

UFRRJ
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DISSERTAÇÃO

**Comparação do Benzoato e do Cipionato de Estradiol na Indução da
Ovulação e na Taxa de Concepção de Vacas Girolando Submetidas à
Inseminação Artificial em Tempo Fixo**

Otávia Reis e Silva

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**COMPARAÇÃO DO BENZOATO E DO CIPIONATO DE ESTRADIOL
NA INDUÇÃO DA OVULAÇÃO E NA TAXA DE CONCEPÇÃO DE
VACAS GIROLANDO SUBMETIDAS Á INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL
EM TEMPO FIXO**

OTÁVIA REIS E SILVA

Sob a orientação do Professor
Marco Roberto Bourg de Mello

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586c Silva, Otávia Reis e, 1991-
Comparação do benzoato e do cipionato de estradiol
na indução da ovulação e na taxa de concepção de vacas
Gírolando submetidas à Inseminação Artificial em Tempo
Fixo / Otávia Reis e Silva. - 2018.
36 f.: il.

Orientador: Marco Roberto Bourg de Mello.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Zootecnia, 2018.

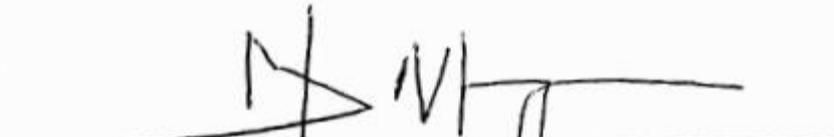
1. Dinâmica folicular. 2. Ésteres de estradiol. 3.
Indução da ovulação . 4. Gírolando. 5. Reprodução. I.
Mello, Marco Roberto Bourg de, 1991-, orient. II
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Zootecnia III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

OTÁVIA REIS E SILVA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de Concentração em Produção Animal.

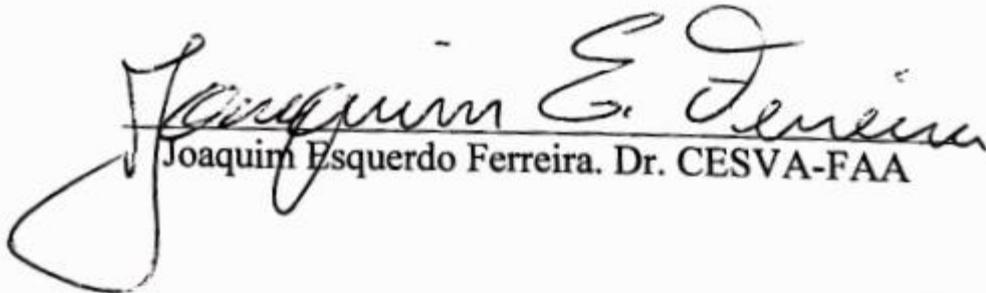
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/02/2018



Marco Roberto Bourg de Mello. Dr. UFRRJ
(Presidente)



Rodrigo Vasconcelos de Oliveira. Dr. UFRRJ



Joaquim Esquerdo Ferreira. Dr. CESVA-FAA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, em especial a minha mãe, exemplo diário.

AGRADECIMENTOS

Nesses dois anos de mestrado, de muito esforço, empenho e superação gostaria de agradecer a algumas pessoas que foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus e a Nossa Senhora das Mercês pelo dom da vida, por abençoar diariamente minha vida e por me carregarem quando me faltou força. Agradeço a toda minha família que compreendeu pacientemente minha ausência durante esse tempo e permaneceu ao meu lado me incentivando. Agradeço, em especial, as mulheres de minha família (minha mãe, minhas tias, minhas irmãs e minha avó) por serem as maiores incentivadoras do meu estudo, me apoiando incondicionalmente. Ao meu pai, por todo o incentivo e pensamentos positivos para que eu concluísse essa etapa.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marco Roberto Bourg de Mello por gentilmente aceitar me orientar em mais uma etapa da vida acadêmica, me incentivando e ensinando a dar o meu melhor. Muito obrigado!

A todos os colegas de Pós-graduação do curso de Zootecnia e de Medicina Veterinária pela ajuda nos experimentos e disciplinas. Em especial a pós-graduanda Lara Nogueira Silenciato que me ajudou ativamente durante toda essa etapa, desde o experimento até a elaboração desta dissertação.

Ao Dr. Joaquim Esquerdo Ferreira pela amizade, apoio e incentivo em todo esse processo.

Aos pesquisadores da Pesagro-RJ e Embrapa-Agrobiologia, em especial, ao Dr. Osvaldo Almeida Resende, Msc. Rosane Scatamburlo Fajardo Lizieri e Pedro Afonso, sem essa parceria eu jamais teria conseguido chegar até aqui.

A TODOS os funcionários da Pesagro- Rio que diariamente me receberam com carinho e atenção, possibilitando que todas as avaliações fossem realizadas com sucesso. Agradeço especialmente aos funcionários Carlos Machado Ribeiro (Carlão), Paulinho, Sr. João e Sr. Tião por participarem ativamente deste projeto.

Aos funcionários do Setor de Reprodução Animal, Sr. Zico, Sr. Zezinho e Sr. Reneu, obrigada pelo carinho e atenção, pelas conversas e brincadeiras, vocês fizeram com que essa etapa fosse mais alegre. Muito obrigada.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa etapa o meu mais sincero agradecimento.

BIOGRAFIA

OTÁVIA REIS E SILVA, filha de Alexandre de Ornellas da Silva e Maria Glauce Pereira Reis, nasceu em 15 de novembro de 1991, na cidade de Nova Friburgo, estado do Rio de Janeiro. cursou todo o ensino fundamental e médio no Colégio Nossa Senhora das Mercês, em Nova Friburgo, Rio de Janeiro, formando-se no ano de 2009.

Ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em maio de 2011, concluindo o mesmo curso em janeiro de 2016. Durante a graduação exerceu atividade como bolsista de Iniciação Científica do Programa Institucional de Bolsa de iniciação científica- (PIBIC/CNPq-UFRRJ) sob orientação do Professor Doutor Avelino José Bittencourt no ano de 2012. No ano de 2013 exerceu atividade como bolsista de apoio técnico no Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) sob orientação da Professora Doutora Vania Rita Elias Pinheiro Bittencourt. Realizou estágio junto ao setor de Reprodução Animal do Departamento de Reprodução e Avaliação Animal (DRAA) do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) sob orientação dos professores Dr. Marco Roberto Bourg de Mello e Msc. José Eugênio Três e do Dr. Joaquim Esquerdo Ferreira durante os anos de 2013 e 2014.

Exerceu atividade de monitoria junto à disciplina “Inseminação Artificial- IZ 306” do Departamento de Reprodução e Avaliação Animal do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), no período de 13/12/2013 a 21/07/2014 com carga horária semanal de 12 horas.

Exerceu atividade como bolsista de Iniciação Científica do Programa Institucional de Bolsa de iniciação científica- (PIBIC/CNPq-UFRRJ) sob orientação do Professor Doutor Marco Roberto Bourg de Mello no ano de 2015.

Participou de projetos de pesquisa e publicações na área de Reprodução Animal, com ênfase nas áreas de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução em Bovinos, assim como cursos e eventos científicos realizados na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e externamente.

Iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, na área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob a orientação do Professor Doutor Marco Roberto Bourg de Mello, em março de 2016, onde foi contemplada com bolsa de estudos da CAPES.

RESUMO

SILVA, Otávia Reis. **Comparação do benzoato e do cipionato de estradiol na indução da ovulação e na taxa de concepção de vacas Girolando submetidas à Inseminação Artificial em Tempo Fixo.** 2018. 25p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Os diversos estudos sobre manipulação do ciclo estral culminaram com o desenvolvimento de protocolos de sincronização do estro e da ovulação, a ponto de se definir um momento ótimo para a inseminação artificial. A indução da ovulação é parte primordial para a determinação do momento da IATF, dessa forma estudar quais hormônios e como eles se comportam permite compreender melhor esse processo fisiológico e ainda, manipulá-lo de forma eficiente. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi comparar o uso do benzoato e do cipionato de estradiol em um programa de IATF em vacas Girolando. Para tanto, foram utilizadas 108 vacas Girolando, lactantes, apresentando escore corporal médio de 3.12 ± 0.53 (escala de 1 a 5), dias pós-parto médio de 154.92 ± 120.49 e idade média de 7.21 ± 2.2 anos. Em dia aleatório do ciclo estral, os animais receberam dispositivo intravaginal contendo 1g de progestágeno (DIB®, Coopers, São Paulo Brasil) e aplicação intramuscular (im) de 2mg de BE, sendo este dia considerado D0. No D8, o dispositivo foi removido sendo aplicados (im) 500µg de cloprostenol (CIOSIN®, Intervet Schering Plough Animal Health, São Paulo, Brasil) em todas as fêmeas. Neste momento os animais foram divididos aleatoriamente em dois tratamentos: Grupo BE (n=52) e Grupo CE (n=56). Os animais do Grupo CE receberam como indutor da ovulação, 1mg de CE (im) (ECP®, Pfizer, São Paulo, Brasil) no momento da remoção do dispositivo, enquanto as vacas do Grupo BE receberam 1mg de BE (im) (ESTROGIN®, Agroline, São Paulo, Brasil) 24 horas depois (D9). A IATF ocorreu no D10, sendo o GC inseminado na parte da manhã (48 horas após a remoção do dispositivo intravaginal) e o GB sendo inseminado na parte da tarde (60 horas após a remoção do dispositivo intravaginal). Após a remoção do dispositivo, avaliações ultrassonográficas foram realizadas a cada 12 horas até o momento da ovulação. Foram avaliados os seguintes parâmetros reprodutivos: intervalo entre a retirada do dispositivo intravaginal de P4 e a ovulação- IRD (horas); intervalo entre a ovulação e a IATF- IOI (horas); diâmetro máximo do folículo dominante- FD (mm) no D10; taxa de crescimento do FD-TCFD (mm/dia); taxa de sincronização- TS (%); taxa de ovulação- TO (%), e taxa de concepção (TC). Para análise estatística foi utilizado o teste Qui-quadrado para TS, TO e TC, adotando nível de significância de 5%, para os outros parâmetros foi utilizado análise de variância (ANOVA). Os resultados para os grupos BE e CE foram, respectivamente: IRD: 67.91 ± 8.68 horas x 63.9 ± 10.49 horas; IOI: 8.68 ± 6.94 horas x 16.05 ± 10.20 horas; FD: 14.06 ± 2.26 mm x 13.11 ± 3.02 mm; TCFD: 1.26 ± 1.33 mm/dia x 1.11 ± 1.27 mm/dia; TS: 98.07% x 96.42%; TO: 90.38 % x 71.42% e TC: 48.07% x 46.42%. Conclui-se que o BE é mais eficiente para induzir a ovulação em vacas Girolando quando comparado com o CE, e ainda, ambos podem ser utilizados com eficiência em programas de IATF para vacas Girolando em relação às taxas de sincronização e de concepção.

