



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FÁBIO MOROTTI

**DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA DE VACAS NELORE  
(*Bos indicus*) SINCRONIZADAS COM PROTOCOLO DE IATF  
À BASE DE PROGESTERONA INJETÁVEL**

---

Londrina/PR  
2013

FÁBIO MOROTTI

**DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA DE VACAS NELORE  
(*Bos indicus*) SINCRONIZADAS COM PROTOCOLO DE IATF  
À BASE DE PROGESTERONA INJETÁVEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal).

**Orientador:** Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda.

Londrina/PR  
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

M869d Morotti, Fábio.

Dinâmica folicular ovariana de vacas nelore (*Bos indicus*) sincronizadas com protocolo de IATF à base de progesterona injetável / Fábio Morotti. – Londrina, 2013.  
67 f. : il.

Orientador: Marcelo Marcondes Seneda.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2013.  
Inclui bibliografia.

1. Bovino – Inseminação artificial – Teses. 2. Hormônios progestacionais – Teses. 3. Ovulação – Vaca – Teses. 4. Reprodução animal – Teses. 5. Nelore (Zebu) – Teses. I. Seneda, Marcelo Marcondes. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 636.082.45

FÁBIO MOROTTI

**DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA DE VACAS NELORE (*Bos indicus*) SINCRONIZADAS COM PROTOCOLO DE IATF À BASE DE PROGESTERONA INJETÁVEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal).

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Guilherme de Medeiros Bastos  
UNICENTRO – Guarapuava - PR

---

Prof. Dr. Thales Ricardo Rigo Barreiros  
UNOPAR – Londrina - PR

---

Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda  
UEL – Londrina - PR

Londrina, 23 de Março de 2013.

O presente trabalho foi realizado junto ao Laboratório de Reprodução Animal (REPROA), Departamento de Clínicas Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Produção Animal), sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto a:

- 1. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC**
- 2. Fazenda Santa Edwiges / Iby Yaú - PY**

À Deus.

Aos meus pais Onivaldo Batista Morotti e Dizolina Caldato Morotti.

Aos meus avós paternos Sebastião Morotti e Benedita Piedade Morotti.

Aos meus avós maternos Oscar Caldato e Aparecida de Moraes Caldato.

Aos meus irmãos Cristiane Aparecida Morotti e Flávio Henrique Morotti.

Ao meu afilhado Pedro Henrique Morotti Vendramini.

A minha namorada Elis Lorenzetti.

Enfim, a toda minha família.

## AGRADECIMENTOS

---

À Deus, fonte imensurável de amor, criador do mundo e de todas as maravilhas, por ter me dado a vida e por iluminar meus passos.

Ao professor e orientador Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda, pela amizade, pelo exemplo de dedicação e profissionalismo. Agradeço pela oportunidade, orientação e paciência.

Aos membros da banca de qualificação: Dra. Livia Aires Lisboa, Prof. Dr. Thales Ricardo Rigo Barreiros e Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda, pelas importantes sugestões e contribuições. Aos membros da banca de defesa Prof. Dr. Guilherme de Medeiros Bastos Prof. Dr. Thales Ricardo Rigo Barreiros e Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal pela formação acadêmica científica e de modo especial ao Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri, pelo constante esforço em melhorar a estrutura do Programa de Pós-Graduação da UEL.

À secretária Helenice, pela paciência e ajuda.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado.

Ao técnico de laboratório Paulo do Nascimento “Paulão” pelo ensinamento, incentivo, amizade e momentos de descontração.

A todos os amigos e companheiros de Pós-graduação pelas conversas, risadas e bons momentos vividos.

A toda minha família, mas de modo especial aos meus pais (Onivaldo e Dizolina), pelo exemplo de honestidade, de bondade, de vida e pela luta constante em prol da minha formação e educação. Agradeço por entenderem as minhas escolhas e compreenderem que muitas vezes a privação do tempo para o convívio diário seria necessária para minha formação. Sem dúvida, todas as conquistas do passado, do presente e do futuro pertencem a vocês.

Aos meus irmãos Cristiane Aparecida Morotti e Flávio Henrique Morotti pelos momentos inesquecíveis que vivemos e continuaremos vivendo juntos. Ao meu afilhado e sobrinho, Pedro Henrique Morotti Vendramini, pelos carinhos e ensinamentos demonstrados em cada choro, gesto, fala e olhar.

Ao carreirinha pela amizade e companheirismo.

A minha namorada Elis Lorenzetti, pela compreensão, carinho, amizade, companheirismo e apoio nas decisões mais difíceis durante esses 8 anos de muito amor e cumplicidade. A toda sua família pelo carinho e amizade.

A todos os companheiros e amigos do Laboratório de Reprodução Animal.

Aos amigos e companheiros Willian, Flavio, Jefferson e a toda equipe da Fazenda Santa Edwiges pela ajuda que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos amigos Gustavo e Katia pela amizade sincera, convívio, companheirismo e conselhos ao longo destes períodos que trabalhamos, convivemos e nos divertimos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

**Muito obrigado!**

“Dois importantes fatos, nesta vida, saltam aos olhos; primeiro, que cada um de nós sofre inevitavelmente derrotas temporárias, de formas diferentes, nas ocasiões mais diversas. Segundo, que cada adversidade traz consigo a semente de um benefício equivalente. Ainda não encontrei homem algum bem-sucedido na vida que não houvesse antes sofrido derrotas temporárias. Se 'derrotas' acontecerem, que elas não nos abalem. Antes, sejam encaradas como um aprendizado, na conquista de vitórias. Sempre é tempo de recomeçar. Quem caminha descalço não deve semear espinhos”.  
(Andrew Carnegie a Napoleon Hill e G. Hebert).

MOROTTI, Fábio. **Dinâmica folicular ovariana de vacas Nelore (*Bos indicus*) sincronizadas com protocolo de IATF à base de progesterona injetável**. 2013. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, Área de Concentração: Produção Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2013.

