dos animais trabalhados, para início dos tratamentos.

Foram verificadas diferenças (P<0,05) nos diâmetros foliculares (P<0,05) no D2 entre os animais dos dois tratamentos. Essa diferença provavelmente decorre da ação do fármaco utilizado no início do protocolo, especialmente porque no Tratamento 1 foi utilizado benzoato de estradiol, juntamente com o implante de progesterona. Essa associação leva à regressão dos folículos, seguido por novo recrutamento de onda folicular (Martinez *et al.*, 2003). De acordo

com Burke *et al.* (2003), esse processo de atresia do folículo ocorre em torno de 36 horas após a aplicação do benzoato de estradiol e o efeito de tal fármaco independe da fase em que se encontra o ciclo estral do animal, ou da onda de crescimento do folículo (Bó *et al.*, 1995).

No Tratamento 2 foi utilizado inicialmente o hormônio GnRH juntamente com o implante de progesterona, no intuito de proporcionar a ovulação do folículo dominante presente (Thatcher *et al.*, 1993), acarretando o surgimento de nova onda folicular em aproximadamente dois dias (Twagiramungu *et al.*, 1995). Santos *et al.* (2010), em estudo feito com vacas em lactação, obtiveram 63% de ovulações dos folículos na primeira administração do GnRH, utilizando protocolo idêntico ao Tratamento 2 adotado no presente estudo. Ademais, de acordo com Rutigliano *et al.* (2008), programas de IATF que utilizam GnRH para sincronizar a emergência da nova onda e, conseqüentemente, a ovulação, possuem melhor resposta ao final do protocolo, pelo aumento da fertilidade avaliada pela maior taxa de gestação. Porém, a eficiência do tratamento com GnRH vai depender do dia em que foi realizada a aplicação no ciclo estral (Martinez *et al.*, 1999). Existem diferentes respostas ovulatórias para a primeira dose do GnRH nas diferentes fases do ciclo estral, sendo mais elevada entre os dias cinco e nove do ciclo estral, e mais baixa no início e final do mesmo (Azevedo *et al.*, 2014). Caso não ocorra a ovulação, o recrutamento da nova onda acontecerá espontaneamente, porém com menor índice de ovulação em tempo pré-determinado.

O diâmetro do folículo pré-ovulatório não diferiu ( $P>0,05$ ) entre os animais dos dois tratamentos. De forma similar, Bridges *et al.*, (2010) observaram que mesmo tratando animais com diferentes intervalos de proestro, os mesmos não apresentavam diferença significativa entre os tamanhos dos folículos ovulatórios ( $13,0 \pm 0,2$ , e  $12,6 \pm 0,2$  mm). De acordo com o autor, o que difere são as concentrações de estrógeno, pois, mesmo não havendo diâmetros diferentes, animais que possuem proestro mais curto apresentam maiores concentrações deste hormônio. Animais com concentrações plasmáticas mais altas de estrógeno tiveram maiores quantidades de receptores de progesterona no epitélio glandular profundo, conseqüentemente apresentando maiores concentrações de progesterona que auxilia na manutenção da gestação e no desenvolvimento do embrião (Bridges *et al.*, 2012).

Além disso quando se comparam dois protocolos que apresentam intervalos diferentes de proestro, aquele que possui intervalo maior, apresenta a melhor maturidade folicular, propiciando melhor desenvolvimento do embrião (Bridges *et al.*, 2010). Também, Mussard *et al.* (2007) observaram que a fertilidade resultante da ovulação induzida por GnRH de folículos imaturos é reduzida, quando comparados às vacas com ovulações espontâneas. Além disso, Ribeiro *et al.* (2012) estudaram diferentes intervalos de proestro em vacas leiteiras lactantes e tais intervalos possuíam diferença de 24 horas entre eles. Aqueles animais que apresentaram

proestro mais longo tiveram concepção de 54,9%, quando comparado com 46,5% do outro grupo experimental testado, sustentando assim que a relação de tempo de proestro e dominância de folículo apresenta efeitos práticos importantes. Folículos submetidos a longo período de dominância estão diretamente relacionados à redução na qualidade do oócito e, conseqüentemente, do embrião (Revah e Butler, 1996).

Em relação ao diâmetro folicular no dia da inseminação artificial, verificou-se que os animais do Tratamento 1 apresentaram menores valores ( $P < 0,05$ ) quando comparados aos animais do Tratamento 2. Tal fato pode ser explicado pelo protocolo do Tratamento 1 apresentar intervalo maior de utilização do dispositivo de progesterona (nove dias), quando comparado ao protocolo do Tratamento 2, em que utilizou-se o dispositivo por cinco dias. Com altas concentrações de progesterona tem-se menor taxa de crescimento do folículo dominante, acarretando em menores pulsos de LH, que é modulado por sua vez pelo GnRH (Karsh *et al.*, 1997). Essas frequências nos pulsos de GnRH, e conseqüentemente LH, são inversamente proporcionais às concentrações de progesterona, ou seja, quanto maior a concentração de progesterona menor é a taxa de crescimento do folículo (Adams *et al.*, 1992). Posteriormente à retirada do implante de progesterona, e com a queda da concentração de tal hormônio, ocorre o aumento na frequência de pulsos do LH o que, por sua vez, estimula o crescimento do folículo dominante até a ovulação (Binelli *et al.*, 2006).

Quando se compara o diâmetro dos folículos pré-ovulatórios de cada protocolo utilizado neste estudo com os dados da literatura, verificam-se semelhanças do tratamento 1 com os achados na qual Pereira *et al.* (2014) observaram média de diâmetro folicular na ovulação de  $14,8 \pm 0,33$  mm para vacas Holandesas em lactação sincronizadas com protocolo semelhante ao do Tratamento 1, já o estudo de Abreu *et al.* (2014) obteve médias de diâmetro de  $11,0 \pm 0,18$  mm para novilhas de corte de raças taurinas utilizando protocolo semelhante ao Tratamento 2.

Quanto ao volume do corpo lúteo sete dias após a ovulação, os animais do Tratamento 1 obtiveram valores semelhantes ao Tratamento 2 ( $P > 0,05$ ). Os valores referentes ao VCL estão diretamente relacionados com os valores obtidos para tamanho dos folículos ovulatórios, uma vez que tais valores são diretamente proporcionais (Sartori *et al.*, 2002).

Na análise do intervalo do momento da retirada do implante de progesterona e a ovulação, o Tratamento 1 obteve aproximadamente 35 horas a menos ( $P > 0,0001$ ) quando comparado ao Tratamento 2. Na Figura 5 são apresentadas as porcentagens médias do intervalo da retirada e a ovulação de cada tratamento, e na Figura 6 é apresentada a dispersão de ovulação das novilhas estudadas.