Palavras-chave: Dinâmica folicular, Ésteres de estradiol, Indução da ovulação.

ABSTRACT

SILVA, Otávia Reis. **Comparison of estradiol benzoate and cypionate in ovulation induction and conception rate of Girolando cows submitted to Timed Artificial Insemination**. 2018. 25p. Dissertation (Master in Animal Science). Institute of Animal Science, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

The various studies on manipulation of the estrous cycle culminated in the development of effective protocols for ovulation and oestrus synchronization, to the point of defining an optimum moment for artificial insemination and proceeding to FTAI. The induction of ovulation is a primordial part for the determination of the time of the TAI, so to study which hormones and how they behave allows a better understanding of this physiological process and also, to manipulate it more efficiently. So, the objective of the present study was to compare the use of benzoate and estradiol cypionate in a TAI program in Girolando cows. For this purpose, 108 Girolando cows, with a mean body score of 3.12 ± 0.53 (1 to 5 scale), mean postpartum days of 154.92 ± 120.49 mean age of 7.21 ± 2.2 years. On the random day of the estrous cycle, the animals received an intravaginal device containing 1g of progestin (DIB®, Coopers, São Paulo Brazil) and intramuscular application (im) of 2mg of BE being considered as D0. In D8, the device was removed and 500µg of cloprostenol (CIOSIN®, Intervet Schering Plow Animal Health, Sao Paulo, Brazil) was injected in all females. At this moment, the animals were randomly divided into two treatments: Group EB (n = 52) and Group EC (n = 56). The EC group animals received 1 mg of EC (im) (ECP®, Pfizer, São Paulo, Brazil) at the moment of removal of the device, while the EB Group cows received 1 mg EB(im) (ESTROGIN® , Agroline, São Paulo, Brazil) 24 hours later (D9). Timed Artificial Insemination occurred at D10, with GC inseminated in the morning (48 hours after device removal) and GB inseminated in the afternoon (60 hours after device removal). After device removal, ultrasound evaluations were performed every 12 hours up to ovulation time. The following reproductive parameters were evaluated: interval between withdrawal of the intravaginal device from P4 and ovulation - IRD (hours); interval between ovulation and TAI-IOI (hours); maximum diameter of the dominant follicle - FD (mm) in D10;; synchronization rate - TS (%); ovulation rate - TO (%),and conception rate (CT). For statistical analysis, the chi-square test for TS, TO and TC was used, adopting a significance level of 5%, for the other parameters an analysis of variance (ANOVA) was used. The results for the EB and EC groups were, respectively: IRD: 67.91 ± 8.68 hours x 63.9 ± 10.49 hours; IOI: 8.68 ± 6.94 hours x 16.05 ± 10.20 hours; FD: 14.06 ± 2.26 mm x 13.11 ± 3.02 mm; TCFD: 1.26 ± 1.33 mm / day x 1.11 ± 1.27 mm / day; TS: 98.07% x 96.42%; TO: 90.38% vs. 71.42% and TC: 48.07% vs. 46.42%. There were statistical differences in the following parameters: IRD, IOI, TO. It is concluded that EB is more efficient in inducing ovulation in Girolando cows when compared to EC, and both can be used efficiently in IATF programs for Girolando cows in relation to synchronization and conception rates.

Key words: Follicular dynamics, Estradiol esters, Induction of ovulation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxa de crescimento folicular, diâmetro do folículo dominante no D10, intervalo da retirada do dispositivo de progesterona à ovulação e IATF à ovulação, em função dos tratamentos com CE e BE.....	13
Tabela 2. Taxa de concepção em relação ao intervalo entre a IATF e a ovulação em vacas Girolandas inseminadas em tempo fixo.....	15
Tabela 3. Diâmetro médio e desvio padrão do maior folículo presente no ovário dos animais avaliados no D10 em função dos tratamentos com CE e BE e do número de vacas gestantes após protocolos de inseminação artificial em tempo fixo em vacas Girolando.	16
Tabela 4. Taxas de sincronização, de ovulação e de concepção em função da utilização de BE e CE em protocolos IATF.	17

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Protocolos hormonais dos grupos: Benzoato (GB) e Cipionato (GC).....	11
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Fisiologia do Ciclo Estral.....	4
3.2 Dinâmica Folicular	5
3.2.1 Fase antral.....	5
3.3 Controle Farmacológico do Ciclo Estral.....	7
3.4 Ésteres de Estradiol na Indução da Ovulação	8
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	10
4.1 Local e Período do Experimento.....	10
4.2 Animais.....	10
4.3 Manejo Reprodutivo	10
4.4 Manejo Nutricional	10
4.5 Sincronização da Ovulação e IATF	10
4.7 Diagnóstico de Gestação	12
4.8 Análise Estatística	12
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
6 CONCLUSÕES	18
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
8 ANEXOS.....	25

1 INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva do leite e seus derivados desempenha papel importante relacionado a estrutura econômica e social brasileira, além de obviamente estar diretamente relacionada ao setor alimentício. Pode-se destacar ainda, sua importância na geração de emprego e renda na qual estão envolvidos todos os setores (primário, secundário e terciário).

Uma cadeia produtiva tão heterogênea cria diversas possibilidades e oportunidades, mas também carrega uma série de desafios. Segundo as estatísticas oficiais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2016, no Brasil, o efetivo de vacas ordenhadas foi de 19,67 milhões de animais (sendo 6,8% inferior ao registrado em 2015).

Segundo o United States Department of Agriculture- USDA (2016), o Brasil apresentou o terceiro maior efetivo de vacas leiteiras, atrás de Índia e União Europeia e ainda, foi o quinto maior produtor mundial de leite em 2016 (33,6 bilhões de litros), atrás da União Europeia, Estados Unidos, Índia e China. Esses dados evidenciam um dos desafios enfrentados pela cadeia produtiva do leite brasileiro, a baixa produtividade. A produtividade média brasileira foi de 1709 litros/vaca/ano (IBGE, 2016), produtividade bem pouco expressiva. A busca pelo aumento da produtividade da vaca brasileira está relacionada a inúmeros fatores como raça, ambiente e ambiência, instalações e nutrição. Enfim, uma busca por vacas melhores e mais produtivas passa incontestavelmente pela seleção de animais geneticamente superiores.

Neste sentido, a reprodução assistida (RA) passa a ser uma possibilidade a mais na busca por esses animais. Especula-se que a história da RA tenha início em 1332, quando foi realizada a primeira inseminação artificial pelos árabes na espécie equina. Porém, os primeiros relatos científicos ocorreram somente em 1779 por um italiano chamado Lázaro Spalanzani que após coletar sêmen de cachorro, o mesmo foi depositado no trato reprodutivo de uma cadela em cio dando origem a três filhotes (SEVERO, 2013). Os estudos na área de reprodução assistida deram origem a uma série de técnicas utilizadas até hoje. A criopreservação de espermatozoides, oócitos e embriões, a inseminação artificial, a técnica de superovulação, a produção *in vitro* de embriões, clonagem e transgenia são algumas das técnicas utilizadas na reprodução animal com o objetivo não só de viabilizar uma gestação, mas também de gerar descendentes geneticamente melhorados, em vacas leiteiras, animais com capacidade de produzir mais leite, por exemplo.

As técnicas utilizadas vão desde as mais simples e de menor custo, como a inseminação artificial, até as mais complexas e que exigem altos investimentos como a transgenia. Apesar das inúmeras técnicas disponíveis para serem empregadas, o conhecimento da fisiologia reprodutiva da fêmea submetida a tais procedimentos é um denominador comum entre elas. O conhecimento da dinâmica folicular de vacas permitiu avaliar parâmetros como taxa de crescimento folicular, tamanho do folículo pré ovulatório, momento da ovulação e ainda, identificar processos fisiológicos como recrutamento, seleção e dominância folicular, formação do corpo lúteo e sua regressão. O entendimento desses processos fisiológicos permitiu que, pelo uso de hormônios, fosse possível manipular o ciclo estral das fêmeas bovinas possibilitando a aplicação de biotécnicas relacionadas a reprodução, como por exemplo a Inseminação Artificial em Tempo Fixo.

A Inseminação Artificial, considerada a técnica mais antiga e ainda, a mais utilizada no Brasil, consiste na deposição do sêmen no corpo do útero de uma fêmea, para tanto há necessidade de se observar e identificar o estro do animal, sendo esta uma das dificuldades mais comuns relacionadas a essa biotécnica da reprodução (SEVERO, 2013). Dados da Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA, 2014) mostram que em torno de 11,9% das matrizes bovinas são inseminadas. Embora a técnica seja a principal ferramenta

para promover o melhoramento genético nos rebanhos brasileiros, esse número ainda é pequeno em comparação a alguns países como Holanda e Estados Unidos, onde mais de 90% das matrizes são artificialmente inseminadas. A falta de mão de obra qualificada tem sido a principal dificuldade enfrentada pelos pecuaristas, uma vez que a inseminação artificial depende da detecção do cio, sendo este um dos principais gargalos ou desvantagens na implantação da técnica. A não identificação do estro corretamente implica diretamente em baixas taxas de serviço e de concepção e, conseqüentemente, baixa eficiência reprodutiva de um rebanho.

A busca por alternativas que contornem essas dificuldades levou ao desenvolvimento da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), uma biotécnica que por meio de manipulação farmacológica permite sincronizar o estro e a ovulação dos animais de modo que as inseminações ocorram em horário pré-determinado, dispensando assim a observação e identificação do estro. O desenvolvimento da IATF só foi possível graças aos já conhecidos e estudados eventos fisiológicos (dinâmica folicular, controle hormonal, fisiologia reprodutiva), por meio desse conhecimento desenvolveram-se diversos protocolos hormonais de IATF com utilização de diferentes hormônios, entre eles o GnRH, LH, associação estrógeno/progesterona entre outros.