## RESUMO

Com objetivo de comparar a dinâmica folicular ovariana de vacas Nelore (*Bos indicus*) sincronizadas com protocolo de IATF à base de progesterona (P4) injetável *versus* dispositivo intravaginal, foram conduzidos dois experimentos. No experimento I foram utilizadas 36 vacas múltiparas entre 45 e 60 dias no pós-parto. Aleatoriamente, 20 animais receberam um dispositivo intravaginal com 1 g de P4 e administração de 2 mg de benzoato de estradiol (BE) por via intramuscular (IM) no D0. No D8 o dispositivo foi retirado e 500 µg de cloprostenol, 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) e 1 mg de cipionato de estradiol (CE) foram administrados IM. A IATF foi realizada no D10. Outras 16 vacas receberam no D0 350 mg de P4 injetável (300 mg por via subcutânea e 50 mg IM) e 2 mg de BE IM. No D6, 500 µg de cloprostenol, 300 UI de eCG e 1 mg de CE foram administradas IM. A IATF foi realizada no D8. No experimento II, 44 vacas (22 com e 22 sem corpo lúteo - CL) foram alocadas em um esquema fatorial 2x2 com a P4 injetável e o dispositivo intravaginal. Vinte duas vacas (11 com e 11 sem CL) receberam o mesmo protocolo com dispositivo intravaginal descrito acima, onde o CE foi substituído por 1 mg de BE no D9. Outras 22 vacas (11 com e 11 sem CL) também foram sincronizadas com o mesmo protocolo injetável descrito acima e o CE foi substituído por 1 mg de BE no D7. Ultrassonografias foram realizadas para determinar a dinâmica folicular. No experimento I, 65% (13/20) das vacas que receberam o dispositivo e 75% (12/16) do grupo injetável apresentaram folículos  $\geq 5$  mm no D4 ( $p>0,05$ ). A taxa média de crescimento folicular foi de  $0,92\pm 0,25$  e  $1,06\pm 0,45$  mm/dia para os grupos dispositivo e injetável, respectivamente ( $p>0,05$ ). O diâmetro médio do folículo dominante (FD) na IATF foi de  $11,4\pm 1,4$  e  $10,8\pm 1,8$  mm para os grupos dispositivo e injetável, respectivamente ( $p>0,05$ ). O diâmetro médio do folículo ovulatório (FO) foi de  $12,1\pm 1,4$  e  $12,3\pm 1,6$  mm para as vacas que receberam dispositivo e P4 injetável, respectivamente ( $p>0,05$ ). A ovulação ocorreu em 90% (18/20) do grupo com dispositivo intravaginal e 37,5% (6/16) do grupo com P4 injetável ( $p<0,05$ ). O grupo com dispositivo apresentou diâmetro médio de CL de  $18,7\pm 4,3$  mm e o injetável  $17,7\pm 3,6$  mm ( $p>0,05$ ). No experimento II, vacas com ou sem CL, tratadas com P4 injetável ou dispositivo intravaginal apresentaram taxa de folículos  $\geq 5$  mm no D4, taxa de crescimento folicular, taxa de demonstração de estro, diâmetro do FD na IATF e diâmetro do CL semelhantes. Animais sincronizados com dispositivo intravaginal apresentaram maior diâmetro do FD na IATF ( $11,7 \pm 2,0$  mm) e do FO ( $11,8\pm 1,7$  mm) comparado com aqueles que receberam P4 injetável ( $9,7\pm 1,7$  e  $10,6\pm 1,8$  mm, respectivamente); ( $p<0,05$ ). A ausência ou a presença de CL em vacas sincronizadas com dispositivo intravaginal, e a presença de CL em animais tratados com P4 injetável mostraram maior diâmetro do FO ( $12,4\pm 1,3$  ou  $12,1\pm 1,2$  e  $12,1\pm 1,2$  mm, respectivamente) em comparação com aquelas sem CL tratadas com P4 injetável ( $10\pm 2,0$  mm); ( $p<0,05$ ). A ovulação ocorreu em 59% (13/22) das vacas com CL, 77,2% (17/22) dos animais sem CL, 90,9% (20/22) dos tratados com dispositivo intravaginal e 45,5% (10/22) dos sincronizado com P4 injetável ( $p<0,05$ ). Vacas sem CL sincronizadas com dispositivo intravaginal apresentaram melhor taxa de ovulação (100%, 11/11) comparado com a P4 injetável, sem CL (54,5%; 6/11) e com CL (36,3%; 4/11); ( $p<0,05$ ). A taxa de prenhez foi maior no grupo do dispositivo intravaginal (45,4%; 10/22) em relação ao grupo de P4 injetável (18,1%; 4/22); ( $p=0,05$ ). Vacas sincronizadas com protocolo de IATF a base de P4 injetável apresentaram dinâmica folicular ovariana semelhante àquelas que receberam o dispositivo intravaginal. Entretanto, a taxa de ovulação e de prenhez foram inferiores nos grupos com a P4 injetável, possivelmente por diferença individual sobre o metabolismo da P4, resultando em níveis variáveis de LH.

**Palavras-chave:** *Bos indicus*. Ultrassonografia. Crescimento folicular. Ovulação e folículo dominante.

MOROTTI, Fábio. **Ovarian follicular dynamics of Nelore (*Bos indicus*) cows synchronized with injectable progesterone-based FTAI protocol**. 2013. 67f. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2013.

## RESUMO

Two experiments were conducted to compare the ovarian follicular dynamics of Nelore (*Bos indicus*) synchronized with FTAI protocol with injectable progesterone (P4) *versus* intravaginal device. In the experiment I, 36 multiparous cows 45-60 days post-partum were used. Twenty cows received an intravaginal device with 1 g of P4 and administration of 2 mg estradiol benzoate (EB) intramuscularly (IM) on D0. The device was removed on D8, followed by administration of 500 µg of cloprostenol, 300 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG) and 1 mg of estradiol cypionate (EC), IM. FTAI was performed on D10. In the injectable group, 350 mg of P4 (300 mg subcutaneously and 50 mg IM) and 2 mg of EB IM were administered on D0 to 16 cows. On D6, 500 µg of cloprostenol, 300 IU of eCG and 1 mg of EC were administered IM. FTAI was performed on D8. In the experiment II, 22 cows (11 with and 11 without corpus luteum - CL) received the same protocol with intravaginal device above, but the EC was replaced by 1 mg of EB on D9. Other 22 cows (11 with and 11 without CL) were synchronized with same protocol injectable P4 above, where the EC was replaced by 1 mg EB on D7. Ultrasonography was performed to determine follicular dynamics. In the experiment II, 65% of cows from the device group (13/20) and 75% from the injectable group (12/16) showed follicles  $\geq 5$  mm on D4 ( $p>0.05$ ). The average rate of follicular growth was  $0.92\pm 0.25$  and  $1.06\pm 0.45$  mm/day for the device group and injectable, respectively ( $p>0.05$ ). The average diameter of the dominant follicle (DF) at FTAI was  $11.4\pm 1.4$  mm for the device group and  $10.8\pm 1.8$  mm for the injectable group ( $p>0.05$ ). The average diameter of the ovulatory follicles (OF) was  $12.1\pm 1.4$  and  $12.3\pm 1.6$  mm for the device group and injectable, respectively ( $p>0.05$ ). The ovulation occurred in ninety percent of the device group (18/20) and in 37.5% of the injectable group (6/16); ( $p<0.05$ ). The average diameter of the CL was  $18.7\pm 4.3$  mm for the device group and  $17.7\pm 3.6$  mm for the injectable group. In the experiment II, cows with or without CL, treated with injectable P4 or intravaginal device showed similar follicles  $\geq 5$  mm on D4, rate of follicular growth, rate of behavioral estrus and diameter of CL ( $p>0.05$ ). Animals synchronized with an intravaginal device showed larger diameter of the DF at FTAI ( $11.7\pm 2.0$  mm) and OF ( $11.8\pm 1.7$  mm) than those received injectable P4 ( $9.7\pm 1.7$  and  $10.6\pm 1.8$  mm, respectively); ( $p<0.05$ ). Absence or presence of CL in cows synchronized with intravaginal device and the presence of CL in animals treated with injectable P4 showed better diameter of OF ( $12.4\pm 1.3$  or  $12.1\pm 1.2$  and  $12.2\pm 1.4$  mm, respectively) compared with those without CL treated with injectable P4 ( $10\pm 2.0$  mm); ( $p<0.05$ ). The ovulation occurred in 59% (13/22) of cows with CL, 77.2% (17/22) of animals without CL, 90.9% (20/22) of treated with intravaginal device and 45.5% (10/22) of synchronized with injectable P4 ( $p<0.05$ ). Cows without CL synchronized with intravaginal device showed better ovulation rate (100%, 11/11) than those treated with injectable P4, without CL (54.5%, 6/11) and with CL (36.3%, 4/11); ( $p<0.05$ ). The pregnancy rate was larger in the intravaginal device group (45.4%, 10/22) compared to injectable P4 groups (18.1%, 4/22); ( $p=0.05$ ). Cows synchronized with injectable P4-based FTAI protocol showed similar ovarian follicular dynamics to those treated with intravaginal device. However, the ovulation and pregnancy rates were lower in the injectable groups, possibly due to individual difference on P4 metabolism, resulting in variables levels of LH.

**Keywords:** *Bos indicus*. Ultrasonography. Follicular growth. Ovulation. Dominant follicle.

<b>Fig.1</b>	Representação esquemática do padrão de secreção do FSH (linha azul), LH (linha verde), P <sub>4</sub> (linha laranja) e do crescimento de folículos ovarianos durante o ciclo estral em bovinos. Cada onda de crescimento folicular é precedida por um aumento transitório das concentrações de FSH. Folículos saudáveis em crescimento (amarelo), folículos atrésicos (vermelho). Um aumento nos níveis de LH e FSH ocorrem no início do estro e induzem a ovulação. O padrão de secreção de LH durante um intervalo de impulsos de oito horas no início da fase lútea (maior frequência e menor amplitude), no meio da fase lútea (menor frequência e maior amplitude) e na fase folicular (alta frequência e oscilação) está indicado no topo do esquema.....	21
<b>Fig. 2</b>	Esquema ilustrativo da luteólise. PGF <sub>2α</sub> liberada pelo endométrio uterino é transferida da veia uterina para a artéria ovariana através do mecanismo de contracorrente.....	25
<b>ARTIGO I - Ovarian follicular dynamics of Nelore (<i>Bos indicus</i>) cows subjected to a fixed-time artificial insemination protocol with injectable progesterone</b>		
<b>Fig. 1</b>	Schema of the FTAI protocol used for cows that received the intravaginal P4 device, including a schedule of ultrasound evaluations. ....	46
<b>Fig. 2</b>	Schema of the FTAI protocol used for cows that received the injectable P4, including a schedule of ultrasound evaluations.....	47
<b>Fig. 3</b>	The average rate of follicular growth of Nelore cows synchronized by injectable P4 (---) or intravaginal P4 device (—), p=0.248.....	49