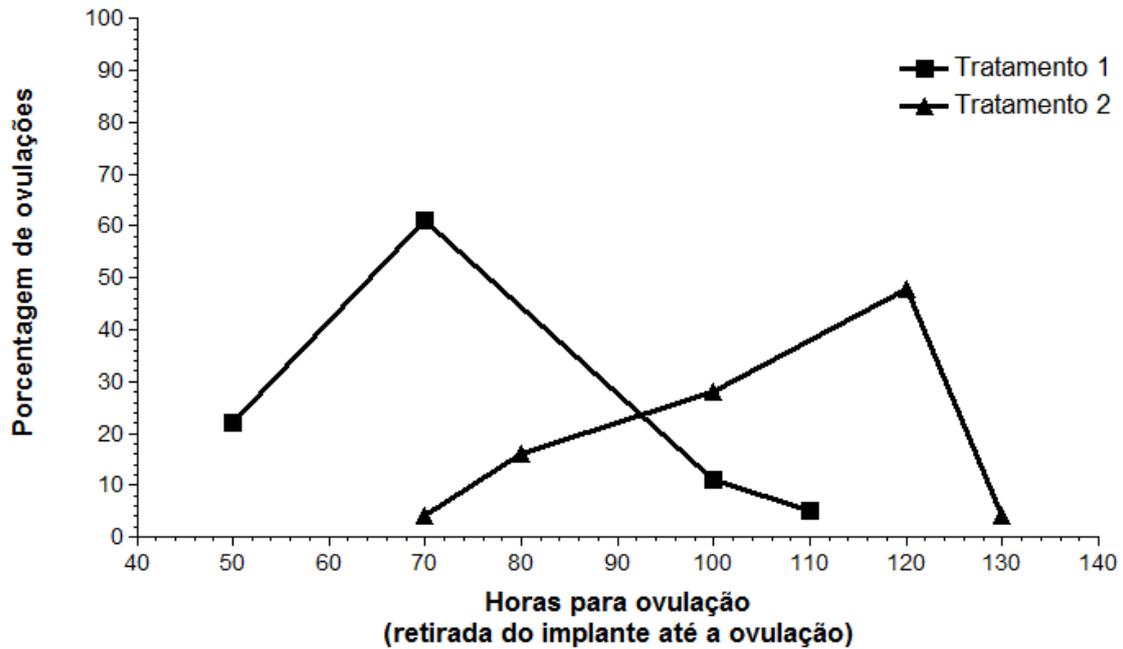


Figura 5: Porcentagem de ovulação pelo número de horas entre a retirada do implante de P4 até a ovulação de novilhas Girolando submetidas a dois protocolos de IATF: Tratamento 1- BE + implante intravaginal de progesterona (P4) no D0, PGF<sub>2α</sub> no D7, retirada do implante de P4 + CE no D9, IA no D11, Tratamento 2 – GnRH + implante intravaginal de P4 no D0, PGF<sub>2α</sub>, e retirada do implante de P4 no D5, PGF<sub>2α</sub> no D6, IA e aplicação de GnRH no D8.

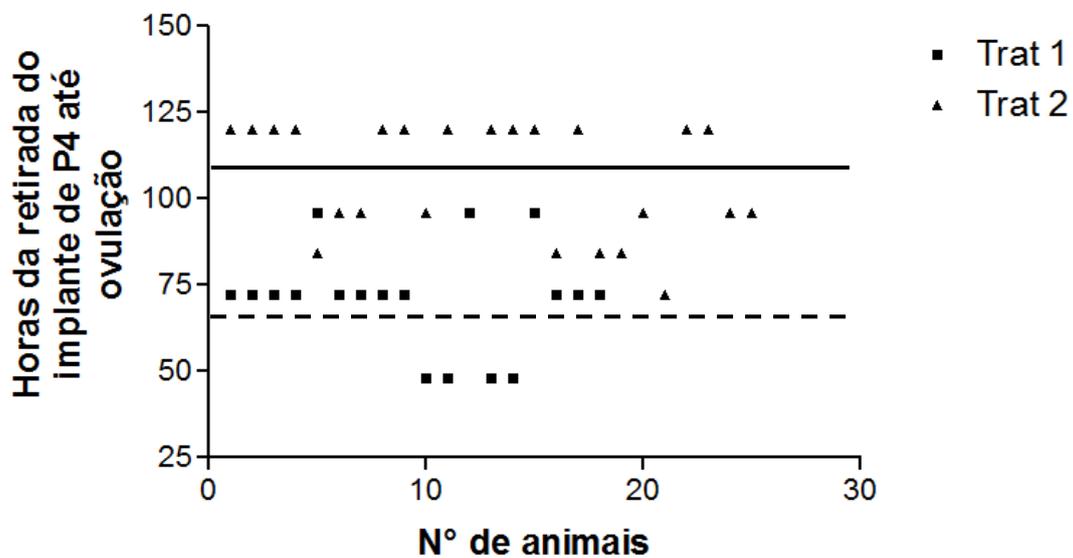


Figura 6: Dispersão de ovulações de novilhas Girolando submetidas a dois protocolos de IATF: Tratamento 1- BE + implante intravaginal de progesterona (P4) no D0, PGF<sub>2α</sub> no D7, retirada do implante de P4 + CE no D9, IA no D11, Tratamento 2 – GnRH + implante intravaginal de P4 no D0, PGF<sub>2α</sub>, e retirada do implante de P4 no D5, PGF<sub>2α</sub> no D6, IA e aplicação de GnRH no D8. --- = média do Tratamento 1, — = média do Tratamento 2.

Observou-se que 61% dos animais do Tratamento 1 ovularam, em média, 71±15,33 horas após a retirada do implante, enquanto no Tratamento 2, 48% ovularam no intervalo médio de 106±16,24 horas. Tal resultado do tratamento 1 é semelhante ao intervalo da retirada do

implante à ovulação de vacas Nelore encontrada no estudo de Crepaldi *et al.* (2009) que utilizaram o cipionato de estradiol como agente indutor de ovulação, onde o autor obteve intervalo de  $72,0 \pm 2,0$  horas. Desse modo, os resultados corroboram com Martins *et al.* (2005), ao verificarem que o cipionato de estradiol promoveu sincronização da ovulação aproximadamente 70 horas após a retirada do implante de progesterona.

No entanto, quando se compara o intervalo da retirada do implante e a ovulação daqueles animais que foram tratados com GnRH como indutor da ovulação (Tratamento 2), foi encontrado intervalo maior para o Tratamento 1, possivelmente devido ao tempo de ação de tal fármaco, que deverá proporcionar pico de LH cerca de 28 horas após sua aplicação (Pursley *et al.*, 1995). De acordo com Portaluppi e Stevenson (2005), esse intervalo não compromete as taxas de gestação dos animais, mas sim, otimiza a maturação do folículo dominante pré-ovulatório.

A Figura 7 apresenta o intervalo médio de horas da inseminação até a ovulação dos animais em cada grupo experimental.

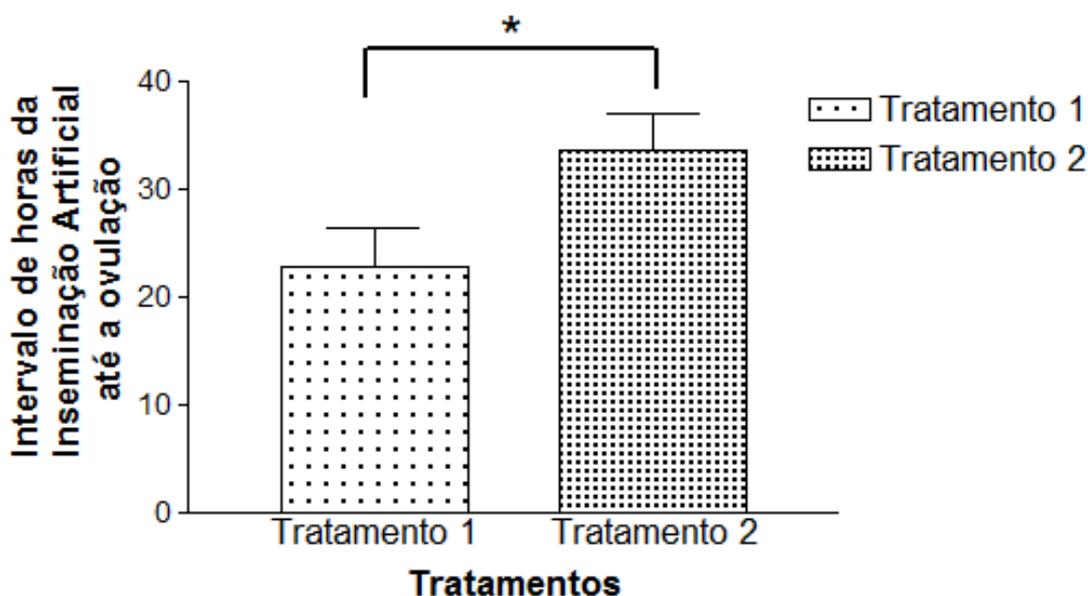


Figura 7: Intervalo da inseminação artificial em tempo fixo até a ovulação de novilhas Girolando submetidas a dois protocolos de IATF: Tratamento 1- BE + implante intravaginal de progesterona (P4) no D0, PGF<sub>2α</sub> no D7, retirada do implante de P4 + CE no D9, IA no D11, Tratamento 2 – GnRH + implante intravaginal de P4 no D0, PGF<sub>2α</sub>, e retirada do implante de P4 no D5, PGF<sub>2α</sub> no D6, IA e aplicação de GnRH no D8.