Os vários hormônios utilizados para realização da IATF além de permitir eliminar a necessidade da detecção de cios, também induzem a ciclicidade de vacas em anestro, permite concentrar e adiantar o período de parição; promove padronização do rebanho, otimiza a mão-de-obra, aumenta a taxa de serviço e conseqüentemente a Eficiência Reprodutiva do rebanho.

A busca por protocolos mais eficientes, mais práticos e mais baratos para sincronização da ovulação tem levado pesquisadores a estudar diferentes hormônios como o GnRH e seus análogos e ainda, benzoato de estradiol e outros ésteres de estradiol disponíveis no mercado. A associação dos hormônios, além das vantagens já citadas acima, permite também que os dias de manejo com os animais diminuam. Sendo esta uma grande vantagem, uma vez que a redução do número de manejos irá impactar não só no bem estar animal, diminuindo o estresse de trazer os animais ao curral, mas também em uma economia com mão-de-obra de peões, veterinários e com o deslocamento dessas equipes.

Dentre os hormônios utilizados, o cipionato de estradiol já é amplamente utilizado em rebanhos de corte, pois seu uso permite que o protocolo para sincronização da ovulação seja feito com apenas três manejos, e não quatro como em alguns protocolos que utilizam benzoato de estradiol. A diminuição de um manejo torna o processo mais prático, mais barato, menos estressante aos animais e ainda, com garantia de eficiência para o produtor. Dessa forma realizar estudos que busquem comparar esses diferentes hormônios disponíveis no mercado buscando a simplificação e a redução de custos dos protocolos de sincronização da ovulação para vacas leiteiras e ainda, garantindo uma boa ou ainda, melhor eficiência reprodutiva torna-se muito importante para aumentar o número de fêmeas inseminadas no Brasil, diminuir os custos de produção de um propriedade fazendo com que o produto oferecido seja mais competitivo no mercado e ainda, melhorando a Eficiência Reprodutiva do rebanho nacional. Sendo assim, o presente trabalho tem como hipótese que o uso do cipionato de estradiol possui a mesma eficiência quando comparado ao uso de benzoato de estradiol como indutor de ovulação em um programa de IATF em vacas Girolando.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Comparar o uso do benzoato e do cipionato de estradiol em um programa de IATF em vacas Girolando.

2.2 Objetivos Específicos

Comparar o uso do benzoato e do cipionato de estradiol no intervalo entre a retirada do dispositivo de P4 e a ovulação (horas);

Comparar o uso do benzoato e do cipionato de estradiol no intervalo entre a IATF e a ovulação (horas);

Comparar o uso do benzoato e do cipionato de estradiol no diâmetro do folículo dominante no D8 e no D10;

Comparar o uso do benzoato e do cipionato de estradiol na taxa de crescimento do folículo dominante (mm/dia);

Comparar o uso do benzoato e do cipionato de estradiol na taxa de sincronização (%);

Comparar o uso do benzoato e do cipionato de estradiol na taxa de ovulação (%);

Comparar o uso do benzoato e do cipionato de estradiol na taxa de concepção (%).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Fisiologia do Ciclo Estral

O ciclo estral é um conjunto de fenômenos rítmicos observados em alguns mamíferos, nos quais há períodos regulares (mas limitados) de receptividade sexual (cio), que ocorrem em intervalos característicos para cada espécie (DO VALLE, 1991). Segundo Hafez e Hafez (2004), o ciclo estral se estabelece a partir da puberdade e abrange modificações cíclicas na fisiologia e morfologia dos órgãos genitais das fêmeas.

A fêmea bovina é classificada como poliéstrica anual, tendo o ciclo estral duração de aproximadamente 21 dias, podendo variar entre 18 e 24 dias (MIES FILHO, 1970). A duração do estro varia de 12 a 24 horas (MORAES *et al.*, 2002) e a ovulação ocorre em torno de 24 a 30 horas após o início do estro (DROST, 1991) ou de 8 a 15 horas após o término do estro (CAETANO & CAETANO Jr., 2015). O ciclo estral bovino pode ser dividido didaticamente em quatro etapas: proestro, estro, metaestro e diestro (REECE, 2006).

Outra divisão utilizada e mais simples é a divisão em duas fases: fase folicular ou estrogênica, que vai desde o crescimento folicular até a ovulação e a fase luteínica ou progesteronal, que se inicia com surgimento do CL até sua regressão (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Sendo assim, essas modificações cíclicas e morfológicas são desencadeadas sob efeito de diversos hormônios. De forma simplificada o hipotálamo é responsável pela produção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), a hipófise é a estrutura que irá sintetizar o hormônio folículo estimulante (FSH) e ainda, o hormônio luteinizante (LH). A progesterona, o estradiol e a inibina são produzidos nos ovários e no útero temos a prostaglandina F_{2α}. Todos esses hormônios, afim de regular o ciclo estral bovino, irão interagir entre si através de dois sistemas: o de feedback positivo e o feedback negativo (STEVENSON, 2007).

O GnRH é um hormônio protéico, sua liberação ocorre através de um sistema de comunicação entre o hipotálamo e a hipófise, conhecido como sistema porta hipotalâmico-hipofisário, no qual irá regular a liberação do FSH e do LH (MOENTER *et al.*, 1992). Fatores intrínsecos (gene Kiss-1, concentrações de estradiol, opióides endógenos) (MONDAL *et al.*, 2015) e fatores extrínsecos (balanço energético negativo e efeito da mamada) tem influencia sob a síntese e liberação de GnRH (CLARKE, 2014). A elevação da concentração de FSH induz o crescimento e proliferação de folículos, esse crescimento ocorre em padrão de ondas foliculares (ADAMS *et al.*, 1992; SUNDERLAND *et al.*, 1994) e cada onda é composta por: emergência de um pool de folículos, seleção, dominância, atresia ou ovulação do folículo dominante (FORDE *et al.*, 2011).

A grande maioria dos folículos irá sofrer atresia durante o processo de desenvolvimento. Quando o maior folículo em crescimento atinge um diâmetro maior que 8mm (GINTHER *et al.* 1996; SARTORI *et al.* 2001), ocorre o desvio folicular e seleção do folículo dominante. O folículo dominante continua em desenvolvimento, o FSH induz a ativação de outros fatores de crescimento, aumentando a concentração de IGF-1 disponível para o crescimento celular e síntese de estradiol (RIVERA e FORTUNE, 2003; LUCY, 2007).

A concentração de estradiol no fluido folicular do folículo dominante é duas vezes maior quando comparado com um folículo subordinado do mesmo diâmetro (MIHM *et al.*, 2000). As altas concentrações de estradiol serão responsáveis pelo comportamento do cio e pela supressão do FSH (GINTHER *et al.*, 2000). O folículo dominante continua o seu crescimento independentemente de FSH pois a presença de receptores de LH desenvolvidos nas células da granulosa fazem com que o mesmo se torne responsivo também ao LH (XU *et al.*, 1995).

A ovulação ocorre por volta de 30 horas (ROELOFS *et al.*, 2005a) após o início do comportamento de estro, quando E2 promove feedback positivo no hipotálamo e na pituitária anterior, estimulando a liberação de GnRH e LH, e na maturação e ovulação do folículo dominante (ROCHE, 1996; WALKER *et al.*, 1996). Após a ovulação o CL produz alta concentração de P4 que é fundamental para manutenção da gestação (SENGER, 2005). A alta concentração de P4 durante a fase lútea impede a ocorrência de pulsos frequentes de LH que resultariam na ovulação de um folículo dominante (SENGER, 2005). Folículos dominantes que se desenvolvem durante esse período entram em atresia (FORDE *et al.*, 2011). O reconhecimento embrionário é sinalizado pela produção de interferon tau (IFNT) pelo conceito (ANTONIAZZI, 2011). Se o reconhecimento materno não for sinalizado ocorre a luteólise do CL (SENGER, 2005; FORDE *et al.*, 2011).

Com a regressão do CL, ocorre uma drástica diminuição na concentração de P4, que resulta no aumento de GnRH permitindo assim, que o animal retome a fase folicular do ciclo estral (SENGER, 2005; FORDE *et al.*, 2011). Essas mudanças cíclicas e contínuas são conhecidas também por dinâmica folicular.

3.2 Dinâmica Folicular

O conceito de dinâmica folicular foi estabelecido por LUCY *et al.* (1992) e o define como um processo contínuo de crescimento e regressão de folículos antrais, no qual um se desenvolve até folículo pré-ovulatório.

3.2.1 Fase antral

A utilização da ultrassonografia na medicina veterinária possibilitou inúmeros avanços, entre eles, permitiu que os folículos antrais pudessem ser identificados, medidos e acompanhados durante todo o ciclo estral até a sua ovulação ou atresia (GINTHER, 2017).

Na fase antral de desenvolvimento folicular podemos identificar algumas fases e esclarecer alguns conceitos que nos farão compreender melhor como o desenvolvimento folicular ocorre, entre elas estão os conceitos de onda folicular e ainda, os processos fisiológicos conhecidos como: fase de recrutamento, seleção e dominância, sendo a ovulação o último evento relacionado ao desenvolvimento folicular (HANSEL E CONVEY, 1983).

Em bovinos, o desenvolvimento folicular na fase antral passa por uma fase de crescimento lenta e uma fase rápida (FAIR, 2003; AERTS E BOLS, 2010). A fase lenta tem duração de mais de 30 dias desde a formação do antro até o estágio de folículos pequenos (3-5 mm de diâmetro). A segunda fase dura cerca de 5-7 dias, e inclui as fases de recrutamento, seleção e dominância, seguida de ovulação ou regressão do folículo pré-ovulatório (LUSSIER *et al.*, 1987; AERTS E BOLS, 2010).

Estudos da década de 60 permitiram observar que, na espécie bovina, o crescimento folicular ovariano ocorre em ondas foliculares (RAJAKOSKI, 1960; PIERSON E GINTHER, 1987) e essas por sua vez abrigam as três fases citadas acima. As fêmeas bovinas, em sua maioria, apresentam duas a três ondas de desenvolvimento folicular (PIERSON E GINTHER, 1988; SIROIS E FORTUNE, 1988; GINTHER *et al.*, 1989), sendo somente a última onda a que possivelmente abrigará o folículo ovulatório devido a condições peculiares relacionadas ao controle endócrino do ciclo estral. Animais com uma única onda folicular ou ainda, quatro ondas foliculares podem ser observados também, porém com menos frequência (SAVIO *et al.*, 1988; SIROIS E FORTUNE, 1988).