**ARTIGO I - Ovarian follicular dynamics of Nelore (*Bos indicus*) cows subjected to a fixed-time artificial insemination protocol with injectable progesterone**

**Tabela 1** Average diameter of the dominant follicle (DF) at FTAI, ovulatory follicle (OF) and corpus luteum (CL) of Nelore cows synchronized with protocol-based injectable P4 or intravaginal P4 device. .... 50

**ARTIGO II - Fixed-time artificial insemination with injectable progesterone: Ovarian follicular dynamics and pregnancy rates of Nelore (*Bos indicus*), with and without corpus luteum**

**Tabela 1** Follicular dynamics data and pregnancy of Nelore cows, without or with CL, synchronized with protocol-based injectable P4 or intravaginal device..... 61

**Table 2** - Average of diameter of the ovulatory follicle and ovulation rate of Nelore cows, with or without CL, synchronized with protocol-based injectable P4 or intravaginal device..... 62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

ANOVA	-	Análise de variância / Analysis of variance
BCS	-	Body condition score
BE	-	Benzoato de estradiol
CE	-	Cipionato de estradiol
CL	-	Corpo lúteo / Corpus luteum
D	-	Dia / Day
DF	-	Dominant follicle
E2	-	Estrógeno / Estradiol
EB	-	Estradiol benzoate
EC	-	Estradiol cypionate
ECC	-	Escore de condição corporal
eCG	-	Gonadotrofina coriônica equina / Equine chorionic gonadotropin
FD	-	Folículo dominante
FO	-	Folículo ovulatório
FSH	-	Hormônio folículo estimulante / Follicle-stimulating hormone
FTAI	-	Fixed-time artificial insemination
GnRH	-	Hormônio liberador de gonadotrofina / Gonadotropin releasing hormone
IA	-	Inseminação artificial
IATF	-	Inseminação artificial em tempo fixo
IGF	-	Fator de crescimento insulínico
IM / im	-	Intramuscular / Intramuscularly
INF $\tau$	-	Interferon-tau
LH	-	Hormônio luteinizante / Luteinizing hormone
M	-	Mean
mg	-	Miligramas
mL	-	Mililitros
OF	-	Ovulatory follicle
P4	-	Progesterona / Progesterone
PGF2 $\alpha$	-	Prostaglandina F2 Alfa
SC / sc	-	Subcutânea / Subcutaneously
SD	-	Standard deviation
UI	-	Unidades internacionais

---

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1	FOLICULOGÊNESE .....	17
2.2	CICLO ESTRAL BOVINO .....	18
2.2.1	Regulação Endócrina do Ciclo Estral Bovino .....	19
2.2.2	Dinâmica Folicular Ovariana.....	21
2.2.3	Função do Corpo Lúteo Durante o Ciclo Estral .....	24
2.2.4	Comportamento de Estro .....	25
2.3	ANESTRO NO PÓS-PARTO.....	26
2.4	CONTROLE DA DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA EM PROGRAMAS DE IATF .....	28
2.4.1	Sincronização da Emergência da Onda de Crescimento Folicular .....	29
2.4.2	Controle da Fase Progesterônica do Ciclo Estral .....	30
2.4.2.1	Estrógenos .....	30
2.4.2.2	Prostaglandina .....	31
2.4.2.3	Progesterona ou progestágenos .....	31
2.4.2.3.1	<i>Progesterona injetável</i> .....	33
2.4.3	Indução Sincronizada da Ovulação .....	33
2.4.4	Uso do eCG nos Protocolos de IATF .....	34
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	35
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	42
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	43
4.1	GERAL .....	43
4.2	ESPECÍFICOS.....	43
<b>5</b>	<b>ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	44
	<b>ARTIGO I - Original paper</b> .....	44
	<b>1 Introduction</b> .....	44
	<b>2 Materials and Methods</b> .....	45

<i>2.1. Site, animals and feed management</i> .....	45
<i>2.2. Animal selection</i> .....	46
<i>2.3. Experimental design</i> .....	46
<i>2.4. Follicular dynamics</i> .....	47
<i>2.5. Parameters evaluated and statistical analyses</i> .....	48
<b>3. Results</b> .....	48
<b>4. Discussion</b> .....	50
<b>References</b> .....	53
<b>ARTIGO II - Original paper</b> .....	55
<b>1. Introduction</b> .....	56
<b>2. Materials and Methods</b> .....	56
<i>2.1. Site, animals and feed management</i> .....	56
<i>2.2. Animal selection</i> .....	57
<i>2.3. Experimental design</i> .....	57
<i>2.4. Follicular dynamics</i> .....	58
<i>2.5. Parameters evaluated and statistical analyses</i> .....	58
<b>3. Results and Discussion</b> .....	59
<b>References</b> .....	64
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	67

## 1 INTRODUÇÃO

---

O Brasil possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo (FAO, 2010) com um montante superior a 200 milhões de cabeças (IBGE, 2009) e das quais, 80 a 85% são compostas por raças zebuínas e cruzamentos. Considerando o plantel zebuínio brasileiro, 90% correspondem a animais da raça Nelore (ABIEC, 2013), que se encontram distribuídos por todo território nacional e são considerados altamente adaptados as nossas condições de clima e sob pastejo.

Estima-se que 50% do rebanho bovino brasileiro compreendem fêmeas em fase reprodutiva, e das quais, menos que 12% são inseminadas artificialmente (ASBIA, 2011). Tal cenário ilustra claramente o potencial que o Brasil possui para expansão desta biotecnologia da reprodução, tornando evidente à necessidade de investimento em tecnologia, ciência e intensificação dos sistemas para proporcionar simplificação da mão de obra e maximizar a produção animal.

As biotecnologias da reprodução, tais como a inseminação artificial (IA) e a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) surgem como instrumento fundamental no arranque deste setor, favorecendo a seleção, a multiplicação e a disseminação de animais de alta genética e elevado potencial produtivo. Neste aspecto, a IA se destaca por ser a biotecnologia mais empregada no mundo. Entretanto, sua aplicação, principalmente no rebanho zebuínio, sofre algumas restrições devido a particularidades reprodutivas, como por exemplo, estro de curta duração e elevado percentual de manifestação de estro noturno (MIZUTA, 2003), o que compromete a detecção de estro em tempo hábil para IA (BARUSELLI et al., 2004a).

Com o surgimento dos programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), a detecção de estro deixou de ser um problema e a IATF passou a ser amplamente empregada por controlar o momento da ovulação e permitir a inseminação de um grande número de fêmeas em um tempo pré-determinado, dispensando detecção do estro, otimizando tempo, trabalho, recursos financeiros e proporcionando maiores taxas de gestação quando comparada a IA (LAMB, 2004). Desde então, uma ampla variedade de protocolos específicos para cada categoria, tem sido desenvolvido a fim de minimizar cada vez mais o manejo, custos e proporcionar melhores resultados de prenhez.

Na maioria dos programas de IATF em bovinos, os progestágenos constituem a principal base hormonal para sincronização do ciclo estral, seja na forma de

dispositivo intravaginal, implante auricular ou administração via oral. Embora resultados satisfatórios sejam alcançados com protocolos de IATF utilizando estas fontes de progesterona ( $P_4$ ), todo avanço para facilitar o manejo, minimizar o serviço e reduzir os custos, são bem vindos diante dos constantes avanços na biotecnologia da reprodução.

Neste aspecto, a utilização de uma fonte de  $P_4$  injetável no controle do ciclo estral dos bovinos, representaria uma significativa evolução no campo de desenvolvimento dos protocolos de IA, IATF e de outras biotecnologias da reprodução. Poucos trabalhos tem investigado o efeito da  $P_4$  injetável no controle do ciclo estral de bovinos (CHRISTIAN; CASIDA, 1948; ULBERG; LINDLEY, 1960; FIKE et al., 1999) e até o momento não há trabalhos que relatam o uso isolado da  $P_4$  injetável nos programas de IATF em bovinos.