Os dados demonstram diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre o intervalo da inseminação até a ovulação, pois no tratamento 2 o espermatozóide permanece por aproximadamente 33 horas dentro do trato reprodutivo da fêmea para a fecundação, enquanto no Tratamento 1 permanece

em média 22 horas (Figura 7). Senger (2003) apresenta que a capacidade fecundante dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea bovina é, em média, de 36 horas. Portanto quando levamos em consideração o tempo de viabilidade do espermatozoide pode haver, de certa forma, comprometimento da fertilização do ovócito.

As taxas de manifestação do estro estão apresentadas na Tabela 4 e na Figura 8, onde os resultados foram maiores para os animais do Tratamento 1 ( $P < 0,05$ ), quando comparados aos animais do Tratamento 2.

Tabela 4: Taxas (%) de manifestação de estro e de ovulação de novilhas Girolando submetidas a dois diferentes protocolos de IATF.

VARIÁVEIS AVALIADAS	TRATAMENTO 1	TRATAMENTO 2
*Taxa de manifestação de estro (%)	90(54/60)a	48,3(27/60)b
*Taxa de ovulação (%)	65(39/60)a	83,3(50/60)b

Dados foram expressos em médias  $\pm$  desvio padrão.

Tratamento 1- BE + implante intravaginal de progesterona (P4) no D0, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  no D7, retirada do implante de P4 + CE no D9, IA no D11, Tratamento 2 – GnRH + implante intravaginal de P4 no D0, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , e retirada do implante de P4 no D5, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  no D6, IA e aplicação de GnRH no D8.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças entre as variáveis ( $P < 0,05$ ).

\*Teste Qui-quadrado.

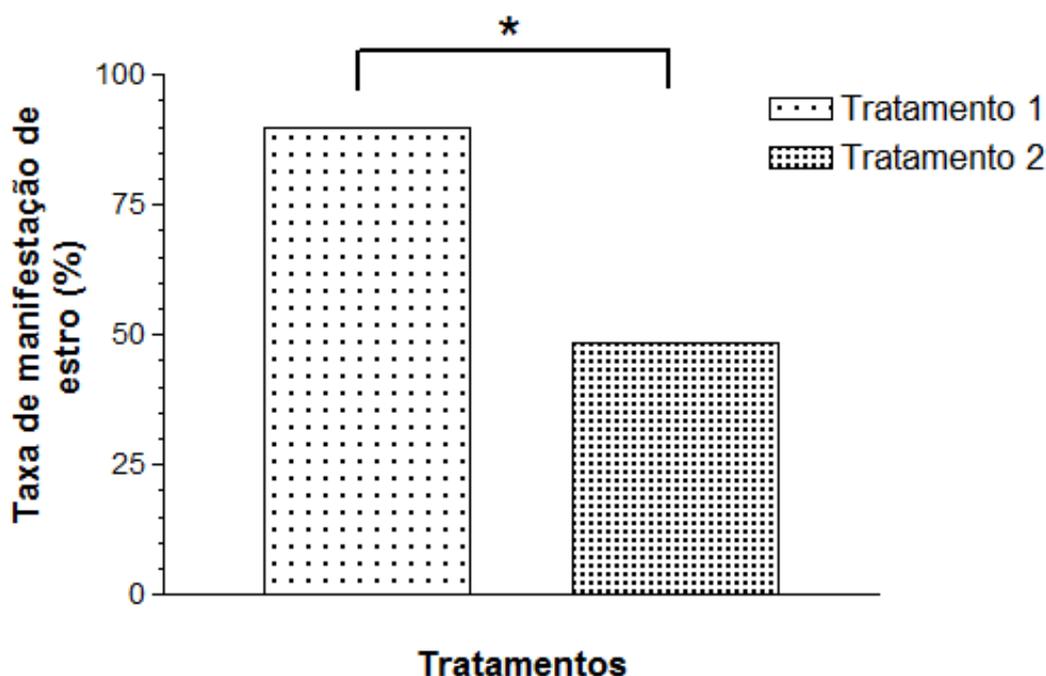


Figura 8: Taxa de manifestação do estro em novilhas Girolando submetidas a dois protocolos de IATF: Tratamento 1- BE + implante intravaginal de progesterona (P4) no D0, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  no D7, retirada do implante de P4 + CE no D9, IA no D11, Tratamento 2 – GnRH + implante intravaginal de P4 no D0, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , e retirada do implante de P4 no D5, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  no D6, IA e aplicação de GnRH no D8.

Os dados apresentados acima diferem do reportado no estudo de Lima *et al.* (2011), em que a taxa de manifestação de estro obtida foi de 61,4% para novilhas Holandesas sincronizadas com protocolos de cinco dias como o utilizado no presente estudo (Tratamento 2). Os dados do presente estudo contraria Lima *et al.* (2013) onde encontraram taxas de 76,9% para novilhas das raças Holandesa e Jersey com o mesmo protocolo. Já no estudo de Ribeiro *et al.* (2012) foi encontrada taxa de 32,3% de manifestação de estro para vacas Holandesas lactantes submetidas ao mesmo protocolo, se aproximando mais dos dados encontrados no presente trabalho. A utilização de ésteres de estradiol em protocolos com indução de ovulação demonstra maior expressão de estros, exemplificado pelo estudo de Martinez *et al.* (2002) com novilhas de corte, que obtiveram 81% de manifestação.

A taxa de ovulação dos animais do Tratamento 1 (65%) foram inferiores ( $P < 0,05$ ) àquelas encontradas no Tratamento 2 (83,3%) (Tabela 4, Figura 9), mesmo obtendo maior resposta na manifestação do estro (Tratamento 1: 90%, e Tratamento 2: 48,3%).

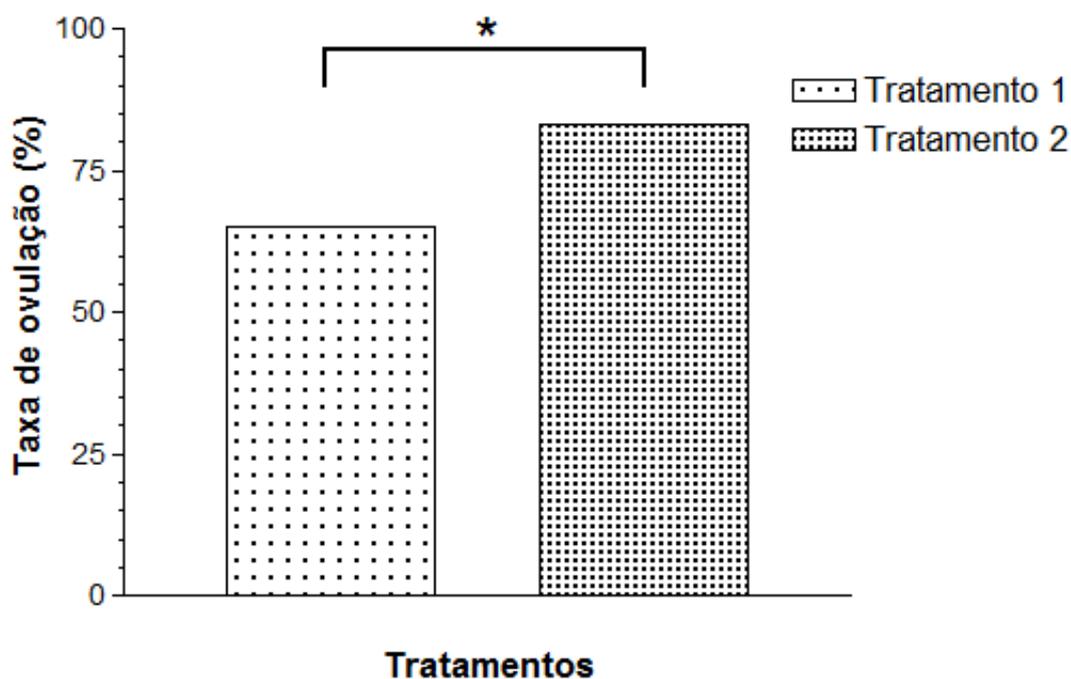


Figura 9: Taxa de ovulação de novilhas Girolando submetidas a dois protocolos de IATF: Tratamento 1- BE + implante intravaginal de progesterona (P4) no D0,  $PGF_{2\alpha}$  no D7, retirada do implante de P4 + CE no D9, IA no D11, Tratamento 2 – GnRH + implante intravaginal de P4 no D0,  $PGF_{2\alpha}$ , e retirada do implante de P4 no D5,  $PGF_{2\alpha}$  no D6, IA e aplicação de GnRH no D8.