A emergência de uma onda folicular, evento denominado recrutamento, pode ser detectada através do aparelho de ultrassonografia um dia após a ovulação (D1), e compreende

o crescimento de um grupo de pequenos folículos antrais. O recrutamento dos folículos está atrelado ao aumento dos níveis de FSH sendo assim, podemos dizer que na fase antral há a necessidade e dependência das gonadotrofinas. O folículo que se tornará dominante está presente nessa coorte de folículos recrutados sincronicamente, estes por sua vez terão ao início do seu crescimento um diâmetro que pode variar de 1-5 mm (GINTHER, 2016). O número de folículos recrutados depende de alguns fatores, dentre eles o mais importante é a raça do animal.

Tortorella *et al.* (2017) verificaram que em vacas da raça Curaleiro pé-duro, em média, são recrutados 17.6 ± 1.2 folículos em cada onda folicular, em novilhas esse número tem uma pequena queda, sendo a média 15.3 ± 0.9 folículos. Driancourt (2001) relatou em seu estudo que, em média, 5-10 folículos são recrutados, independente da espécie do animal, porém podem chegar ao número de 24 folículos em novilhas Holandesas segundo revisão realizada por Mihm e Austin (2002). Outros autores compararam os números dos folículos recrutados em vacas de corte e associaram ao tamanho dos folículos achando no D0 uma média de $21,6 \pm 5,6$ folículos medindo de 1-2mm (GARCÍA GUERRA *et al.*, 2015) todos esses eventos fazem parte da fase de recrutamento.

Logo após o recrutamento dos folículos vem a fase de seleção, também conhecida como desvio, que é basicamente a seleção de um único folículo, no caso de espécies monovulares como a vaca, que irá se desenvolver e exercer dominância sob os outros, enquanto os outros entraram num processo de atresia folicular. Ginther (2016) conceituou a seleção como um processo em que um folículo de uma onda se torna o folículo dominante e os folículos restantes tornam-se folículos subordinados, entrando em atresia.

O aumento do FSH acompanha cada onda folicular e atinge sua maior concentração (pico) quando os folículos estão com cerca de 4 mm de diâmetro, indicando dessa forma que a divergência ou possível seleção do folículo dominante ocorre no período em que há um gradual declínio da concentração de FSH (ADAMS *et al.*, 1992). Não existe um consenso sobre o diâmetro do folículo dominante do início do desvio/seleção. Em animais da raça Holandesa e animais mestiços da raça Hereford, segundo Ginther *et al.* (1996) e Jaiswal *et al.* (2004), o diâmetro do folículo no início da seleção é de 8.5mm, porém esse valor já não poderia ser considerado para rebanhos *Bos taurus indicus* cujo desvio pode ocorrer quando o folículo tem apenas 6 mm (SARTORELLI *et al.*, 2005). Em outro estudo, Gimenes *et al.* (2008) constataram que a capacidade de ovulação do folículo dominante foi adquirida em torno dos 7mm de diâmetro para vacas Nelore em contraposição ao gado Holandês que somente adquiriu essa capacidade aos 10mm (SARTORI *et al.*, 2001).

A capacidade do folículo se tornar dominante e ser selecionado parece não estar somente relacionada ao tamanho do folículo e sua taxa de crescimento. A expressão de receptores de LH, a concentração de estradiol e a concentração e IGF 1 (fator de crescimento semelhante a insulina) são aspectos intrafoliculares que parecem estar diretamente relacionados ao desvio/seleção uma vez que esses parâmetros começaram a aumentar no folículo que se tornou dominante por volta dos 7.5mm (BEG E GINTHER, 2006).

O conhecimento adquirido através do estudo da dinâmica folicular possibilitou avanços na manipulação do ciclo estral.

3.3 Controle Farmacológico do Ciclo Estral

Os avanços no entendimento da fisiologia do ciclo estral e da função ovariana em fêmeas bovinas permitiu que ao longo dos anos fosse possível manipular e controlar o ciclo estral da fêmea bovina de forma mais eficaz e satisfatória (COLAZO E MAPLETOFT, 2014).

O controle farmacológico do ciclo estral permitiu que a inseminação artificial expandisse, acelerando o processo de melhoramento genético nos rebanhos, possibilitando um melhor planejamento reprodutivo, concentrando o período em que os animais demonstram cio, facilitando a observação e identificação do mesmo, e em alguns casos permite não só facilitar a detecção do cio, mas também eliminar totalmente a necessidade da identificação do cio do animal (PEGORARO *et al.*, 2016), sendo essa a principal limitação para o sucesso da IA convencional.

O controle do ciclo estral da fêmea bovina pode ser realizado com o objetivo de sincronização somente do estro ou ainda, da sincronização do estro e da ovulação (DO VALLE, 1991). A sincronização do estro consiste em basicamente diminuir o período entre um cio e outro, ou ainda concentrá-los num mesmo período com o objetivo de facilitar o manejo e otimizar a mão de obra. Podendo ser realizada através de dois métodos: diminuição da fase luteal (luteólise) ou prolongamento da fase luteal (DO VALLE, 1991).

A primeira técnica utilizada para induzir o estro foi a extirpação manual do corpo lúteo (CL), no entanto, devido aos riscos e alternativas mais seguras, essa técnica caiu em desuso (LARSON E BALL, 1992). A diminuição da fase luteal tem sido conseguida pela utilização da prostaglandina e seus análogos. Estes são utilizados desde a década de 60, sua função luteolítica permitiu que fosse realizada a indução do estro de forma menos arriscada e ainda, mais prática. Diversos estudos testando eficácia do uso do cloprostenol e seus análogos, comparando seus efeitos, formas de aplicação e ainda tempo de resposta a aplicação vem sendo desenvolvidos desde a década de 70 conforme mostra a revisão realizada por Larson; Ball (1992). No entanto, para que o tratamento com PGF2 α tenha sucesso é necessária a presença de um CL, uma vez que sua ação é provocar a regressão morfológica e funcional dessa estrutura, com consequente queda dos níveis endógenos de P4 (RATHBONE *et al.*, 2001).

Apesar das vantagens da sincronização do estro, ainda é necessária que seja realizada a observação e detecção do cio para garantir melhores resultados (BALL E JACKSON, 1984). E é a partir dessa limitação que a sincronização da ovulação começou a expandir e ganhar espaço, uma vez que essa técnica permite e viabiliza que a inseminação artificial seja realizada sem a detecção de cio, também conhecida como IATF.

A IATF surgiu em 1995, com Pursley e colaboradores, onde estes desenvolveram o primeiro protocolo de sincronização da ovulação, conhecido como "OvSynch", no qual envolvia uma aplicação de GnRH em dia aleatório do ciclo estral, sendo este considerado o D0. No D7 era realizada uma aplicação de PGF e depois de 48h (D9) era realizada a segunda aplicação de GnRH. A inseminação artificial em tempo fixo foi realizada no D10.

Para o desenvolvimento de protocolos de IATF, os tratamentos hormonais seguem três princípios básicos, independente de qual hormônio será utilizado em cada protocolo. O primeiro princípio é o da "sincronização da emergência de uma nova onda de crescimento folicular". O segundo princípio é definido como "controle e queda da progesterona", e como terceiro princípio, "a indução sincronizada da ovulação" (PURSLEY *et al.*, 1995). Para a emergência de uma nova onda, pode-se induzir a ovulação do folículo dominante presente no momento do tratamento com uso de hormônios, como por exemplo: hormônio liberador de gonadotrofinas ou hormônio luteinizante (DO NASCIMENTO *et al.*, 2003; AMBROSE *et al.*, 2005).

E ainda, pode ser feita também, através da atresia folicular e, conseqüentemente, uma sincronização da nova onda folicular, nesse caso, pode ser usado a associação de progesterona (P4) e ésteres de estradiol (E2) (SÁ FILHO *et al.*, 2014). Já para o segundo princípio, o controle da progesterona é alcançado pela administração exógena de P4 e análogos por meio de dispositivos/implantes intravaginais/auriculares de liberação lenta, e pelo uso de agentes luteolíticos, como a prostaglandina F2 α e seus análogos (SALES *et al.*, 2012). E por fim, a indução da ovulação é realizada com hormônios que vão sincronizar a indução da ovulação do folículo dominante ao final do tratamento, para isso pode ser usado o E2, GnRH, LH ou hCG, (PURSLEY *et al.*, 1995; SOUZA *et al.*, 2007; AYRES *et al.*, 2008).

A sincronização e indução da ovulação é o ponto chave estratégico para que não seja necessária a observação e identificação do cio, dessa forma utilizar hormônios que respondam com melhor eficácia se torna primordial no processo de controle farmacológico para realização da IATF.

3.4 Ésteres de Estradiol na Indução da Ovulação

A ovulação é um processo que abrange muito mais do que somente a liberação do óvulo. O conceito de ovulação deve incluir toda a seqüência entre o crescimento folicular até a ruptura do folículo, podendo ainda ser considerado a formação do corpo lúteo funcional como parte do processo de ovulação (HALBE, 1976). Dessa forma a ovulação ou ainda a indução da ovulação desencadeia uma série de mudanças hormonais no animal.

Atualmente existe uma série de fármacos que são utilizados como indutores de ovulação em fêmeas bovinas, dentre eles podemos destacar o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH e seus análogos) e as gonadotrofinas (FSH, LH, eCG e hCG). Mais recentemente, a prostaglandina também tem sido estudada como agente indutor da ovulação (PFEIFER *et al.*, 2014; PFEIFER *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2017; GOBIKRUSHANTH *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

O estradiol e seus ésteres são largamente utilizados na reprodução animal para o controle farmacológico do ciclo estral em fêmeas bovinas, uma vez que em determinadas condições, a administração de estrógeno pode estimular a liberação de GnRH/LH e promover a ovulação (MOENTER *et al.*, 1990). O estradiol também tem funções na fisiologia reprodutiva como expressão de cio, por exemplo.

A utilização dos ésteres de estradiol na indução da ovulação, além de eficiente, é uma alternativa economicamente mais viável, uma vez que são hormônios mais baratos quando comparado com os outros citados acima (CARVALHO *et al.*, 2017).