São necessários novos estudo para avaliar os efeitos da  $P_4$  injetável no controle do ciclo estral de bovinos, principalmente no sentido de comparar com os atuais dispositivos ou implantes de  $P_4$ . O uso da  $P_4$  injetável apresenta algumas vantagens em relação aos dispositivos intravaginais ou implantes auriculares, como por exemplo: redução na mão de obra, dispensando as práticas de colocar, retirar e lavar os dispositivos/implantes; fácil empregabilidade, com única aplicação parenteral no dia 0 do protocolo; benefícios sanitários, evitando quadros de vaginites/vulvovaginites e menor custo, por dispensar o uso de materiais para elaboração dos dispositivos/implantes.

A dinâmica folicular representa um dos aspectos mais importantes da fisiologia ovariana. Através da ultrassonografia é possível conhecer o comportamento das ondas de crescimento folicular, favorecendo a avaliação e execução de programas de IA, de IATF, de superovulação e transferência de embrião (SILVA et al., 2001), além de permitir o entendimento das particularidades e da fisiologia reprodutiva.

Diante do contexto levantado, o presente trabalho tem investigado os aspectos da dinâmica folicular ovariana de vacas Nelore sincronizadas com protocolo de IATF à base de  $P_4$  injetável. Pesquisas como esta são importante por proporcionar maior conhecimento e por contribuir com maior emprego da IA e IATF, beneficiando a pecuária nacional, favorecendo a competitividade no mercado e a consolidação do Brasil no cenário mundial.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

---

### 2.1 FOLICULOGÊNESE

A foliculogênese é o processo de desenvolvimento folicular caracterizado pela formação, pelo crescimento e pela maturação dos folículos ovarianos, sendo controlada por fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos (MAGALHÃES, 2009). Neste processo, os folículos primordiais são ativados e se desenvolvem até folículos pré-ovulatórios. Simultaneamente, há crescimento e diferenciação do oócito, e da camada de células da granulosa (ADAMS; JAISWAL, 2008).

O ovário é o órgão responsável pela produção de oócitos (gametogênese), capazes de serem fertilizados e pela produção de hormônios esteróides (esteroidogênese), necessários para a fertilização e gestação (HANSENY, 2007). O folículo é a estrutura primordial do ovário, e é composto por um oócito envolto por uma ou mais camadas de células somáticas (SENEDA et al., 2008; AERTS; BOLS, 2010).

Considerando o desenvolvimento folicular, a população ovariana pode ser dividida em folículos pré-antrais (folículos primordiais, primários e secundários) e antrais (folículos terciários e pré-ovulatórios). Os folículos pré-antrais representam 90% da população folicular ovariana (SAUMANDE, 1991) sendo responsáveis pela renovação contínua dos folículos antrais (GUILBAULT et al., 1986).

Durante o desenvolvimento embrionário, células germinativas migram do saco vitelínico para as cristas gonadais e por sucessivas mitoses dão origem as oogônias (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Posteriormente, as oogônias são circundadas por células somáticas do mesonefron e formam estruturas chamadas cordões corticais, precursores dos folículos primordiais (SILVA, 2009). As oogônias diferenciam-se em oócitos, os quais, associados com as células da granulosa, constituem os folículos primordiais (ADAMS; JAISWAL, 2008; AERTS; BOLS, 2010). Os oócitos iniciam o processo de divisão meiótica, o qual é interrompido na prófase da meiose I. Esta quiescência persiste até o recrutamento folicular (SOTO-SUAZO; ZORN, 2005; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

Embora o mecanismo de recrutamento folicular não esteja completamente elucidado, acredita-se que o número de folículos primordiais recrutado é controlado por fatores intraovarianos (HAFEZ; HAFEZ, 2004) independentemente, da ação das gonadotrofinas (ROCHE, 1996). A fase de transição do folículo primordial para folículo

primário é caracterizada pelo crescimento ou ativação do folículo primordial. Esta fase é acompanhada pela proliferação e diferenciação de células da granulosa, cuja forma anteriormente pavimentosa adquire conformação cubóide (ADAMS; JAISWAL, 2008; AERTS; BOLS, 2010). Nesta fase, também há o início da formação da zona pelúcida que permanece por todo o desenvolvimento folicular até a fase inicial de desenvolvimento embrionário.

Com o aumento do oócito, o folículo secundário se forma, sendo caracterizado pela zona pelúcida, pela presença das primeiras células da teca e pelo menos duas camadas da granulosa. Ao fim deste estágio, a ação gonadotrófica já pode ser detectada, sendo iniciados amplos efeitos do hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH); (VAN DEN HURK et al., 2000).

Com o crescimento folicular, há a formação da cavidade antral (folículos antrais); (ADAMS; JAISWAL, 2008; AERTS; BOLS, 2010) constituída por líquido folicular originado principalmente da transudação do plasma periférico, através da membrana folicular basal (YOUNGQUIST; THRELFALL, 2007). Este evento fisiológico importante precede o processo de dominância folicular.

Os folículos antrais compreendem os folículos terciários (subordinados e dominantes) e pré-ovulatórios. Estes folículos são constituídos por um oócito circundado pela corona radiata e pelas células do *cumulus* que conectam o oócito às células da granulosa, além das células tecais e uma cavidade contendo o líquido folicular (SANTOS et al., 2008; AERTS; BOLS, 2010). Nesta fase a proliferação celular é dependente da ação de gonadotrofinas (SENEDA et al., 2010).

A ação gonadotrófica intensifica-se durante a fase antral. A presença do líquido folicular possibilita estudos ultrassonográficos, permitindo o acompanhamento *in vivo* do folículo até seu destino final, a atresia ou a ovulação. O curso constante desses eventos ao longo da vida pós-natal leva ao declínio progressivo do número de oócitos (SENEDA et al., 2010).

## 2.2 CICLO ESTRAL BOVINO

Os bovinos domésticos (*Bos indicus* e *Bos taurus*) são considerados animais poliéstricos anuais e exibem o comportamento estral aproximadamente a cada 21 dias (ROCHE, 1996).

O ciclo estral representa um padrão cíclico de atividade ovariana que permite as fêmeas em período reprodutivo mudarem de uma condição de não receptividade a receptividade, acasalamento e posterior progresso gestacional (FORDE et al., 2011). Primariamente, o ciclo estral surge durante a puberdade, em novilhas taurinas ao redor de seis a 12 meses de idade ou quando a fêmea atinge 40 a 50% do peso corporal adulto (YOUNGQUIST; THRELFALL, 2007) e em novilhas zebuínas ao redor de 15 a 18 meses de idade ou quando atinge de 60 a 70% do peso corporal adulto (NOGUEIRA, 2006).

Durante o ciclo estral, há duas ou três ondas de crescimento folicular ovariana (GINTHER et al., 1989). Cada onda consiste em um período de emergência de um grupo de folículos, seleção de um folículo dominante (FD) e atresia ou ovulação do FD (FORDE et al., 2011). Estas ondas de crescimento folicular, inicialmente estabelecida durante o período pré-puberal, ocorrem durante todo o ciclo estral com a maturação e a ovulação apenas do FD (YOUNGQUIST; THRELFALL, 2007).

Em bovinos o ciclo estral possui uma duração normal de 18 a 24 dias, sendo constituído por duas fases: a fase lútea ou progesterônica com duração de 14 a 18 dias e a fase folicular ou estrogênica com duração de quatro a seis dias. A fase lútea, também denominada de fases de metaestro e diestro, compreende o período seguinte à ovulação, ou seja, período em que o corpo lúteo (CL) é formado. A fase folicular, também designada de fases de pró-estro e estro, compreende o período após o desaparecimento do CL (luteólise) até o momento da ovulação. É nesta fase que ocorre a maturação final e a ovulação do folículo pré-ovulatório, promovendo a liberação do oócito no oviduto para fertilização (FORDE et al., 2011).

### 2.2.1 Regulação Endócrina do Ciclo Estral Bovino

Nos bovinos, as funções ovarianas como recrutamento e crescimento folicular, ovulação, luteinização e luteólise são reguladas pelos hormônios hipotalâmicos (Hormônio liberador de gonadotrofinas - GnRH), hipofisários (FSH e LH), ovarianos ( $P_4$ , Estradiol -  $E_2$  e Inibinas) e uterinos (Prostaglandina -  $PGF_{2\alpha}$ ). Estes hormônios funcionam por meio de um sistema de *feedback* positivo e negativo para controlar o ciclo estral (ROCHE, 1996; CROWE, 2008; FORDE et al., 2011).