As taxas de ovulação foram significativamente menores ( $P > 0,05$ ) para o Tratamento 1, quando comparadas ao Tratamento 2. Crepaldi (2009), usando protocolo a base de cipionato de

estradiol como indutor de ovulação, obteve 90% de resposta positiva, diferente do encontrado no presente estudo. Já Pegorer (2009) apresentou resultado de 73% de ovulação utilizando benzoato de estradiol em novilhas Nelore. Poncio (2012) obteve taxas semelhantes às do presente estudo, observando 65,7% de ovulações em novilhas.

Quando utilizaram o GnRH como indutor de ovulação, Martinez *et al.* (2002) obtiveram valores de 48% de taxa de ovulação. Cerri *et al.* (2009) obtiveram taxa média de 86,7% em vacas Holandesas submetidas a protocolos adotando o GnRH como indutor, porém, nesse estudo, os autores fizeram pré-sincronização dos animais. Já Abreu *et al.* (2014), em estudo com novilhas taurinas das raças Hereford e Angus, encontraram taxa de ovulação média de 64%. No entanto, esses achados da literatura sugerem que animais que receberam ésteres de estradiol como agente indutor de ovulação podem apresentar maiores taxas de manifestação de estro, porém, não necessariamente apresentarão maiores taxas de ovulação conforme visto no presente estudo.

#### 4.3 – QUALIDADE DE EMBRIÕES DE NOVILHAS SUBMETIDAS A DIFERENTES PROTOCOLOS DE IATF

Por meio dos lavados uterinos obteve-se 25 embriões, sendo que destes 11 foram do Tratamento 1 e 14 do Tratamento 2. A Tabela 5 sintetiza o resultado descritivo da taxa de recuperação embrionária, além das estruturas encontradas nos lavados - classificadas de acordo com a *International Embryo Technology Society* (IETS, 1999).

Tabela 5: Taxa de recuperação e classificação morfológica de embriões (IETS, 1999) coletados de novilhas Girolando submetidas a dois protocolos de IATF.

VARIÁVEIS AVALIADAS	TRATAMENTO 1	TRATAMENTO 2
<b>*Recuperação embrionária (%)</b>	30 (11/37) <sup>a</sup>	33 (14/42) <sup>a</sup>
<b>Embriões com duas células (%)</b>	9 (1/11)	-
<b>Mórulas (%)</b>	28 (3/11)	43 (6/14)
<b>Blastocistos Iniciais (%)</b>	18 (2/11)	7 (1/14)
<b>Blastocistos (%)</b>	18 (2/11)	-
<b>Blastocistos Expandidos (%)</b>	18 (2/11)	29 (4/14)
<b>Embriões Degenerados (%)</b>	9 (1/11)	21 (3/14)

Tratamento 1- BE + implante intravaginal de progesterona (P4) no D0, PGF<sub>2α</sub> no D7, retirada do implante de P4 + CE no D9, IA no D11, Tratamento 2 – GnRH + implante intravaginal de P4 no D0, PGF<sub>2α</sub>, e retirada do implante de P4 no D5, PGF<sub>2α</sub> no D6, IA e aplicação de GnRH no D8.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças entre as variáveis (P<0,05).

\*Teste Qui-quadrado.

Em relação à taxa de recuperação embrionária, os dois tratamentos tiveram, em conjunto, 32% de embriões coletados, diferentemente da publicação de Cerri *et al.* (2009) que apresentou taxa de recuperação de 53,7% em estudo com vacas da raça Holandesa, onde foram analisados

396 primíparas e múltiparas. Já Sartori *et al.* (2002) encontraram taxa de recuperação de 40,5% em novilhas de raça Holandesa. Tal taxa se aproxima mais do resultado encontrado no presente estudo. Entretanto, vale a pena ressaltar que nos dois estudos citados acima os animais utilizados foram de raças taurina e, possivelmente, geneticamente superior, obtendo supostamente maior tempo de seleção para fertilidade, já o presente estudo foi feito com animais cruzados. Quando se comparam as taxas de recuperação entre os tratamentos, não foram encontradas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

No presente estudo também foram realizadas avaliações dos diâmetros ( $\mu$ ), volumes ( $\text{mm}^3$ ) e qualidade embrionária (taxa de células apoptóticas) entre os dois protocolos de IATF (Tabela 6 e Figuras 10 e 11).

Tabela 6: Parâmetros de qualidade e tamanho de embriões de novilhas Girolando submetidas a dois protocolos de IATF.

VARIÁVEIS AVALIADAS	TRATAMENTO 1	TRATAMENTO 2
^Diâmetro recém-coleta ( $\mu\text{m}$ )	$0,18 \pm 0,25\text{a}$	$0,11 \pm 0,035\text{a}$
^Volume pós-fixação ( $\text{mm}^3$ )	$0,002 \pm 0,0005\text{a}$	$0,002 \pm 0,0007\text{a}$
^Número de células totais	$54,00 \pm 13,91\text{a}$	$65,33 \pm 27,11\text{a}$
*Número de células apoptóticas	$9,47 \pm 7,03\text{a}$	$13,39 \pm 5,55\text{a}$

Dados foram expressos em médias  $\pm$  desvio padrão.

Tratamento 1 - BE + implante intravaginal de progesterona (P4) no D0,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  no D7, retirada do implante de P4 + CE no D9, IA no D11, Tratamento 2 - GnRH+implante intravaginal P4 no D0,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , e retirada do implante de P4 no D5,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  no D6, IA e aplicação de GnRH no D8.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças entre as variáveis ( $P < 0,05$ ).

\*Teste T.

^Teste Mann-Withney

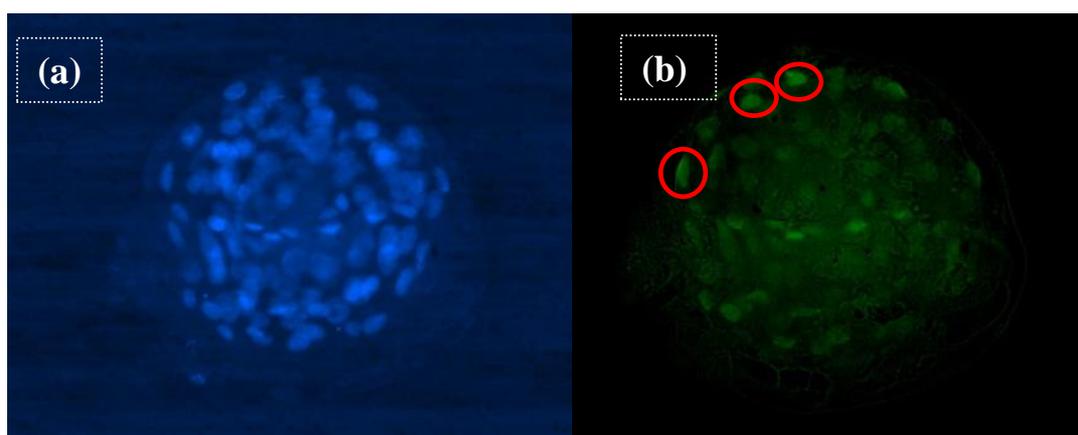


Figura 10: Visualização em microscópio de fluorescência de blastocistos bovinos produzidos através da IATF corados com DAPI e submetidos ao teste TUNEL. IATF= BE + implante intravaginal de progesterona (P4) no D0,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  no D7, retirada do implante de P4 + CE no D9, IA no D11. (a) Contagem dos núcleos celulares marcados com DAPI; (b) Marcação das células apoptóticas (círculos vermelhos). (Aumento de 400x).