Existem diversas formas de estrógenos, entre eles, o 17- β - estradiol, molécula biologicamente ativa, o benzoato de estradiol e o cipionato de estradiol. Apesar de todos serem estrógenos, cada um produz perfis de 17- β - estradiol distintos na circulação devido a peculiaridades na esterificação da molécula, levando assim a alterações na absorção e conseqüentemente no seu metabolismo (SOUZA *et al.*, 2005).

A administração do 17 β -estradiol gera uma ação mais rápida, por não necessitar ser metabolizado e transformado no organismo conforme Larson *et al.* (1992) observaram em seus estudos, constatando aumento das concentrações de estradiol na circulação em duas horas pós-administração e retornando a níveis basais em seis horas.

O cipionato de estradiol, por ser formado pela esterificação do ácido propiônicociclopentano, resulta em baixa solubilidade em água e, sendo assim, liberação mais lenta no local de administração, prolongando a atividade biológica quando comparado ao benzoato de estradiol e 17 β estradiol (VYNCKIER *et al.*, 1990). Segundo Pancarci *et al.* (2002), a administração de 2mg de CE (intramuscular) promove aumento nas concentrações

plasmáticas de estradiol 12 horas após a administração, pico em 36 horas após a administração e permanecem elevadas por mais de 96 horas.

A utilização de 1 mg de BE intramuscular induz a um rápido aumento nas concentrações de estradiol no plasma após quatro horas, mantendo-se elevada por 24 horas (BURKE *et al.*, 2000).

Estudos mais recentes realizados por Uslenghi e colaboradores em 2016 mostraram o perfil plasmático do 17β estradiol após a utilização de diferentes indutores de ovulação, concluindo que, considerando as características peculiares a cada fármaco, podemos utilizar qualquer um dos ésteres de estradiol com comprovada eficácia.

Os ésteres de estradiol são comumente empregados em protocolos de IA a fim de promover o controle farmacológico do ciclo estral, uma vez que na ausência de progesterona sua administração pode estimular a liberação de GnRH e LH e causar a ovulação do folículo dominante (MOENTER; CARATY; KARSCH, 1990). Os dois principais ésteres utilizados em programas de IATF de fêmeas bovinas são o benzoato de estradiol e o cipionato de estradiol, os quais apresentam características peculiares quanto a farmacocinética (meia-vida, principalmente) (VYNCKIER *et al.*, 1990). O conhecimento dessas características distintas é fundamental para determinar o momento mais adequado para administração desses indutores de ovulação em protocolos de IATF a fim de garantir resultados satisfatórios.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/IZ/UFRRJ) sob processo nº 23083.024213/2017-14 (Anexo).

4.1 Local e Período do Experimento

O experimento foi realizado no estábulo da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO) e no Setor de Bovinocultura de Leite da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), ambos localizados no município de Seropédica, RJ. Geograficamente, o município situa-se a 22°45'53''S, 43°41'56''W e 33m de altitude acima do nível do mar.

O experimento foi realizado entre janeiro de 2015 e novembro de 2017.

4.2 Animais

Foram utilizadas 108 vacas Girolando, não gestantes, plurigestas, em lactação, cíclicas e acíclicas e com escore corporal médio de 3.1 ± 0.5 (escala de 1 a 5) (ASSIS *et al.*, 2005) e com idade média de 7.2 ± 2.2 anos. Os 108 animais foram divididos em 6 rodadas de experimento.

4.3 Manejo Reprodutivo

Todos os animais foram submetidos previamente a exame ginecológico por palpação retal com auxílio de ultrassonografia para detecção da ciclicidade e anormalidades do trato reprodutivo antes de se iniciar os protocolos hormonais e o acompanhamento da dinâmica folicular. As vacas que apresentaram prenhez, suspeita de cistos ovarianos (folicular e luteínico) e/ou alterações uterinas (infecções uterinas, presença de conteúdo não fisiológico) foram descartadas do experimento. Todos os animais utilizados durante o experimento eram livres de Brucelose e Tuberculose.

4.4 Manejo Nutricional

As vacas selecionadas foram mantidas em piquetes de *Brachiaria decumbens*, onde receberam sal mineral comercial e água *ad libitum*. Os animais eram ordenhados duas vezes ao dia e ainda, suplementados no cocho de acordo com a produção leiteira, seguindo o manejo já empregado nos currais utilizados.

4.5 Sincronização da Ovulação e IATF

Os protocolos hormonais para realização da IATF iniciaram em dia aleatório do ciclo estral, sendo este dia considerado o dia Zero (D0), no qual todas as vacas receberam um dispositivo intravaginal com 1g de progestágeno (DIB®, Coopers, São Paulo, Brasil) e aplicação intramuscular (im) de 2,0 mg de benzoato de estradiol (BE- ESTROGIN®, Biofarm, Jaboicabal-SP, Brasil). No D8 o dispositivo intravaginal foi retirado sendo aplicados 500µg de cloprostenol (CIOSIN®, Intervet Schering Plough Animal Health, São Paulo, Brasil) pela via intramuscular (im). Neste momento os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: Grupo Cipionato de Estradiol (GC; n = 56) e

grupo Benzoato de Estradiol (GB; n=52) (Figura 1). As vacas do grupo GC receberam como indutor da ovulação 1,0 mg de cipionato de estradiol im (ECP®, Pfizer, São Paulo, Brasil) no momento da remoção do dispositivo, enquanto as vacas do grupo GB receberam 1,0 mg de benzoato de estradiol im pela manhã no dia posterior (D9) (BARUSELLI, 2002). A IATF ocorreu no D10, sendo o GC inseminado na parte da manhã (48 horas após a remoção do dispositivo intravaginal) e o GB sendo inseminado na parte da tarde (60 horas após a remoção do dispositivo intravaginal). Todas as aplicações hormonais foram feitas no mesmo horário (08h00min). A inseminação artificial em tempo fixo foi realizada pela mesma pessoa em todo o experimento.

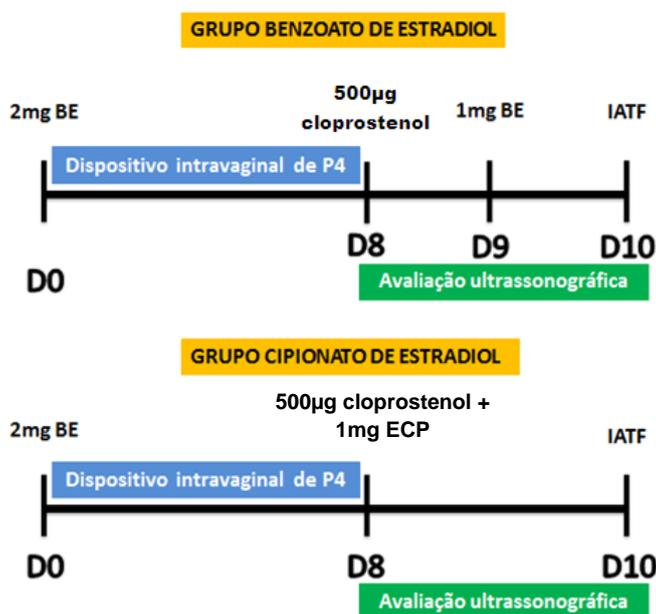


Figura 1. Protocolos hormonais dos grupos: Benzoato (GB) e Cipionato (GC).

4.6 Avaliação da Dinâmica Folicular

Os exames ultrassonográficos foram realizados pela técnica transretal com auxílio de um transdutor linear de 7,5MHz (Mindray DP2200 vet) e tiveram início a partir do D8 do protocolo de sincronização, isto é, no dia da retirada do dispositivo intravaginal. Estas avaliações foram repetidas em intervalos de 12 horas até que se completasse 24 horas após a IATF. A ovulação foi considerada na situação em que houve o desaparecimento do folículo ovulatório entre dois exames ultrassonográficos consecutivos. Estes exames foram realizados pelo mesmo operador. Em cada avaliação, o maior folículo de cada dia com diâmetro superior a quatro milímetros foi mensurado por meio de dispositivos do próprio aparelho (a imagem adequada do ovário era congelada no monitor) para acompanhamento do crescimento folicular e determinação do diâmetro máximo do folículo dominante (FD).

Os parâmetros reprodutivos avaliados foram: intervalo entre a retirada do dispositivo intravaginal de P4 e a ovulação- IRD (horas); intervalo entre a ovulação e a IATF- IOI (horas); diâmetro do maior folículo na retirada do dispositivo intravaginal de P4 (mm), ou

seja, no D8; diâmetro máximo do FD (mm) no D10; taxa de crescimento do FD-TCFD (mm/dia), sendo que a taxa de crescimento do folículo dominante foi determinada dividindo a variação observada no diâmetro folicular pelo número de dias de observação, ou seja, foi calculada pela divisão da diferença do tamanho do folículo dominante do dia 10 pelo do dia 8, dividido pelo número de dias $(D10-D8/2)$; taxa de sincronização- TS (%); taxa de ovulação- TO (%), sendo que o desaparecimento dos folículos $\geq 8,0$ mm anteriormente identificados foi considerado como indicativo de ovulação, e o horário da ovulação foi estabelecido como a hora intermediária entre o penúltimo e o último exame, no qual foi diagnosticada a ovulação; e taxa de concepção- TC (%).

4.7 Diagnóstico de Gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado por palpação retal com auxílio do aparelho de ultrassonografia acompanhado de um transdutor transretal linear de 7,5MHz (Mindray DP2200 vet), 30 dias após a inseminação.

4.8 Análise Estatística

Os dados foram analisados com o auxílio do programa BioEstat 5.3 e Minitab 18. Todos os dados foram testados para normalidade pelo Teste de Anderson-Darling com nível de significância de 5%. Para a descrição dos resultados, foram empregados os desvios padrões e as médias (média \pm desvio padrão). As diferenças entre os grupos foram testadas pelo modelo geral linear de variância (ANOVA) e pelo Teste de Kruskal-Wallis. Na análise de variância, foram analisados os efeitos das variáveis classificatórias utilização do benzoato de estradiol (GB) e do cipionato de estradiol (GC). As variáveis resposta analisadas no experimento foram: intervalo entre a retirada do dispositivo de P4 e ovulação (horas); intervalo entre a IATF e a ovulação (horas), diâmetro do FD no D10, taxa de crescimento do FD (mm/dia); taxa de sincronização, taxa de ovulação (%); e taxa de prenhez (%).