No controle do ciclo estral, o papel do GnRH está fundamentado em ações sobre a hipófise anterior ou adeno-hipófise, promovendo a liberação de gonadotrofinas produzidas na hipófise posterior ou neuro-hipófise (FORDE et al., 2011). Após o transporte

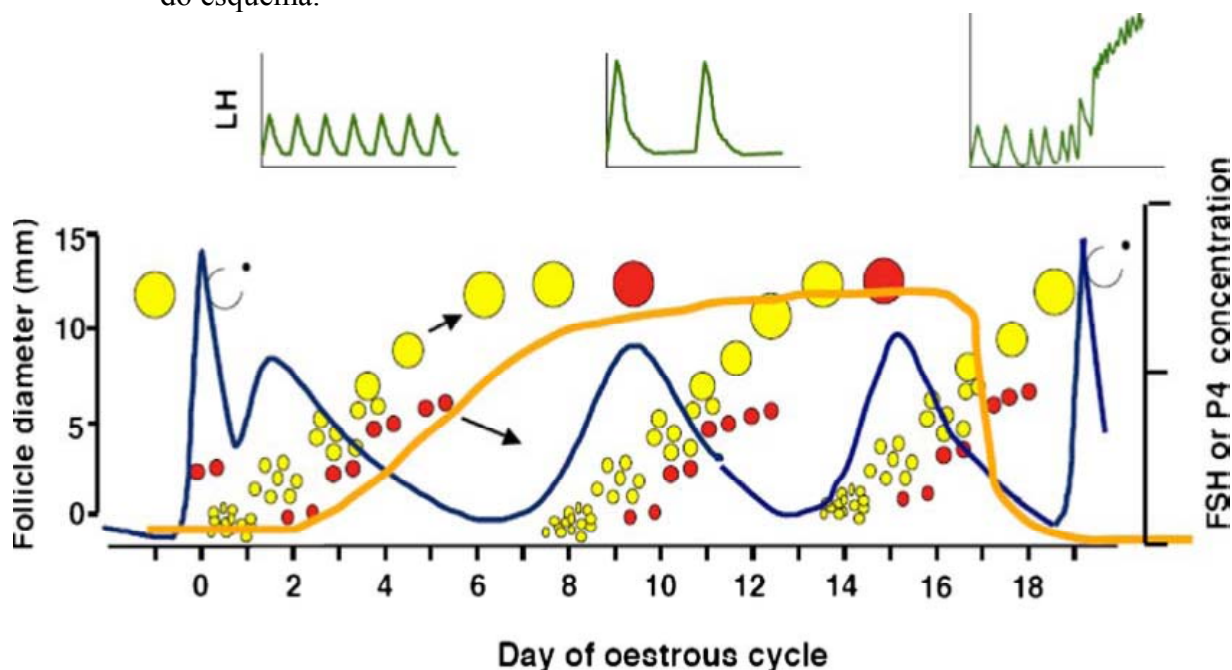
do GnRH no sistema porta hipotalâmico hipofisário, o GnRH se liga aos receptores de superfície celular e sinaliza a liberação de FSH e LH (YOUNGQUIST; THRELFALL, 2007). O FSH é armazenado em grânulos secretores localizados no citoplasma por curtos períodos de tempo, enquanto o LH é armazenado por períodos mais longos durante o ciclo estral (FARNWORTH, 1995).

Durante a fase folicular do ciclo estral o CL sofre regressão, resultando em concentrações basais de  $P_4$ . Concomitante a redução das concentrações plasmáticas de  $P_4$ , há um aumento nas concentrações de  $E_2$  devido ao rápido desenvolvimento do FD, isso induz um aumento na liberação de GnRH e permite a exibição de comportamento do estro, durante o qual, vacas / novilhas são sexualmente receptivas à monta (FORDE et al., 2011).

A ovulação do FD ocorre somente quando as concentrações séricas de  $P_4$  são basais e as frequências de pulsos de LH ocorrem a cada 40 a 70 minutos por dois a três dias. Cerca de 10 a 14 horas após o estro acontece a ovulação, posteriormente, inicia a fase de metaestro com duração de três a quatro dias. Esta fase é caracterizada pela formação do CL a partir do corpo hemorrágico, que é resultante do rompimento do folículo pré-ovulatório (ROCHE, 1996).

Após a ovulação, as células da granulosa e da teca interna sofrem luteinização e formam o CL, responsável pela produção de  $P_4$  necessária para manter a gestação ou o diestro. Na fase de diestro, as concentrações de  $P_4$  permanecem elevadas e os folículos recrutados continuam o desenvolvimento devido à liberação do FSH pela hipófise anterior. Entretanto, os folículos que crescem durante esta fase tem a ovulação bloqueada pelos altos níveis de  $P_4$  que por meio de *feedback* negativo, não permitem frequências e/ou amplitudes adequadas nos pulsos de LH, bloqueando a ovulação e induzindo atresia do FD (CROWE, 2008). Durante a fase de pró-estro, o CL sofre regressão em resposta a secreção de  $PGF_{2\alpha}$  uterina, as concentrações de  $P_4$  diminuem drasticamente não ativando o *feedback* negativo e permitindo a ovulação (FORDE et al., 2011); (Figura 1).

**Figura 1** - Representação esquemática do padrão de secreção do FSH (linha azul), LH (linha verde), P<sub>4</sub> (linha laranja) e do crescimento de folículos ovarianos durante o ciclo estral em bovinos. Cada onda de crescimento folicular é precedida por um aumento transitório das concentrações de FSH. Folículos saudáveis em crescimento (amarelo), folículos atresícos (vermelho). Um aumento nos níveis de LH e FSH ocorrem no início do estro e induzem a ovulação. O padrão de secreção de LH durante uma janela de impulsos de oito horas no início da fase lútea (maior frequência e menor amplitude), no meio da fase lútea (menor frequência e maior amplitude) e na fase folicular (alta frequência e amplitude) está indicado no topo do esquema.



Fonte: Adaptado de Forde et al. (2011).

### 2.2.2 Dinâmica Folicular Ovariana

A dinâmica folicular representa um dos aspectos mais importantes da fisiologia ovariana, sendo amplamente estudada nas diversas raças taurinas ou zebuínas (FIGUEIREDO et al., 1997; MACKEY et al., 2000; COUTINHO et al., 2007; CUERVO-ARANGO et al., 2011).

Como mencionado acima, tanto o FSH quanto o LH possuem papel fundamental no desenvolvimento dos folículos ovarianos, uma vez que o crescimento folicular está envolvido com os mecanismos de *feedback* positivo e negativo do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, E<sub>2</sub> e inibinas.

O crescimento, o desenvolvimento e a maturação dos folículos ovarianos são processos fundamentais para alta eficiência reprodutiva em animais de produção. Durante a vida fetal é estabelecido um número fixo de folículos primordiais. Com o desenvolvimento

fetal, os folículos ovarianos iniciam um período de desenvolvimento de três a quatro meses caracterizado por estágios independente e dependente de gonadotrofina (WEBB et al., 2004).

Durante o estágio gonadotrofina dependente o crescimento folicular ocorre em ondas, sendo duas a três ondas de crescimento folicular por ciclo estral (GINTHER et al., 1989). Frequentemente, duas ondas ocorrem em vacas de leite e três ondas em vacas e novilhas de corte (FORDE et al., 2011). Especificamente na raça Nelore, há um predomínio de duas ondas na vaca (83,3%) e três ondas na novilha (64,7%); (FIGUEIREDO et al., 1997). Cada onda de crescimento folicular envolve emergência folicular, seleção, dominância e atresia ou ovulação do FD (CROWE, 2008).

A emergência de uma onda de crescimento folicular é caracterizada pelo recrutamento de um grupo de folículos (cinco a 20 folículos  $\geq 5$  mm) que coincide com aumento transitório nas concentrações de FSH (SUNDERLAND et al., 1994). Neste período, o desenvolvimento folicular é marcado pela presença de receptores de FSH localizado nas células da camada granulosa dos folículos por um período de três dias, permitindo que o FSH execute a sinalização, o crescimento e a proliferação celular (GINTHER et al., 2002).