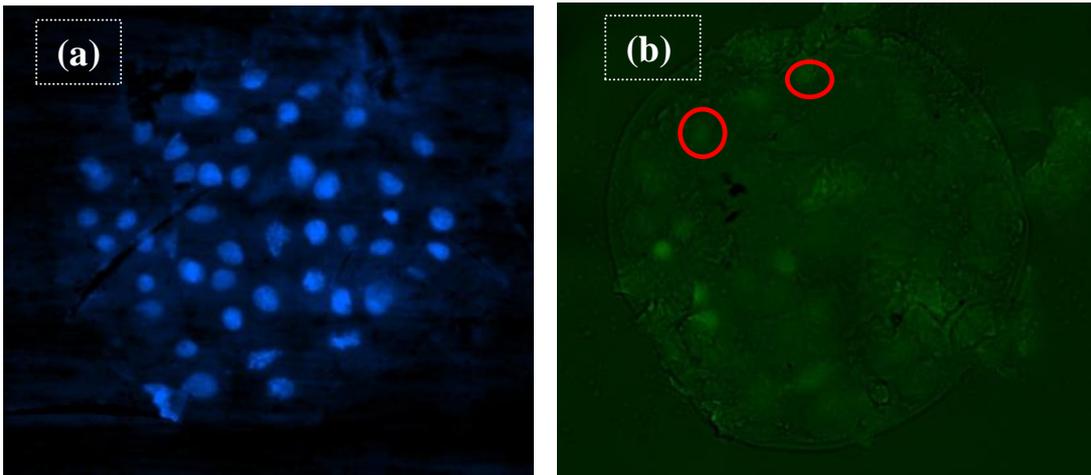


Figura 11: Visualização em microscópio de fluorescência de blastocistos bovinos produzidos através da IATF corados com DAPI e TUNEL. IATF = GnRH + implante intravaginal de progesterona (P4) no D0, PGF<sub>2α</sub>, e retirada do implante de P4 no D5, PGF<sub>2α</sub> no D6, IA e aplicação de GnRH no D8. (a) Contagem dos núcleos celulares marcados com DAPI; (b) Marcação das células apoptóticas (círculos vermelhos) com o TUNEL. (Aumento de 400x).

Ao comparar qualidade e tamanho dos embriões, os mesmos não apresentaram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) em nenhuma das características analisadas: diâmetro dos embriões em estereoscópio ( $\mu$ ) após a coleta, volume dos embriões após a fixação em paraformaldeído ( $\text{mm}^3$ ), número total de células dos embriões e número de células apoptóticas.

Com a intenção de melhorar a qualidade dos folículos, embriões e ambiente uterino, tem-se adotado algumas metodologias nos protocolos, tais como: aumento da duração do proestro, aumento da manifestação do estro e aumento do diâmetro do folículo ovulatório (Binelli, *et al.*, 2016). Diferente do encontrado no presente estudo, Cerri *et al.* (2009) verificaram que os animais submetidos à IATF com maiores períodos de dominância dos folículos ovulatórios, como do Tratamento 1, apresentam redução da qualidade embrionária. Tal resultado foi confirmado por Smith *et al.* (2012), que observaram maior importância para a maturidade do folículo dominante, e não somente ao seu tamanho, que por sua vez está diretamente relacionado ao tempo de dominância. De acordo com esses autores a indução da ovulação de um folículo dominante fisiologicamente imaturo diminui a taxa de gestação e reduz a sobrevivência do embrião.

Além disso, de acordo com Bridges *et al.* (2013), protocolos que apresentam maiores períodos de proestro, como do Tratamento 2, podem proporcionar melhor ambiente uterino para o embrião, devido à maior exposição ao estrógeno no período do proestro e à progesterona no diestro. Essa maior concentração de progesterona está relacionada à estimulação da expressão de alguns genes relacionados à função de sintetizar o histotrofo e proporcionar melhor metabolismo energético (Forde *et al.*, 2009), auxiliando no desenvolvimento do embrião e na

produção do interferon-tau (IFN- $\tau$ ). O IFN- $\tau$  é um interferon do tipo I e sua função é evitar o retorno à ciclicidade da fêmea após a fecundação (Roberts *et al.*, 2008). Isso ocorre por volta dos dias 15 a 17 pós-estro (Binelli *et al.*, 2001), e tem como função proporcionar o reconhecimento materno da gestação, permitindo a manutenção da mesma (O'hara *et al.*, 2014). Mesmo não ocorrendo diferença na qualidade embrionária entre os tratamentos do presente estudo, pode haver alguma relação do Tratamento 2 com o ambiente uterino, pois o mesmo resultou em período de proestro 24 horas maior que o Tratamento 1, e a avaliação realizada no presente estudo foi somente da qualidade do embrião no sétimo dia, podendo haver alguma diferença no momento de implantação, ou até mesmo relacionado à capacidade de sobrevivência do embrião, que não foi avaliada.

Além da concentração de estrógeno e progesterona, recentes estudos confirmam que a manifestação do comportamento estral pode ter efeito direto na fertilidade (Madureira *et al.*, 2015). Porém, mesmo com diferentes taxas de manifestação de estro, os embriões apresentaram similaridade em sua qualidade no parâmetro avaliado para o presente estudo. De acordo com Davoodi *et al.* (2016), vacas que apresentaram manifestação do estro próximo a IA, tiveram melhora significativa no perfil de expressão gênica no endométrio para receptores de progesterona, auxiliando na adesão entre as células do epitélio endometrial e o concepto, além de participar da inibição parcial de mRNA para a síntese de PGF<sub>2 $\alpha$</sub> .

Vale ressaltar que no presente estudo as avaliações foram feitas no sétimo dia de vida do embrião, e os mesmos não apresentaram diferenças significativas nesse momento de avaliação quanto ao número de células, porém, podem haver diferenças além do ambiente uterino, como na expressão de genes embrionários e perfil endócrino. Dessa forma tem-se a necessidade de estudos complementares na área de embriologia relacionada a protocolos de IATF. A maioria dos estudos é proveniente de animais taurinos, principalmente da raça Holandesa, Angus ou Hereford, e sabe-se que há particularidades na fisiologia reprodutiva destes animais quando comparados aos cruzamentos Taurino x Zebu, como é o caso do presente estudo.

## 5. CONCLUSÕES

Protocolos hormonais que prolongam a duração do proestro aumentou o diâmetro folicular no dia da inseminação artificial de novilhas Girolando;

GnRH aplicado no momento da inseminação artificial aumenta a taxa ovulatória em protocolos de IATF;

Tratamento com cipionato de estradiol ao final do protocolo hormonal induz alta taxa de estros, porém sem correspondência na taxa ovulatória;

O aumento na duração do proestro implicou em ampliação no intervalo da retirada do implante de progesterona ao estro e à ovulação, que pode dificultar a programação de inseminações em tempo fixo;

Protocolos hormonais com diferentes durações de proestro de novilhas Girolando não modificaram a qualidade dos embriões;