O teste do χ^2 (Qui-Quadrado), com nível de significância de 5%, foi utilizado para comparar as diferenças que implicam em proporções, como as encontradas nas taxas de sincronização, ovulação e de concepção.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados no presente trabalho para a taxa de crescimento folicular dos grupos experimentais foram 1.26 ± 1.33 e 1.14 ± 1.27 mm/dia para os grupos GB e GC, respectivamente. O diâmetro do folículo dominante medido no D10 foi de 14.06 ± 2.26 mm para o GB e de 13.11 ± 3.02 para o GC. O intervalo entre a retirada do dispositivo de progesterona e a ovulação foi de 67.91 ± 8.68 horas e 63.9 ± 10.49 horas, respectivamente para os grupos GB e GC. Já o intervalo entre a ovulação e a IATF do GB foi de 8.68 ± 6.94 horas e do GC foi de 16.05 ± 10.20 horas. Nenhum dos parâmetros avaliados acima apresentou diferença estatística, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Taxa de crescimento folicular, diâmetro do folículo dominante no D10, intervalo da retirada do dispositivo de progesterona à ovulação e IATF à ovulação, em função dos tratamentos com CE e BE.

Tratamento	Tx. Cresc. Fol. (mm/dia)	Diâm. Fol.dom. (mm)	Intervalo da ovulação	
			Retirada do dispositivo de progesterona (h)	IATF (h)
GB	1.26 ± 1.33^a (n=49)	14.06 ± 2.26^a (n=49)	67.91 ± 8.68^a (n= 47)	8.68 ± 6.94^a (n=47)
GC	1.14 ± 1.27^a (n=50)	13.11 ± 3.02^a (n=50)	63.90 ± 10.49^a (n=40)	16.05 ± 10.20^a (n=40)

GB = Grupo Benzoato; GC = Grupo Cipionato; IATF = Inseminação Artificial em Tempo Fixo.

^a letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que as médias não são diferentes entre si ($p>0,05$).

*Os dados estão apresentados em forma de Média \pm Desvio Padrão.

Estudos realizados por Borges *et al.* (2004), utilizando vacas Gir, demonstraram taxas de crescimento folicular variando de 1.2 a 1.4 mm/dia em animais que não foram submetidos a protocolos de IATF, ou seja, os resultados obtidos no presente estudo se aproximam dos valores de um ciclo estral normal de vacas Gir. Em contrapartida, Ferraz *et al.* (2013), comparando diferentes indutores de ovulação (BE x GnRH e BE+GnRH), obtiveram a melhor taxa de crescimento folicular quando utilizaram o GnRH como indutor da ovulação, obtendo o valor de $1,07 \pm 0,3$ mm em vacas Nelore, sendo que o grupo que utilizou benzoato de estradiol como indutor apresentou taxa de crescimento folicular de $0,58 \pm 0,3$ mm/dia. Tortorella *et al.* (2017), trabalhando com fêmeas *Bos taurus taurus* (vacas e novilhas), encontraram taxa de 0.49 ± 0.02 mm/8h para as vacas e ainda, 0.47 ± 0.06 mm/8h em novilhas. A taxa de crescimento do folículo dominante parece ser maior em vacas *Bos taurus taurus* (GINTHER, 2017) do que em vacas *Bos taurus indicus* (VIANA *et al.*, 2000; COUTINHO *et al.*, 2007). Os valores encontrados no presente estudo são intermediários aos encontrados na literatura podendo ser explicados uma vez que as vacas utilizadas são da raça Girolando (cruzamento entre *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*).

As variações nos valores das taxas de crescimento folicular podem ser influenciadas pelas subespécies as quais os animais pertencem (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) ou ainda, categoria animal (vacas x novilhas) (MURPHY *et al.*, 1990; FIGUEIREDO *et al.*, 1997; HADIYA *et al.*, 2016). A utilização de diferentes indutores de ovulação não pareceu ser um fator relevante na influencia da taxa de crescimento folicular. As concentrações plasmáticas de progesterona parecem ter uma influência mais expressiva do que o indutor de ovulação utilizado, como demonstra Savio *et al.* (1993) que conseguiram, pelo

acompanhamento do ciclo estral de vacas, demonstrar que altos níveis de progesterona diminuem a taxa de crescimento folicular, conseqüentemente o tamanho do folículo dominante.

Em relação ao diâmetro do folículo dominante no D10, não houve diferença significativa entre os grupos GB e GC. As médias encontradas foram respectivamente, 14.06 ± 2.26 e 13.11 ± 3.02 mm para os grupos GB e GC. Andrade *et al.* (2012), utilizando ésteres de estradiol para induzir a ovulação em fêmeas bovinas da raça Nelore, observaram que o diâmetro do folículo não diferiu entre os tratamentos que empregaram (CE no D8 x BE D9) obtendo, respectivamente, $13,03 \pm 2,24$ mm e $12,40 \pm 1,34$ mm. Assim como Sales *et al.* (2012) que encontraram diâmetros foliculares equivalentes para o tratamento com cipionato de estradiol ($13,90 \pm 0,40$ mm) e benzoato de estradiol ($13,10 \pm 0,40$ mm) para a raça Nelore. Os resultados apresentados no presente trabalhos se assemelham a outros estudos que trabalharam com vacas de aptidão leiteira como o de Franca *et al.* (2015) que, ao utilizarem vacas lactantes mestiças de Holandês x Gir, não observaram diferença em relação à média de diâmetro folicular para os animais que receberam CE no D8 ($10,71 \pm 2,43$ mm) e o BE no D9 ($11,45 \pm 2,34$ mm). Mais recentemente, estudos também com vacas mestiças obtiveram para o uso de BE e CE, respectivamente, $9,77 \pm 1,36$ mm e $10,97 \pm 1,24$ mm (RAMOS SOBREIRA *et al.*, 2017) não apresentando diferença estatística. Embora os resultados obtidos no presente trabalho demonstrem médias numericamente superiores aos estudos citados, à similaridade entre os diâmetros foliculares obtidos com a utilização de ambos os indutores da ovulação sugere que os dois foram eficazes para estimular o crescimento e ainda, obter folículos maiores que 10 mm que segundo Sartori *et al.* (2001) é um tamanho no qual já tenha capacidade de responder a ação do LH e conseqüentemente de ovular.

Os animais que não ovularam foram desconsiderados para o cálculo do intervalo entre a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona e a ovulação e o intervalo entre a ovulação e a IATF. No presente estudo, o BE produziu ovulações em um intervalo de horário similar comparado com o CE assim como demonstrado nos trabalhos de Sales e colaboradores em 2012 e Uslenghi e colaboradores em 2016. Os pesquisadores ao avaliarem as concentrações plasmáticas de 17β estradiol constataram que a aplicação do CE na retirada do implante e a aplicação de BE um dia após a retirada do implante geram perfis hormonais similares. Essa característica ocorre devido a farmacocinética dos ésteres de estradiol, o benzoato de estradiol tem uma meia vida mais curta e ainda, induz aumento da molécula biologicamente ativa (17β estradiol) de forma mais rápida, o que explica o porque de se administrar o BE um dia após a retirada do implante e não no mesmo momento.

A Tabela 2 apresenta as taxas de concepção dos diferentes indutores (benzoato e cipionato de estradiol) levando em consideração os diferentes intervalos entre a IATF e a ovulação. O GB obteve 42.8 % de concepção nas vacas que a IATF já tinha ovulado, 65.3 % no intervalo de 0-12 horas, 33.3% entre 12-24 horas e 100% no intervalo de mais de 24 horas. Para o GC os resultados foram de 100%, 62.5%, 91.6% e 36.3%, respectivamente, para as vacas que já tinham ovulado, com intervalo de 0-12 horas, 12-24 horas e com mais de 24 horas.

Tabela 2. Taxa de concepção em relação ao intervalo entre a IATF e a ovulação em vacas Girolandas inseminadas em tempo fixo.

Intervalo IATF/Ovulação (h)	Taxa de concepção (%)		Valor p
	GB (n=46)	GC (n=40)	
Ovuladas	42.86 (3/7) ^a	100 (1/1) ^a	p=0,2
0-12 horas	65.38 (17/26) ^a	62.50 (10/16) ^a	p=0,8
12-24 horas	33.33 (4/12) ^a	91.67 (11/12) ^b	p=0,03
>24 horas	100 (1/1) ^a	36.36 (4/11) ^a	p=0,2

GB = Grupo Benzoato; GC = Grupo Cipionato; IATF = Inseminação Artificial em Tempo Fixo.

a,b letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam que as médias são diferentes entre si (p<0,05).

Para análise dos dados do grupo GB foram retirados cinco animais que não ovularam e um animal que não foi encontrado para diagnóstico de gestação. No GC foram excluídos dezesseis animais que não ovularam. Foi possível constatar que houve diferença estatística entre os grupos GB e GC no intervalo da IATF a ovulação de 12-24 horas, ou seja, os animais do grupo GC que ovularam neste intervalo apresentaram maior taxa de concepção na IATF quando comparado com o GB.

Dransfield *et al.* (1998) e Roelofs *et al.* (2005) relataram em seus estudos que a chance de um animal conceber aumenta à medida que a IA se aproxima do momento da ovulação. Dessa forma, para maximizar o contato dos espermatozoides com o óvulo, a IA deve ser realizada próximo ao momento da ovulação de forma que o óvulo não envelheça à espera dos espermatozoides. A partir dos estudos citados e ainda, de outros autores, seria possível determinar que o melhor momento para a IA seria entre 16 e 26 horas antes da ovulação (HUNTER, 1994; MAATJE *et al.*, 1997; DRANSFIELD *et al.*, 1998; ROELOFS *et al.*, 2005). Portanto, a maior taxa de concepção nos intervalos de 12 a 24 horas entre IA e a ovulação para o GC se deve ao fato das vacas terem ovulado em um período mais favorável a concepção, por exemplo, no GC 57.5% das vacas ovularam após 12 horas em relação a IA, diferente do GB que 71.73% das vacas ovularam nas primeiras 12 horas após a IA. Essa ovulação mais próxima a IA provavelmente está associada a meia vida do benzoato de estradiol como já explicado anteriormente.