No processo de seleção folicular, o número de folículos recrutados é reduzido para quota ovulatória da espécie, geralmente um na bovina (SUNDERLAND et al., 1994). Nesta fase há um aumento transitório nas concentrações de FSH, induzindo o aumento na atividade da enzima aromatase, presente nas células da camada granulosa, que converte andrógeno em estrógeno (HILLIER, 1994).

À medida que o FD emerge do grupo de folículos recrutados, o diâmetro folicular aumenta e este é reconhecido como o maior folículo saudável do grupo. A divergência ou dominância folicular é estabelecida quando o maior folículo possui um diâmetro médio de 8,5 mm em animais *Bos taurus* (GINTHER et al., 1999) e 5,7 mm para novilhas e 6,1 mm para vacas *Bos indicus* (Nelore); (SARTORELLI et al., 2005). Numa taxa de crescimento folicular de 0,92 mm/dia (FIGUEIREDO et al., 1997) o FD alarga seu diâmetro e promove um aumento nas concentrações de E2 e inibina no fluido folicular, suprimindo as concentrações de FSH na hipófise anterior por *feedback* negativo e reduzindo os níveis de FSH a concentrações basais (SUNDERLAND et al., 1994).

O FD selecionado torna-se cada vez mais sensível ao LH e continua o crescimento frente a concentrações decrescentes de FSH. Independente da fase do ciclo estral, o alternar da dependência de FSH para dependência de LH, acontece pela presença de receptores de LH localizados nas células da teca e da granulosa dos folículos saudáveis em diferentes estágios de desenvolvimento. À medida que o folículo cresce os receptores de LH

da teca e da granulosa aumentam e o folículo torna-se dominante. Além disso, evidências sugerem aumentos transitórios de LH na circulação, próximo do tempo de seleção do folículo, permitindo que o FD continue produzindo  $E_2$  e crescendo, mesmo em um ambiente com menor concentração de FSH (CROWE, 2008; FORDE et al., 2011).

O destino do FD é dependente das frequências e amplitudes de pulso do LH (CROWE, 2008). Durante a fase lútea inicial, a pulsatilidade do LH é de amplitude menor e de frequência maior (20 a 30 pulsos/24 horas), no meio da fase lútea os pulsos do LH passam a ser de amplitude maior e de frequência menor (seis a oito pulsos/24 horas). Esta amplitude e frequência ainda são insuficientes para promover a maturação final do FD e a ovulação. Portanto, o FD selecionado durante a fase lútea do ciclo estral sofre atresia, e a produção de  $E_2$  e inibina diminui, removendo o bloqueio de *feedback* negativo sobre a secreção de FSH no hipotálamo/hipófise. Com aumento da secreção de FSH, emerge uma nova onda folicular (FORDE et al., 2011).

A produção de  $E_2$  em elevadas concentrações é uma característica essencial do FD, uma vez que antes mesmo das diferenças visíveis no diâmetro folicular, o suposto FD tem maiores concentrações de  $E_2$  no fluido folicular quando comparado aos outros folículos da onda (SUNDERLAND et al., 1994). A síntese de  $E_2$  é dependente da produção de andrógenos nas células da teca e da transformação de andrógeno em  $E_2$  nas células da granulosa. A produção de  $E_2$  a partir de folículos em crescimento depende da frequência de pulso de LH. A ligação do LH aos seus receptores nas células da teca impulsiona a conversão de colesterol em testosterona por meio de uma série de reações catalíticas. Uma vez produzida, a testosterona difunde-se das células da teca para as células da granulosa, onde é convertida em  $E_2$  pela enzima aromatase (HILLIER, 1994).

O  $E_2$  tem um efeito local sobre o desenvolvimento folicular e um papel sistêmico no mecanismo de *feedback* positivo no hipotálamo e hipófise. Durante a fase folicular do ciclo estral, quando as concentrações de  $P_4$  são altas, o  $E_2$  produzido pelo FD pré-ovulatório induz aumento de GnRH a partir do hipotálamo, promovendo aumento na amplitude e na frequência dos pulsos de LH, suficiente para estimular a maturação final e ovulação do FD (SUNDERLAND et al., 1994; CROWE, 2008). Tanto em novilhas, quanto em vacas *Bos indicus* o diâmetro máximo do folículo pré-ovulatório é de 10 a 12 mm (FIGUEIREDO et al., 1997) e em *Bos taurus* é de 14 a 20 mm (GINTHER et al., 1989).

Fatores intraovarianos também desempenham um papel importante na regulação do ciclo estral, seja de forma indireta através da alteração na síntese de  $E_2$ , ou de forma direta através do mecanismo de *feedback* negativo, controlam o hipotálamo e a hipófise

(FORDE et al., 2011). Embora a aquisição de receptores de LH pelas células da camada da granulosa seja considerada o principal mecanismo que favorece o processo de seleção do folículo (LUCY, 2007) outros mecanismos como, a biodisponibilidade do fator de crescimento insulínico (IGF); (RIVERA; FORTUNE, 2003) e a presença de outros fatores de crescimento (KNIGHT; GLISTER, 2006) também favorecem o crescimento, a proliferação e a capacidade esteroidogênica do FD (CANTY et al., 2006).

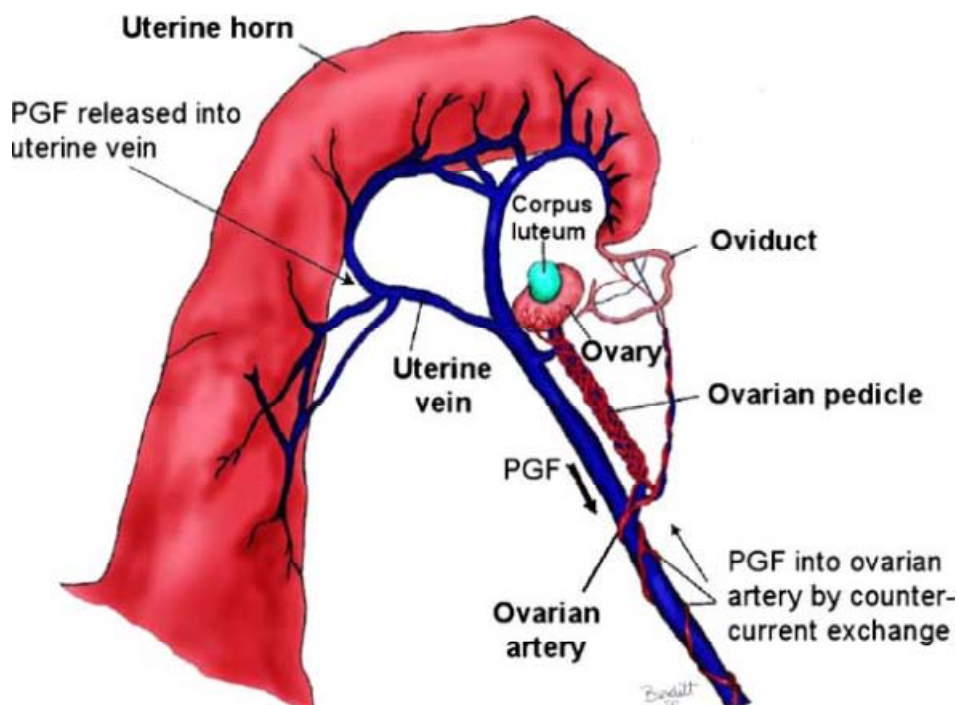
### 2.2.3 Função do Corpo Lúteo Durante o Ciclo Estral

Após a ovulação, as células da teca e da camada granulosa do folículo ovulatório sofrem luteinização por ação do LH e formam o CL (YOUNGQUIST; THRELFALL, 2007). A função do CL é produzir concentrações suficientes de P<sub>4</sub> durante toda a fase lútea do ciclo estral, seja para impedir o comportamento do estro ou para manter a gestação se o concepto estiver presente (LAMB et al., 2010).

Em fêmeas da raça Nelore o diâmetro máximo do CL é de 15 a 18 mm, sendo maior em novilhas que em vacas (FIGUEIREDO et al., 1997). Os níveis de P<sub>4</sub> aumentam rapidamente entre o 3º e o 12º dia do ciclo estral, permanecendo relativamente constante até a regressão fisiológica do CL, no 16º dia para o ciclo com duas ondas de crescimento folicular e no 19º dia para o ciclo com três ondas de crescimento folicular, resultando em uma menor e maior duração do ciclo estral, respectivamente (ADAMS; JAISWAL, 2008).