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, F. M.; CRUPPE, L. H.; MAQUIVAR, M. Effect of follicle age on conception rate in beef heifers. *J. Anim. Sci.*, v. 92, p.1022–1028, 2014.
- ABCG – Associação Brasileira dos Criadores de Girolando. Disponível em: <http://www.girolando.com.br/index.php?paginasSite/girolando,3,pt>. Acesso em 05/08/2016.
- ADAMS, G. P.; JAISWAL, R.; SINGH J. et al. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, v.69, p.72-80, 2008.
- ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; GINTHER, O.J. The effect of progesterone on growth of ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating FSH in heifers. *J. Reprod. Fertil.*, v.95, p.627-640, 1992.
- AMARAL, T. F. *Influência do diâmetro do folículo dominante sobre as taxas de ovulação e gestação de vacas da raça Gir em anestro pós-parto e submetidas a protocolo hormonal com progesterona associada a estradiol*. 2009. 60f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) -Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
- AZEVEDO, C.; CANADA, N.; SIMÕES. O protocolo hormonal *Ovsynch* e suas modificações em vacas leiteiras de alta produção: uma revisão. *Arch. Zootec.*, v. 63, p.173-187, 2014.
- BARROS, C.M.; FIGUEIREDO, R.A.; PINHEIRO, O.L. Estro, ovulação e dinâmica folicular em zebuínos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.19, p.9-22, 1995.
- BAO, B; GARVERICK, H. A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J. Anim. Sci.* v. 76, p. 1903-1921, 1998.
- BARTOLOME, J.A.; SILVESTRE, F.T.; KAMIMURA, S. et al. Resynchronization of ovulation and timed insemination in lactating dairy cows I: use of the Ovsynch and heatsynch protocols after non-pregnancy diagnosis by ultrasonography. *Theriogenology*, v. 63, p. 1617–1627, 2005.
- BARUSELLI, P.S.; COLLI, M. H. A.; REZENDE, R. G. et al. Situação atual, desafios e perspectivas da reprodução programada em bovinos de corte e de leite. In: 7º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA. 2016. Londrina.
- BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S. et al. Reproductive physiology of *Bos taurus* and *Bos indicus* females. *Rev. Bras. Reprod. Anim*, v.31, p.205-211, 2007.
- BARUSELLI, P. S.; SALES, J. N. S.; SALA, R. V.; VIEIRA, L. M.; SÁ FILHO, M. F. Evolução e perspectivas dos programas de inseminação artificial em tempo fixo no Brasil. *Anim. Reprod.*, v. 9, p. 30-43, 2012.
- BAZER, F. W.; SLAYDEN, O. D. Progesterone-induced gene expression in uterine epithelia: a myth perpetuated by conventional wisdom. *Biol. Reprod.* v.79, p. 1008-1009, 2008.
- BINELLI, M.; IBIAPINA, B.T.; BISINOTTO R.S. Bases fisiológicas, farmacológicas e endócrinas dos tratamentos de sincronização do crescimento folicular e da ovulação. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34, p. 1-7, 2006.
- BINELLI, M.; PUGLIESI, G.; EMILIANA, O. S. et al. Tecnologias para melhorar o ambiente uterino, o desenvolvimento embrionário e a taxa de prenhez em bovinos. In: 7º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA. 2016. Londrina.

- BINELLI, M.; PUGLIESI, G.; HOECK, V. V. et al. The role of proestrus on fertility and postovulatory uterine function in the cow. *Anim. Reprod.* v. 11, p. 246–253, 2014.
- BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P. S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology.* v. 56, p. 1451–1463, 2001.
- BINELLI, M.; SARTORI, R.; VASCONCELOS, J. L. M. et al. Evolution in fixed-time: from synchronization of ovulation to improved fertility. Researchgate. Outubro de 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/268506071>. Acesso em 15/08/2016.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A; MAPLETOF, R.J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology.* v. 43, p. -31-40, 1995.
- BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTINEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod. Sci.*, v. 78, p. 307-26, 2003.
- BORGES, A. M. *Influência de diferentes manejos e tratamentos hormonais na dinâmica ovariana durante o ciclo estral e no anestro pós-parto de vacas Gir e Nelore.* 2001. 150f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa.
- BORGES, A. M.; TORRES, C. A. A.; RUAS, J. R. M. Características da Dinâmica Follicular e Regressão Luteal de Vacas das Raças Gir e Nelore após tratamento com Cloprostenol Sódico. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 32, p.85-92, 2003.
- BRIDGES, G. A.; HELSER, L. A.; GRUM, D. E. et al. Decreasing the interval between GnRH and PGF2a from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology.*, v. 69, p. 843-851, 2008.
- BRIDGES, G.A.; DAY, M.L.;GEARY, T.W.;CRUPPE, L.H.. Deficiencies in the uterine environment and failure to support embryonic development. *J. Amin. Sci.* v. 9. p. 3002-3013, 2013.
- BRIDGES, G. A.; MUSSARD, M. L.; BURKE, M. L. et al. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 117, p.208-215, 2010.
- BRIDGES, G. A.; MUSSARD, M. L.; HELSER, L. A.; DAY, M. L. Comparison of follicular dynamics and hormone concentrations between the 7-day and 5-day CO-Synch + CIDR program in primiparous beef cows. *Theriogenology.* v. 81, p.632-638, 2014.
- BRIDGES, G. A.; MUSSARD, M. L.; PATE, J. L. et al. Impact of preovulatory estradiol concentrations on conceptus development and uterine gene expression. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 133, p. 16-26, 2012.
- BONI, R. S.; ROVIELLO, B.; GASPARINI, B. et al. Pregnancies established after transferring embryos yielded by ovum pick-up and in vitro embryo production in Italian buffalo cow. *In: Proceedings of 5yh World Buffalo Congress*, p. 787-792, 1997.
- BURKE, C. R.; MUSSARD, M. L.; GASSER, C. L.; GRUM, D. E.; DAY, M. L. 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. 647–658, 2003.
- CARVALHO J. B. P.; CARVALHO, N. A. T.; REIS, E. L. et al. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology.* v. 69, p. 167–175, 2008.

- CACCIA, M.; BÓ, G. A. Follicle wave emergence following treatment of CIDR-B implanted beef cows with estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology*, v. 49, p. 341, 1998.
- CASTILHO, C.; GARCIA, J.M. Divergência no crescimento folicular: efeito na competência oocitária para produção *in vitro* de embriões – revisão. *Arch. Vet. Sci.* v. 10, p. 17-23, 2005.
- CERRI, R. L. A. Duração do proestro altera a fertilidade de vacas de leite de alta produção? In: XVII CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS. 2013. Palestras leite. Uberlândia.
- CERRI, R. L. A.; RUTIGLIANO, H. M.; CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E. P. Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows. *Reprod.* v. 137, p.813-823, 2009.
- COLAZO, M.G.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOF, R.J. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR- ased, fixed-time AI programs in beef heifers. *Theriogenology*. v. 60, p. 855-865, 2003.
- COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; DAVIS, H. et al. Effects of plasma progesterone concentrations on LH release and ovulation in beef cattle given GnRH. *Dom. Anim. Endocrin.* v. 34, p.109-117, 2008.
- COLAZO, MG.; KASTELIC, J. P.; MARTINEZ, M. F. et al. Fertility following fixed-time AI in CIDR-treated beef heifers given GnRH or estradiol cypionate and fed diets supplemented with flax seed or sunflower seed. *Theriogenology*. v. 61, p. 1115–1124, 2004.
- CREPALDI, G. A. *Eficácia de diferentes protocolos de indução da ovulação e de intervalos de inseminação em vacas de corte submetidas à IATF*. 2009. 88f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
- CHRISTIAN, R. E.; CASIDA, L. E.; The effects of progesterone in altering the estrous cycle of the cow. *J Anim Sci.*, v. 7, p. 540, 1948.
- DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, v. 55, p. 1211-1239, 2001.
- EMPRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <http://www.www.embrapa.br/gado-de-leite>. Acesso em 22/08/2016.
- FERREIRA, A. M. Reprodução da Fêmea Bovina: Fisiologia Aplicada e Problemas mais comuns (causas e tratamentos). Juiz do Fora: Editar, 2010. 418 p.
- FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L, SOLER, J.M.P. Ovarian follicular dynamics in Nelore Breed (*Bos indicus*), *Theriogenology*, v.47, p.1489-1505, 1997.
- FORDE, N.; CARTER, F.; FAIR, T; A CROWE, M. et al. Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. *Biol. Reprod.* v. 81, p. 784–794, 2009.
- FORTUNE, J.E. Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: A limiting factor in improvement of fertility? *Anim. Reprod. Sci.*, v. 33, p. 111-125, 1993.
- FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.*, v.50, p.225-232, 1994.
- FRANÇA, L. M.; RODRIGUES, A. S.; BRANDÃO, L. G. N, et al. Comparação de dois ésteres de estradiol como indutores da ovulação sobre o diâmetro folicular e a taxa de gestação de bovinos leiteiros submetidos a programa de Inseminação Artificial em Tempo Fixo. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, v.16, p.958-965, 2015.