Os diâmetros médios do folículo no D10 para as vacas gestantes e não gestantes dos grupos GB e GC foram, respectivamente, $14.17 \pm 1.65\text{mm}$ x $13.98 \pm 2.84\text{mm}$ e $13.69 \pm 2.23\text{mm}$ x $12.41 \pm 3.66\text{mm}$, não sendo observada diferença estatística entres estes valores, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Diâmetro médio e desvio padrão do maior folículo presente no ovário dos animais avaliados no D10 em função dos tratamentos com CE e BE e do número de vacas gestantes após protocolos de inseminação artificial em tempo fixo em vacas Girolando.

Tratamento	DG	Diâmetro médio folículo \pm desvio padrão (mm)
GB (n=48)	Gestantes (n=25)	14.17 \pm 1.65 ^a
	Não gestantes (n=23)	13.98 \pm 2.84 ^a
GC (n=52)	Gestantes (n=26)	13.69 \pm 2.23 ^a
	Não gestantes (n=26)	12.41 \pm 3.66 ^a

GB = Grupo Benzoato; GC = Grupo Cipionato

a,b letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam que as médias são diferentes entre si ($p \leq 0,05$).

O sucesso nos programas de IATF pode ser influenciado por diversos fatores, dentre eles o diâmetro do folículo dominante no momento da inseminação artificial (PFEIFER *et al.*, 2015). O diâmetro do folículo no momento da IATF é um importante fator de sucesso nas taxas de concepção, pois folículos maiores contém maiores concentrações de estradiol e maior possibilidade de ovulação, conseqüentemente há um aumento nos índices de fertilidade em rebanhos sincronizados (SÁ FILHO *et al.*, 2010). Além disso, maiores folículos dão origem a um corpo lúteo de maior dimensão, elevando conseqüentemente as possibilidades de estabelecimento e da manutenção da prenhez (LONERGAN *et al.*, 2013). Dessa forma, uma elevada concentração de estradiol pré-ovulatória gerada pelo maior diâmetro do folículo ovulatório pode influenciar na fertilização das fêmeas por promover mudanças no ambiente uterino, melhorando o transporte espermático e favorecendo a concepção (SÁ FILHO *et al.*, 2010).

Diversos pesquisadores relataram em suas pesquisas a importância do diâmetro folicular no dia da inseminação relacionado a taxa de prenhez (FUJITA *et al.*, 2013; RIBEIRO FILHO *et al.*, 2013; SILVEIRA *et al.*, 2016). Silveira *et al.* (2016), trabalhando com a raça Nelore, encontraram diâmetros foliculares maiores nas vacas que conceberam (13.26mm x 10.99mm). Pfeifer *et al.* (2015) propuseram em seu artigo, como uma alternativa para melhorar a fertilidade das vacas que serão inseminadas, avaliar o tamanho do folículo no dia da IATF, a depender do tamanho em que ele se encontre seria possível aguardar mais algumas horas e atrasar a IATF, a fim de otimizar a taxa de concepção do rebanho.

O presente trabalho não observou diferença estatística entre o diâmetro folicular no dia da IATF e a taxa de concepção, uma vez que não utilizamos nenhum outro hormônio adicional com objetivo de otimizar o crescimento folicular diferente da maioria dos estudos citados. Cabe ressaltar que a maioria dos pesquisadores fizeram uso da eCG, hormônio que atua diretamente no crescimento final do folículo, gerando um folículo com maior diâmetro (BARUSELLI *et al.*, 2008; MACIEL *et al.*, 2017).

Os grupos GB e GC tiveram respectivamente, 98.07% e 96.42% de taxa de sincronização ($p > 0.05$), 90.38 % e 71.42 % de taxa de ovulação ($p < 0.05$) e 48.07% e 46.42 % de taxa de concepção ($p > 0.05$) conforme mostrado na Tabela 4.

Tabela 4. Taxas de sincronização, de ovulação e de concepção em função da utilização de BE e CE em protocolos IATF.

Parâmetros reprodutivos	GB (n=52)	GC (n=56)	Valor p
Taxa de sincronização (%)	98.08 (51/52) ^a	96.43 (54/56) ^a	P=0,6
Taxa de ovulação (%)	90.38 (47/52) ^a	71.43 (40/56) ^b	P=0,01
Taxa de concepção (%)	48.08 (25/52) ^a	46.43 (26/56) ^a	P=0,8

GB = Grupo Benzoato; GC = Grupo Cipionato

a,b letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam que as médias são diferentes entre si ($p \leq 0,05$).

Somente a taxa de ovulação apresentou diferença entre os grupos. O benzoato de estradiol apresentou uma melhor capacidade de induzir a ovulação do que o cipionato de estradiol. Essa característica pode estar associada ao fato do BE promover maiores concentrações de 17- β - estradiol na circulação sanguínea de forma mais precoce do que o CE, dessa forma contribuindo para melhores taxa de ovulação conforme discutido por SOUZA *et al.* (2005).

Apesar da diferença na taxa de ovulação, não foi observada significância estatística na taxa de concepção, este fato está relacionado possivelmente com os dados apresentados na Tabela 2, na qual as vacas do GC ovularam em um período mais propício para concepção, conseqüentemente apesar do grupo apresentar menor taxa de ovulação esta não foi suficiente para afetar a taxa de concepção, uma vez que as ovulações ocorreram em um momento mais apropriado que os animais do grupo BE.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados encontrados no presente trabalho, pode se aferir as seguintes conclusões:

O benzoato de estradiol é mais eficiente para induzir a ovulação em vacas Girolando quando comparado com o cipionato de estradiol.

O benzoato e o cipionato de estradiol podem ser utilizados com a mesma eficiência em programas de IATF para vacas Girolando em relação às taxas de sincronização e de concepção.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, G. P. *et al.* Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, p. 11, 1992. ISSN 1470-1626.
- AERTS, J.; BOLS, P. Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 7, 2010. ISSN 1439-0531.
- AMBROSE, J. *et al.* Progesterone (CIDR)-based timed AI protocols using GnRH, porcine LH or estradiol cypionate for dairy heifers: ovarian and endocrine responses and pregnancy rates. **Theriogenology**, v. 64, p. 1457-1474, 2005. ISSN 0093-691X.
- ANDRADE, B. H. D. A. *et al.* Eficiência do Cipionato de Estradiol e do Benzoato de Estradiol em Protocolos de Indução da Ovulação Sobre a Dinâmica Ovariana e Taxa de Concepção de Fêmeas Nelore Inseminadas em Diferentes Momentos. **Archives of Veterinary Science**, v. 17, p. 12, 2012. ISSN 1517-784X.
- ASSIS, A. G. *et al.* **Circular técnica 85- Sistemas de produção de leite no Brasil.** Embrapa Gado de Leite-Circular Técnica (INFOTECA-E). Juiz de Fora, MG: 6 p. 2005.
- AYRES, H. *et al.* Effect of timing of estradiol benzoate administration upon synchronization of ovulation in suckling Nelore cows (*Bos indicus*) treated with a progesterone-releasing intravaginal device. **Animal Reproduction Science**, v. 109, p. 77-87, 2008. ISSN 0378-4320.
- BALL, P. J. H.; JACKSON, P. S. The use of milk progesterone profiles for assessing the response to cloprostenol treatment of non-detected oestrus in dairy cattle. **British Veterinary Journal**, v. 140, p. 543-549, 1984/11/01/ 1984. ISSN 0007-1935. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0007193584900058> >.
- BARUSELLI, P. S. *et al.* Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. **Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, v. 3, p. 146-167, 2008.
- BEG, M.; GINTHER, O. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. **Reproduction**, v. 132, p. 365-377, 2006. ISSN 1470-1626.
- BURKE, C. *et al.* Use of a small dose of estradiol benzoate during diestrus to synchronize development of the ovulatory follicle in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 145-151, 2000. ISSN 0021-8812.
- CARVALHO, N. A. T. *et al.* Ovulation synchronization with estradiol benzoate or GnRH in a timed artificial insemination protocol in buffalo cows and heifers during the nonbreeding season. **Theriogenology**, v. 87, p. 333-338, 2017/01/01/ 2017. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X16304198> >.
- CLARKE, I. J. Interface between metabolic balance and reproduction in ruminants: focus on the hypothalamus and pituitary. **Horm Behavior**, v. 66, p. 25, 2014.

COUTINHO, G. *et al.* Avaliação ultra-sonográfica da dinâmica folicular e lútea em vacas da raça Guzerá. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 1089-1096, 2007.

DO NASCIMENTO, A. A. *et al.* Correlação morfométrica do ovário de fêmeas bovinas em diferentes estádios reprodutivos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 126-132, 2003. ISSN 1678-4456.

DO VALLE, E. R. O ciclo estral de bovinos e métodos de controle. **Embrapa Gado de Corte-Documentos (INFOTECA-E)**, 1991.

DRANSFIELD, M. B. G. *et al.* Timing of Insemination for Dairy Cows Identified in Estrus by a Radiotelemetric Estrus Detection System. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1874-1882, 1998. ISSN 0022-0302. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75758-3](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75758-3) >. Acesso em: 2017/12/13.

DRIANCOURT, M. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, p. 1211-1239, 2001. ISSN 0093-691X.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 203-216, 2003. ISSN 0378-4320.

FERRAZ, P. A. *et al.* DINÂMICA FOLICULAR E TAXA DE CONCEPÇÃO DE VACAS NELORE SINCRONIZADAS COM DIFERENTES PROTOCOLOS DE INDUÇÃO DA OVULAÇÃO. **Archives of Veterinary Science**, v. 18. 2013. ISSN 1517-784X.

FIGUEIREDO, R. *et al.* Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 1489-1505, 1997. ISSN 0093-691X.

FRANCA, L. M. *et al.* Comparison of two esters estradiol as inductors on ovulation follicular diameter and pregnancy rate of dairy cattle subject to program of FTAI. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 16, p. 958-965, 2015. ISSN 1519-9940.

FUJITA, A. S. *et al.* Taxa de gestação em novilhas nelore sincronizadas para IATF e inseminadas com sêmen resfriado e congelado. **Archives of Veterinary Science**, v. 18, 2013. ISSN 1517-784X.

GARCÍA GUERRA, A. *et al.* Lengthened superstimulatory treatment in cattle: Evidence for rescue of follicles within a wave rather than continuous recruitment of new follicles. **Theriogenology**, v. 84, p. 467-476, 2015/08/01/ 2015. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X15001818> >.