Em bovinos o reconhecimento materno da gestação ocorre entre o 15º e o 17º dia do ciclo estral, devido à presença do *interferon-tau* (INF $\tau$ ) produzido pelo trofoblasto do concepto em desenvolvimento (LAMB et al., 2010). Se o INF $\tau$  não for detectado em quantidade suficiente, a luteólise ocorre. A lise do CL é desencadeada pela ligação de ocitocina aos seus receptores localizados no útero que induz a secreção de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  no endométrio uterino. Tal regressão acontece através do mecanismo luteolítico de contracorrente entre a veia uterina e a artéria ovariana que permite a transferência da PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  da veia para a artéria (Figura 2); (FORDE et al., 2011). Isto reduz as concentrações circulantes de P<sub>4</sub>, aumenta as concentrações de E<sub>2</sub>, estimula a liberação de GnRH no hipotálamo e faz o animal entrar na fase folicular do ciclo estral (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

**Figura 2** - Esquema ilustrativo da luteólise.  $\text{PGF}_{2\alpha}$  liberada pelo endométrio uterino é transferida da veia uterina para artéria ovariana através do mecanismo de contracorrente.



Fonte: Forde et al., (2011) (adaptado).

#### 2.2.4 Comportamento de Estro

Nos bovinos o aceite de monta é o principal sinal indicativo de estro. O aumento nas concentrações de  $\text{E}_2$  sinaliza o cérebro para induzir o comportamento estral, necessário para o sucesso no acasalamento. No entanto, este comportamento ocorre frequentemente quando as concentrações plasmáticas de  $\text{P}_4$  são baixas (VAILES et. al., 1992).

Em vacas de leite a duração média do estro é de oito a nove horas, sendo que este tempo tende a diminuir à medida que a produção de leite aumenta. Em novilhas de raças leiteiras a duração do estro pode chegar de 12 a 14 horas. Em vacas de corte, a duração média do estro pode chegar a oito horas e trinta minutos (DISKIN, 2008) e em animais *Bos indicus* a duração média do estro é de 10 horas (BÓ et al., 2003).

Fêmeas *Bos indicus* são mais passíveis de apresentar cio não acompanhado de sinais de estro, estro de menor duração e alta percentagem de demonstração de estro noturno, quando comparado às fêmeas *Bos taurus* (BÓ et al., 2003).

Tanto a duração, quanto a intensidade do comportamento estral são afetados por uma série de fatores ambientais, tamanho do grupo sexualmente ativo, presença de touro

(DISKIN, 2008), fatores climáticos (chuva e vento fortes) e manejo dos animais nos pastos e nos currais (GALINA et al., 1996).

A exposição a agentes estressantes elevam as concentrações sanguíneas de cortisol e alteram a frequência e a amplitude de pulsos do GnRH e LH, retardando ou bloqueando o pico de LH pré-ovulatório com diminuição na expressão do estro e incidência normal de ovulação (FORDE et al., 2011).

As informações supracitadas ajudam a explicar a pobre eficiência na detecção de estro e conseqüentemente, a menor taxa de sucesso relatada em programas de IA, especialmente, quando se trata de rebanhos *Bos indicus*.

### 2.3 ANESTRO NO PÓS-PARTO

A duração do anestro no pós-parto depende de vários fatores, dos quais, a presença do bezerro e a condição nutricional no final da gestação e início da lactação são os principais (QUINTANS et al., 2004). Em vacas de corte o primeiro FD no pós-parto não ovula e sofre atresia (YAVAS; WALTON, 2000). Se a condição nutricional for boa, a primeira ovulação ocorre após  $3,2 \pm 0,2$  ondas de crescimento folicular, cerca de 30 dias no pós-parto. Já em vacas com baixa condição nutricional a primeira ovulação só ocorre após  $10,6 \pm 1,2$  ondas, ou seja, cerca de 70 a 100 dias no pós-parto (CROWE, 2008).

No pós-parto, cerca de 70% das vacas de corte possuem a primeira ovulação não acompanhada de sinais de estro, seguida de ciclo estral curto e com apenas uma onda de crescimento folicular (CROWE, 2008). Esta fase lútea é reduzida por causa da liberação prematura de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  a partir do endométrio uterino, a qual é possivelmente intensificada pela amamentação, que induz liberação de ocitocina a partir da hipófise posterior (YAVAS; WALTON, 2000). Esta regressão precoce ocorre por volta do 8° ao 10° dia do ciclo. Já a segunda ovulação ocorre cerca de nove a 11 dias após a primeira e geralmente está associada com a expressão do estro e duração normal da fase lútea (CROWE, 2008).

O retorno da atividade cíclica ovariana no pós-parto é amplamente dependente das frequências de pulsos do LH. Em termos de desenvolvimento folicular, dentro de sete a 10 dias no pós-parto, já há folículos em crescimento (CROWE, 2008). Entretanto, devido a uma falha no processo de maturação final, o FD da primeira onda de crescimento sofre atresia (YAVAS; WALTON, 2000).

Durante o período gestacional, o crescimento folicular continua durante os dois primeiros trimestre em intervalos regulares de sete a 10 dias. No final da gestação, um

forte *feedback* negativo de P<sub>4</sub> (CL e placentário) e de E<sub>2</sub> (principalmente de origem placentária) suprime o aumento transitório de FSH, necessário para o crescimento folicular, cessando o desenvolvimento folicular durante os últimos 20 a 25 dias de gestação (GINTHER et al., 1996; CROWE et al., 1998).

No parto, os níveis de P<sub>4</sub> e de E<sub>2</sub> são reduzidos a concentrações basais, resultando em aumento recorrente de FSH do 3º ao 5º dia do pós-parto, estimulando a primeira onda de crescimento folicular que resulta em um FD com sete a 10 dias do parto. Neste período, o destino do FD depende da sua capacidade em secretar níveis suficientes de E<sub>2</sub> para induzir um aumento de gonadotrofina (CROWE, 2008). No entanto, a secreção de E<sub>2</sub> pelo FD é dependente da frequência de pulso do LH, do tamanho do FD e da biodisponibilidade de IGF, que no início do puerpério contribuem para o destino do FD (CANTY et al., 2006; CROWE, 2008).

A ausência de pulsos de LH no pós-parto precoce ocorre devido ao esgotamento dos estoques de LH na hipófise anterior. Fatores como presença do bezerro, frequência de amamentação e baixa condição nutricional implicam na supressão prolongada dos pulsos de LH e na ausência de P<sub>4</sub> (CROWE, 2008).

A amamentação promove ausência dos pulsos de GnRH devido ao *feedback* negativo induzido pelo 17β-estradiol ovariano (WILLIAMS et al., 1996). Durante a amamentação peptídeos endógenos são liberados e induzem a produção de 17β-estradiol. Somente 15 a 30 dias nos pós-parto a pulsatilidade de GnRH e LH se normalizam (YAVAS; WALTON, 2000).

A restrição energética na dieta reduz o diâmetro máximo e leva a persistência do FD em novilhas pré e pós-púbere e em vacas no pós-parto, promovendo atraso no desenvolvimento dos folículos grandes (BÓ et al., 2003).

Neste período, a frequência de pulso do LH deve ser de um pulso por hora para promover a ovulação (FORDE et al., 2011). A maioria das vacas de corte retomam a atividade ovariana e ovulação cerca de 30 a 130 dias pós-parto. In *Bos indicus* (Brahman) com escore de condição corporal entre 3 e 3,5 a primeira ovulação no pós-parto ocorre de 30 a 40 dias para vacas que não lactantes e 65 a 80 dias para vacas em amamentação (HENAO et al., 2000).

Como já mencionado acima, a maior causa de ovulação tardia no pós-parto é a falha na frequência de pulsos de LH, por influência da frequência de pulsos do GnRH. Portanto há maneiras de acelerar o retorno da atividade ovariana no pós-parto. O GnRH pode ser utilizado com sucesso em vacas em anestro anovulatório, porém o sucesso depende da fase

do crescimento folicular, ou seja, somente quando há FD a aplicação do GnRH promove a ovulação (CROWE, 2008).