- GEARY, T.W., DOWNING, E.R., BRUEMMER, J.E., WHITTIER, J.C. Ovarian and estrous response of suckled beef cows to select synch estrous synchronization protocol. *J. Anim. Sci.*, v.16, p.1, 2000.
- GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. *J. Reprod. Fertil.*, v.87, p.223-230, 1989.
- GONZÁLEZ, F.H.D. Introdução a Endocrinologia Reprodutiva Veterinária. Porto Alegre, 2002. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/favet/bioquimica/posgrand/>. Acesso em 14 de Junho de 2016.
- GRUNERT, E.; GREGORY, R. M. Semiologia do aparelho genital feminino. Diagnóstico e Terapêutica da Infertilidade na Vaca. Sulina, Porto Alegre, RS, p. 33-51, 1989.
- JOBST, S. M.; NEBEL, R. L.; MCGILLIARD, M. L. et al. Evaluation of Reproductive Performance in Lactating Dairy Cows with Prostaglandin F2 $\alpha$ , Gonadotropin-Releasing Hormone, and Timed Artificial Insemination. *J. Dairy Sci.* v. 83, p. 2366–2372, 2000.
- KARSCH, F. J.; BOWEN, J. M.; CARATY, A. et al. Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. *Biol. Reprod.* v. 56, p. 303-309, 1997.
- KASIMANICKAM, R.; HALL, J. B.; CURRIN, J. F.; WHITTIER, W. D. Sire effect on the pregnancy outcome in beef cows synchronized with progesterone based Ovsynch and CO-Synch protocols. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 104, p.1-8, 2008.
- KASTELIC, J.P. Understanding ovarian follicular development in cattle. *Vet. Med.*, v.6, p.64-71, 1994.
- KESLER, D. J. Estrus Synchronization Systems: GnRH. PROCEEDINGS, APPLIED REPRODUCTIVE STRATEGIES IN BEEF, Lexington, 2005.
- KINDER, J.E.; KOJIMA, F.N.; BERGFELD, E.G.M.; WEHRMAN, M.E.; FIKE, K.E. Progesterone and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. *J. Anim. Sci.*, v.74, p.1424-1440, 1996.
- KOJIMA, F.N.; PATTERSON, J. Guide to Estrus Synchronization of Beef Cattle. University of Missouri, Columbia, 2003.
- LAMB, G. C. Sincronização de estro utilizando CIDR e GnRH. In: IX NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS. 2004. Palestras de Corte. Uberlândia.
- LARSON, J. E.; LAMB, G. C.; STEVENSON, J. S. et al. Synchronization of estrus in suckled beef cows for detected estrus and artificial insemination and timed artificial insemination using gonadotropin-releasing hormone, prostaglandin F2 $\alpha$ , and progesterone. *J. Anim. Sci.*, v. 84, p.332-342, 2006.
- LIMA, F. S.; AYRES, H.; FAVARETTO, M. G. et al. Effects of gonadotropin-releasing hormone at initiation of the 5-d timed artificial insemination (AI) program and timing of induction of ovulation relative to AI on ovarian dynamics and fertility of dairy heifers. *J. Dairy Sci.*, v. 94, p.4997–5004, 2011.
- LIMA, F. S.; RIBEIRO, E. S.; BISINOTTO, R. S. et al. Hormonal manipulations in the 5-day timed artificial insemination protocol to optimize estrous cycle synchrony and fertility in dairy heifers. *J. Dairy Sci.* v. 96, p. 7054–7065, 2013.
- LONERGAN, P.; O'HARA, L.; FORD, N. Role of diestrus progesterone on endometrial function and conceptus development in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 10, p. 223-227, 2013.
- MARTINEZ, M. F.; ADAMS G. P.; BERGFELT, D. R.; KASTELIC, J. P. et al. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. *Anim. Reprod. Sci.* v. 57, p. 23–33, 1999.

- MARTINS, C. M. *Diferentes protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em Bos taurus e Bos indicus*. 2007. 116 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Da Universidade de São Paulo.
- MARTINS, C. M.; CASTRICINI, E. S. C.; SÁ FILHO, M. S. et al. Dinâmica folicular de vacas nelore tratadas com Cipionato ou Benzoato de estradiol em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo. *Act. Sci. Vet.*, v. 33, p. 285, 2005.
- MARTINEZ, M. F.; COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOF, R. J. Effects of estradiol and progesterone on plasma steroid and gonadotropin concentrations in CIDR-treated ovariectomized cows. *Theriogenology*, v. 59, p. 224, 2003.
- MESQUITA, F. S.; PUGLIESI, G.; SCOLARI, S. C. et al. Manipulation of the perioovulatory sex steroidal milieu affects endometrial but not luteal gene expression in early diestrus Nelore cows. *Theriogenology*. v. 81, p. 861–869, 2014.
- MIZUTA K. *Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, progesterona e estradiol que precedem a ovulação em fêmeas bovinas Nelore (Bos taurus indicus), Angus (Bos taurus taurus) e Nelore x Angus (Bos taurus indicus x Bos taurus taurus)*. 2003. 98f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
- MORENO, D.; CUTAIA, L.; VILLATA, L.; OTISI, F et al. Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol y progesterone. *Theriogenology*. v. 55, p. 408, 2001.
- MURPHY, M.G.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. *J. Reprod. Fertil.*, v.90, p.523-533, 1990.
- MUSSARD, M. L.; BURKE, C. R.; BEHLKE, E. J.; GASSER, C. L.; DAY, M. L. Influence of premature induction of an LH surge with GnRH on ovulation, luteal function and fertility in cattle. *J. Anim. Sci.*, v. 85, p. 937–943, 2007.
- NOAKES, D.E. Endogenous and Exogenous Control of Ovarian Cyclicity. In: NOAKES, D.E. *Fertility and Obstetrics in Cattle*. 2 Ed. London: University Press, 145p, 1997.
- NOAKES, D.E.; PARKINSON, T.J.; ENGLAND, C.G.W. *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 8 Ed. London: Saunders, Cap. 1, p. 2-53, 2001.
- O'HARA, L.; FORDE, N.; CARTER, F. et al. Paradoxical effect of supplementary progesterone between day 3 and day 7 on corpus luteum function and conceptus development in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* v. 26, p. 328–336, 2014.
- OLIVEIRA, M.E.F.; FERREIRA, R. M.; MINGOTI, G. Z. Controle do crescimento e da seleção folicular por fatores locais e sistêmicos na espécie bovina. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.35, p.418-432, 2011.
- PINHEIRO, O.L.; BARROS, C.M.; FIGUEIREDO, R.A.; VALLE, E.R. do; ENCARNAÇÃO, R.O., PADOVANI, C.R. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F<sub>2a</sub> or Norgestomet and estradiol valerate. *Theriogenology*, v.49, n.3, p.667-681, 1998.
- PEGORER, M. F. *Taxas de ovulação e prenhez em novilhas nelore cíclicas após utilização de protocolos para inseminação artificial em tempo fixo (iatf), com diferentes concentrações de progesterona, associadas ou não a aplicação de ecg*. 2009. 89f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista.