GIMENES, L. U. *et al.* Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 852-858, 2008. ISSN 0093-691X.

GINTHER, O.; KASTELIC, J.; KNOPF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 20, p. 187-200, 1989. ISSN 0378-4320.

GINTHER, O. *et al.* Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1187-1194, 1996. ISSN 0006-3363.

GINTHER, O. J. The theory of follicle selection in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 57, p. 85-99, 2016/10/01/ 2016. ISSN 0739-7240. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0739724016300753> >.

GINTHER, O. J. Variations in follicle-diameter deviation and a growth spurt in the dominant follicle at deviation in *Bos taurus* heifers. **Animal Reproduction Science**, 2017. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037843201730581X> >.

GOBIKRUSHANTH, M. *et al.* Characterization of the variability and repeatability of gonadotropin-releasing hormone-induced luteinizing hormone responses in dairy cows within a synchronized ovulation protocol. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 8, p. 6753-6762, 2017. ISSN 0022-0302. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-12529> >. Acesso em: 2017/12/14.

HADIYA, K. *et al.* FOLLICULAR DYNAMICS DURING ESTROUS CYCLE IN POSTPUBERTAL AND POSTPARTUM GIR CATTLE. **The Indian Journal of Animal Reproduction**, v. 37, 2016. ISSN 0970-2997.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. Manole, 2004. ISBN 9788520412220. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=q9fZAAAACAAJ> >.

HALBE, H. W. Ovulação. **Revista de Medicina**, v. 60, n. 2, p. 4-17, 1976. ISSN 1679-9836.

HANSEL, W.; CONVEY, E. M. Physiology of the oestrus cycle. **Journal Animal Science**, v. 57, n. 2, 1983.

HUNTER, R. H. F. Causes for Failure of Fertilization in Domestic Species. In: ZAVY, M. T. e GEISERT, R. D. (Ed.). **Embryonic mortality in domestic species**. Boca Raton : CRC Press, c1994., 1994. cap. Ch. 1, p.224. ISBN 0849376343.

IBGE, I. B. D. G. E. E.-. **Produção da pecuária municipal**. MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO, D. E. G. Brasil: IBGE. 44: 53 p. 2016.

JAISWAL, R.; SINGH, J.; ADAMS, G. Developmental pattern of small antral follicles in the bovine ovary. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 4, p. 1244-1251, 2004. ISSN 0006-3363.

LARSON, L.; BALL, P. Regulation of estrous cycles in dairy cattle: a review. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 255-267, 1992. ISSN 0093-691X.

LONERGAN, P.; O'HARA, L.; FORDE, N. Role of diestrus progesterone on endometrial function and conceptus development in cattle. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 223-227, 2013.

LUSSIER, J.; MATTON, P.; DUFOUR, J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, n. 2, p. 301-307, 1987. ISSN 1470-1626.

MAATJE, K.; LOEFFLER, S. H.; ENGEL, B. Predicting Optimal Time of Insemination in Cows that Show Visual Signs of Estrus by Estimating Onset of Estrus with Pedometers. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 6, p. 1098-1105, 1997. ISSN 0022-0302. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76035-1](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76035-1) >. Acesso em: 2017/12/13.

MACIEL, E. B. *et al.* Importância da utilização de eCG em protocolos de IATF em bovinos. **Anais da Semana do Curso de Zootecnia-SEZUS**, v. 10, n. 1, 2017. ISSN 2358-842X.

MIHM, M.; AUSTIN, E. The final stages of dominant follicle selection in cattle. **Domestic animal endocrinology**, v. 23, n. 1, p. 155-166, 2002. ISSN 0739-7240.

MONDAL, M.; BARUAHB, K. K.; PRAKASH, B. S. Determination of plasma kisspeptin concentrations during reproductive cycle and different phases of pregnancy in crossbred cows using bovine specific enzyme immunoassay. **General and Comparative Endocrinology**, v. 224, p. 7, 2015.

MURPHY, M.; BOLAND, M.; ROCHE, J. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, n. 2, p. 523-533, 1990. ISSN 1470-1626.

PANCARCI, S. *et al.* Use of estradiol cypionate in a presynchronized timed artificial insemination program for lactating dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 85, n. 1, p. 122-131, 2002. ISSN 0022-0302.

PEGORARO, L. M. C.; SAALFELD, M. H.; PRADIEÉ, J. **Inseminação artificial em bovinos**. TEMPERADO, E. C. Pelotas/RS: Embrapa Clima Temperado, Documentos, 412: 48 p. 2016.

PFEIFER, L. *et al.* Timed artificial insemination in blocks: A new alternative to improve fertility in lactating beef cows. **Animal reproduction science**, v. 163, p. 89-96, 2015. ISSN 0378-4320.

PFEIFER, L. *et al.* The use of PGF2 α as ovulatory stimulus for timed artificial insemination in cattle. **Theriogenology**, v. 81, n. 5, p. 689-695, 2014/03/15/ 2014. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X13004986> >.

PFEIFER, L. *et al.* Prostaglandin F2 α or estradiol benzoate to induce ovulation in timed artificially inseminated dairy cows. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 6, p. 738-744, 2016. ISSN 0100-204X.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Follicular populations during the estrous cycle in heifers. I. Influence of day. **Animal Reproduction Science**, v. 14, n. 3, p. 165-176, 1987/09/01/ 1987. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378432087900807> >.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Follicular populations during the estrous cycle in heifers. III. Time of selection of the ovulatory follicle. **Animal Reproduction Science**, v. 16, n. 2, p. 81-95, 1988/04/01/ 1988. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378432088900292> >.

PURSLEY, J.; MEE, M.; WILTBANK, M. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915-923, 1995. ISSN 0093-691X.

RAJAKOSKI, E. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left-right variations. **Acta endocrinologica**, v. 34, n. 3 Suppl, p. 836-838, 1960. ISSN 0804-4643.

RAMOS SOBREIRA, R. *et al.* Cipionato de estradiol e benzoato de estradiol em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo em novilhas mestiças. **Veterinária e Zootecnia**, v. 24, n. 3, p. 581-591, 2017. ISSN 2178-3764.

RATHBONE, M. J. *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. **Advanced drug delivery reviews**, v. 50, n. 3, p. 277-320, 2001. ISSN 0169-409X.

RIBEIRO FILHO, A. D. L. *et al.* Diâmetro do folículo no momento da inseminação artificial em tempo fixo e taxa de concepção em vacas Nelore. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 4, p. 501-507, 2013. ISSN 1809-6891.

ROELOFS, J. B. *et al.* Various behavioral signs of estrous and their relationship with time of ovulation in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1366-1377, 2005. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.07.009> >. Acesso em: 2017/12/13.

SÁ FILHO, M. *et al.* Resynchronization with unknown pregnancy status using progestin-based timed artificial insemination protocol in beef cattle. **Theriogenology**, v. 81, n. 2, p. 284-290, 2014. ISSN 0093-691X.

SÁ FILHO, M. F. D. *et al.* Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, v. 120, n. 1, p. 23-30, 2010. ISSN 0378-4320.

SARTORELLI, E. S. *et al.* Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, n. 9, p. 2382-2394, 2005. ISSN 0093-691X.

SARTORI, R. *et al.* Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1403-1409, 2001. ISSN 0006-3363.

SAVIO, J. *et al.* Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, n. 2, p. 663-671, 1988. ISSN 1470-1626.

SAVIO, J. *et al.* Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. **Journal of reproduction and fertility**, v. 97, n. 1, p. 197-203, 1993. ISSN 1470-1626.

SEVERO, N. C. **História ilustrada da inseminação artificial**. . São Paulo: São Paulo: Livre Expressão, 2013. 408 ISBN 978-85-7984-706-6.

SILVEIRA, R. O. *et al.* Avaliação do tamanho do folículo ovulatório e da taxa de concepção de vacas Nelore em protocolos de IATF. **ANAIS SIMPAC**, v. 6, n. 1, 2016. ISSN 2237-2490.

SINCERO RABELO DE OLIVEIRA, L. *et al.* Potencial da deslorelina como agente indutor da ovulação em vacas primíparas *Bos taurus indicus* na inseminação artificial em tempo fixo. **Veterinária e Zootecnia**, v. 24, n. 2, p. 363-372, 2017. ISSN 2178-3764.

SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Ovarian Follicular Dynamics during the Estrous Cycle in Heifers Monitored by Real-Time Ultrasonograph1. **Biology of Reproduction**, v. 39, n. 2, p. 308-317, 1988. ISSN 0006-3363. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod39.2.308> >.

SOUZA, A. *et al.* Profiles of circulating estradiol-17 β after different estrogen treatments in lactating dairy cows. **Anim. Reprod**, v. 2, n. 4, p. 224-232, 2005.

SOUZA, A. *et al.* Supplementation with estradiol-17 β before the last gonadotropin-releasing hormone injection of the Ovsynch protocol in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 10, p. 4623-4634, 2007. ISSN 0022-0302.

TORTORELLA, R. D. *et al.* Characterizing emergence and divergence in the first follicular wave in a tropically adapted *Bos taurus* breed. **Theriogenology**, v. 88, p. 9-17, 1/15/ 2017. ISSN 0093-691X. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X16304605> >.

USDA, U. S. D. O. A.-. Dairy: World markets and trade. 2016.

VIANA, J. H. M. *et al.* Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 12, p. 2501-2509, 2000. ISSN 0100-204X.

8 ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE ZOOTECNIA

COMISSÃO DE ETICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UFRRJ/IZ

DECLARAÇÃO

Declaro que o projeto intitulado O projeto “Uso de diferentes indutores de ovulação sobre a dinâmica folicular e a taxa de concepção de vacas leiteiras inseminadas em tempo fixo.”, processo nº 23083.024213/2017-14, coordenado pelo Prof. Dr. Marco Roberto Bourg de Mello está de acordo com as normas do uso de animais em atividades de ensino e pesquisa do CONCEA e foi aprovado pela CEUA/UFRRJ/IZ.

Seropédica, 4 de outubro de 2017

A handwritten signature in blue ink that reads "Rodrigo Vasconcelos de Oliveira". The signature is written over a horizontal line.

Prof. Rodrigo Vasconcelos de Oliveira

Coordenador da CEUA-IZ

Prof. Rodrigo V. de Oliveira
DPA / IZ / UFRRJ
STAPE: 2142739