- PEREIRA, E. C. M. Sincronização de doadoras bubalinas de oócitos e Produção *In Vitro* de embriões bovinos e bubalinos em diferentes épocas do ano utilizando óleo essencial de *Lippia Origanooides*. 2015. 139f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal) – Universidade Estadual Paulista.
- PEREIRA, M. H. C.; RODRIGUES, A. D. P.; DE CARVALHO, et al. Increasing length of an estradiol and progesterone timed artificial insemination protocol decreases pregnancy losses in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* v. 97, p. 1454–1464, 2014.
- PONCIO, V. A. P. *Eficiência de dois protocolos de IATF utilizando benzoato de estradiol ou GnRH*. 2012. 60f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal Sustentável) - Instituto Zootecnia.
- PORTALUPPI, M. A.; STEVENSON, J. S. Pregnancy Rates in Lactating Dairy Cows After Presynchronization of Estrous Cycles and Variations of the Ovsynch Protocol. *J. Dairy Sci.*, v. 88, p.914-921, 2005.
- PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C.; Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2alpha and GnRH. *Theriogenology*, v.44, p.915-923, 1995.
- PURSLEY, J. R.; WILTBANK, M. C.; STEVENSON, J. S. et al. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J. Dairy Sci.* v. 80, p. 295-300, 1997.
- RABIEE, A. R.; LEAN, I. J.; STEVENSON, M. A. Efficacy of Ovsynch Program on Reproductive Performance in Dairy Cattle: A Meta-Analysis. *J. Dairy Sci.* v. 88, p. 2754–2770, 2005.
- RANDEL, R. D. LH and ovulation in Brahman, Brahman x Hereford and Hereford heifers. *J. Anim. Sci.* v. 43, p. 300, 1976.
- RATHBONE, M. J.; KINDER, J. E.; FIKE, K. et al. 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. Dru. Deli. Rev.*, v. 50, p. 277-320, 2001.
- REVAH, I.; BUTLER, R. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine. *J. Rep. Fert.*, v. 106, p.39-47, 1996.
- RHODES, R.C.; RANDEL, R.D.; LONG, C.R. Corpus luteum function in the bovine: in vivo and in vitro evidence for both a seasonal and breed type effect. *J. Anim. Sci.*, v.55, p.159-167, 1982.
- RIBEIRO, E. S.; MONTEIRO, A. P. A.; LIMA, F. S. et al. Effects of presynchronization and length of proestrus on fertility of grazing dairy cows subjected to a 5-day timed artificial insemination protocol. *J. Dairy Sci.* v. 95, p. 2513–2522, 2012.
- ROBERTS, R. M; CHENA, Y.; EZASCHIA, T. et al. Interferons and the maternal-conceptus dialog in mammals. *Semin. Cell Dev. Biol.*, v. 19, n.2, p. 170-177, 2008.
- RUTIGLIANO, H. M.; LIMA, F. S.; CERRI, R. L. A.; GRECO, L. F. et al. Effects of method of presynchronization and source of selenium on uterine health and reproduction in dairy cows. *J. Dairy. Sci.*, v. 91, p. 3323–3336, 2008.
- SÁ FILHO, O. G.; VASCONCELOS, J. L. M. Treatments to Optimize the Use of Artificial Insemination and Reproductive Efficiency in Beef Cattle under Tropical Environments. *Vet. Med. Inter.* v. 2011, p.1-10, 2011.
- SANTOS, J. E. P.; NARCISO, C. D.; RIVERA, F. et al. Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed artificial insemination protocol on reproduction of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 93, p.2976–2988, 2010.

- SARTORI, R.; BASTOS, M. R.; WILTBANK, M. C. Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle. *Rep. Fert. Develop.*, v. 22, p. 151–158, 2010.
- SARTORI, R.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M. C. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J. Dairy. Sci.*, v. 85, p. 2813-2822, 2002.
- SAVIO, J.D., KEENAN, L., BOLAND, M.P, ROCHE, J.F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle of heifers. *J.Reprod. Fert.*, v.83, p.663-71, 1988.
- SBA – Sistema Brasileiro do Agronegócio. Disponível em: <http://www.sba1.com> – Acesso em 22/08/2016.
- SERGERSON; E.C.; HANSEN, T.R.; LIBBY, D.W.; RANDEL, R.D.; GETZ, W.R. Ovarian and uterine morphology and function in Angus Brahman cows. *J. Anim. Sci.*, v. 59, p. 1026-46, 1984.
- SENEDA, M. M.; MOROTTI, F.; BERGAMO, L. Z. et al. Diferenças entre *Bos indicus* e *Bos taurus* que podem impactar a eficiência das biotécnicas da reprodução. In: 7º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA. 2016. Londrina.
- SENGER, P.L. Pathways to pregnancy and parturition. In: \_\_\_\_. *Spermatozoa in the Female Tract – Transport, Capacitation and Fertilization*. Washington: Pullman, 2003. Cap. 12, p.266-284.
- SILVA, S. G. B.; *Avaliação crítica da adoção de protocolos hormonais sobre o desempenho reprodutivo de fêmeas zebuínas*. 2009. 130f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
- SMITH, M. F.; POHLER, K, G.; PERRY, G. A. et al. Efeito do diâmetro do folículo ovulatório na concepção e manutenção da gestação. In: XVI CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS. 2012. Uberlândia.
- STEVENSON, J. S.; THOMPSON, K. E.; FORBES, W. L. et al. Synchronizing estrus and (or) ovulation in beef cows after combinations of GnRH, norgestomet, and prostaglandin F2 $\alpha$  with or without timed insemination. *J. Anim. Sci.* v. 78, p. 1747–1758. 2000.
- STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M.; Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. Savoy: IETS, 3 ed, 1999.
- TEIXEIRA, A. M. *Impacto da inseminação artificial em tempo fixo na eficiência reprodutiva de vacas de leite de alta produção*. 2010. 71f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
- THATCHER, W.W., DROST, M., SAVIO, J.D. et al. New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.33, p.27-49, 1993.
- TWAGIRAMUNGU, H.; GUILBAULT, L.A.; PROULX, J.G.; DUFOUR, J.J. Influence of corpus luteum and induced ovulation on ovarian follicular dynamics in postpartum cyclic cows treated with buserelin and cloprostenol. *J. Anim. Sci.*, v.72, p.1796-1805, 1994.
- VASCONCELOS, J. L. M.; MENEGHETTI, M. Sincronização de ovulação como estratégia para aumentar a eficiência reprodutiva de fêmeas bovinas, em larga escala. In: V SIMPÓSIO DE PRDODUÇÃO DE GADO DE CORTE E I SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRDODUÇÃO DE GADO DE CORTE. 2006. Viçosa.

- WILLIAMS, G. L.; SALDARRIAGA, J. P.; ZULUAGA, J. F.; STANKO, R. L. Synchronization of *Bos indicus* - influenced cattle for timed artificial insemination. *Repro. Strat. Beef Cattle*, November 12-13, 2005.
- WILLIAMS, G.; STANKO, R.; ALLEN, C. et al. Evidence that prostaglandin administration at the onset of a 5-day CO-Synch + CIDR synchronization protocol markedly improves fixed-time AI pregnancy rates in *Bos indicus*-influenced cattle. *J. Anim. Sci.*, vol. 89, Suppl. 1, 2015.
- WILLIAMS, S. W.; STANKO, R. L.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, G. L. Comparison of three approaches for synchronization of ovulation for timed artificial insemination in *Bos indicus*-influenced cattle managed on the Texas gulf coast. *J. Anim. Sci.*, v. 80, p.1173-1178, 2002.
- WILTBANK, M. C.; LOPEZ, H.; SARTORI, R.; SANGSRITAVONG, S.; GUMEN, A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*, v. 65, p. 17-29, 2006.
- WILTBANK, M. C.; PURSLEY, J. R. The cow as an induced ovulator: Timed AI after synchronization of ovulation. *Theriogenology*, v. 81, p.170-185, 2014.
- WILTBANK, M. C.; SARTORI, R.; FRICKE, P. M. Optimizing reproductive management programs for lactating dairy cattle. In: 7° SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA. 2016. Londrina.
- WILTBANK, M. C.; SOUZA, A. H.; CARVALHO, P. D. et al. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. *Rep. Fertil. and Develop.*, v.24, p.238-243, 2012.

7. **Anexo 1.** Documento de aprovação do projeto pelo CEUA/UFU



Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)  
Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315  
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;  
e-mail: ceua@propp.ufu.br, [www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

**ANÁLISE FINAL Nº 112/16 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 056/16**

Projeto Pesquisa: "Estudo da dinâmica folicular ovariana, qualidade de embriões e concentração plasmática de progesterona de novilhas mestiças submetidas a dois diferentes protocolos de sincronização de estro e ovulação".

Pesquisador Responsável: Emilio César Martins Pereira.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

**SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.**

**OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.**

Uberlândia, 06 de junho de 2016.

Prof. Dr. César Augusto Garcia  
Coordenador da CEUA/UFU