Vacas em anestro expostas ao tratamento com  $P_4$  por períodos de cinco a nove dias, associado à aplicação de  $E_2$  são induzidas a ciclicidade encurtando o intervalo entre pós-parto e concepção, isso porque o tratamento com  $P_4$  estimula o desenvolvimento e a maturação de folículos dominantes, por aumentar a secreção de LH, estimular o desenvolvimento de receptores de LH e a síntese de  $E_2$  (RHODES et al., 2003). Além disso, o tratamento com  $P_4$  garante que a primeira ovulação seja acompanhada com a expressão do estro e funcionamento normal da fase lútea. A ovulação em vacas que estão em anestro pode ser assegurada com o uso de gonadotrofina coriônica equina (eCG); (BÓ et al., 2003).

Como visto anteriormente, a amamentação/presença do bezerro exerce efeito inibitórios sobre os pulsos de LH, e conseqüentemente, sobre a ovulação. Portanto, com o manejo de mamada controlada dos bezerros, 30 dias pós-parto, é possível antecipar a ovulação em vacas de corte. A mamada controlada envolve o acesso dos bezerros as vacas uma ou duas vezes por dia, o restante do tempo os bezerros devem ficar isolados e fora da vista das vacas (STAGG et al., 1998).

A remoção temporária do bezerro (48 a 120h) também é eficaz para induzir um estro fértil, reduzido o intervalo de tempo entre o parto e a concepção. Está prática é uma abordagem natural e econômica para induzir o início do cio em vacas *Bos indicus* com anestro pós-parto (PEREA et al., 2008).

#### 2.4 CONTROLE DA DINÂMICA FOLICULAR OVARIANA EM PROGRAMAS DE IATF

Com o conhecimento da fisiologia do ciclo estral dos bovinos, tornou-se possível o controle das fases de desenvolvimento folicular (recrutamento, seleção e ovulação), graças à utilização de estratégias farmacológicas específicas. O controle farmacológico do ciclo estral facilita não só o manejo reprodutivo, como também permite a aplicação das biotecnologias da reprodução nos rebanhos de leite e de corte, proporcionando uma produção mais eficiente.

Os primeiros protocolos de sincronização do estro focavam na regressão do CL com uma aplicação de  $PGF_{2\alpha}$  e na detecção do estro, ou envolvia o uso de  $P_4$  exógena que impedia a ocorrência do estro. Posteriormente, foram desenvolvidos protocolos que combinavam a utilização de  $P_4$  exógena com a aplicação de  $PGF_{2\alpha}$ . Finalmente, hormônios liberadores de gonadotrofinas passaram a ser empregado nos protocolos para controlar a onda

de crescimento folicular, sincronizar a ovulação ou luteinizar folículos dominantes (LAMB et al., 2010).

O emprego de hormônios liberadores de gonadotrofinas nos protocolos de sincronização do ciclo estral deu origem aos protocolos de IATF. Nestes protocolos, além do ciclo estral, a ovulação também passou a ser sincronizada permitindo a inseminação de um grande número de fêmeas em um momento pré-estabelecido sem a necessidade de observação do estro.

São conhecidas três condições fundamentais para o controle da dinâmica folicular e luteínica em programas de IATF de bovinos: a sincronização da emergência de uma onda de crescimento folicular, através de agentes indutores da ovulação ou da atresia folicular; o controle na duração da fase progesterônica, através de agentes luteolíticos ou fontes exógena de P<sub>4</sub>; e a indução sincronizada da ovulação do FD (BARUSELLI et al., 2010).

#### 2.4.1 Sincronização da Emergência da Onda de Crescimento Folicular

A emergência da onda de crescimento folicular pode ser sincronizada por ablação mecânica do FD, por indução da ovulação ou por indução de atresia folicular.

Os folículos ovarianos são dependentes de FSH no início e de LH no final da onda de crescimento folicular, portanto, para uma eficiente sincronização da emergência folicular é necessário promover inibição da secreção de FSH e LH. Após esta fase de inibição, ocorre um pico de FSH com indução sincrônica de uma nova onda de crescimento folicular (BARUSELLI et al., 2010).

O método mecânico consiste na remoção do FD guiada por ultrassonografia, promovendo rápida redução dos níveis de E<sub>2</sub> e inibina e descarga de FSH o que induz a emergência de uma nova onda de crescimento folicular em aproximadamente 36 horas (MARTINEZ et al., 2000, BÓ et al., 2003). Embora este método seja eficiente, sua aplicação é muito trabalhosa e acaba inviabilizando o emprego em larga escala.

A ovulação pode ser induzida diretamente com a aplicação de LH ou hCG que se ligam aos receptores de LH no FD, ou indiretamente pela aplicação de GnRH que promove secreção pulsátil do LH (BARUSELLI et al., 2010). Após a ovulação, há uma queda na secreção de E<sub>2</sub> e inibina e desbloqueio da secreção de FSH. Com a descarga de FSH, tem-se emergência de uma nova onda de crescimento folicular dentro de 24 a 48 horas (GINTHER et al., 1996).

O uso de E<sub>2</sub> em associação com a P<sub>4</sub> endógena (produzida pelo CL) ou exógena (dispositivos/implantes) diminui os níveis circulantes de FSH e LH e promove a regressão dos folículos ovarianos dependentes de gonadotrofinas. A medida que o E<sub>2</sub> vai sendo metabolizado ocorre elevação dos níveis de FSH com subsequente emergência de uma nova onda de crescimento folicular (BARUSELLI et al., 2010).

A associação de valerato de estradiol (VE); (BÓ et al., 1995) ou de cipionato de estradiol (CE); (COLAZO et al., 2003) com P<sub>4</sub> causam a regressão dos folículos antrais presentes no ovário. Entretanto, devido à meia vida longa e a baixa solubilidade destes ésteres, há uma dispersão no dia da emergência da onda de crescimento folicular (SÁ FILHO et al., 2011). O benzoato de estradiol (BE); (SÁ FILHO et al., 2004) e o 17β-estradiol (BÓ et al., 1994) possuem uma meia vida mais curta, logo uma onda sincrônica de crescimento folicular é induzida entre três e quatro dias após o tratamento (BARUSELLI et al., 2010). A administração de 2 mg de BE por via intramuscular (IM) em associação com uma fonte P<sub>4</sub> é uma das formas mais utilizadas para induzir o aparecimento de uma nova onda de crescimento folicular em programas de IATF.

#### 2.4.2 Controle da Fase Progesterônica do Ciclo Estral

A fase progesterônica do ciclo estral pode ser controlada através do uso de agentes luteolíticos (estrógenos e PGF<sub>2α</sub>) ou pela administração exógena de P<sub>4</sub> ou progestágenos na forma de dispositivos intravaginais ou implantes auriculares.

##### 2.4.2.1 Estrógenos

Os estrógenos injetáveis são capazes de induzir a luteólise devido sua capacidade de estimular a secreção endógena de PGF<sub>2α</sub> pelo endométrio uterino. Entretanto esse efeito luteolítico depende do éster e da dose utilizada (BARUSELLI et al., 2010).

Éster de meia vida mais longa (VE) possuem maior efeito luteolítico. A administração de 5 mg de VE no início do protocolo com norgestomet, induz luteólise em 90% dos animais (PETERSON et al., 2000). É válido ressaltar que o efeito luteolítico do VE é mais eficiente quando aplicado no início do protocolo, onde promover emergência folicular e elimina aplicação de PGF<sub>2α</sub> no protocolo.

Éster de meia vida mais curta como BE possui menor efeito luteolítico. Novilhas de corte tratadas com 2 mg de BE no diestro apresentaram 26,7% de manifestação de estro e ovulação (MARTINEZ et al., 2004).

#### 2.4.2.2 Prostaglandina

A PGF<sub>2α</sub> e seus análogos sintéticos, como o cloprostenol, constituem os principais agentes luteolíticos. Uma única aplicação de PGF<sub>2α</sub> normalmente regride o CL dentro de 24 a 72 horas, sendo que o estro e a ovulação ocorrem dentro de dois a três dias (YOUNGQUIST; THRELFALL, 2007). No entanto, o efeito luteolítico da PGF<sub>2α</sub> só é observado durante o período de atividade do CL, ou seja, do 5º ao 17º dia do ciclo estral (LARISON; BALL, 1992). Nesta fase a PGF<sub>2α</sub> provoca a luteólise e queda das concentrações plasmáticas de P<sub>4</sub> que é necessário para manifestação do estro e da ovulação (NEBEL; JOBST, 1998).

Nos protocolos de IATF, a aplicação da PGF<sub>2α</sub> no momento da retirada dos dispositivos ou implantes a base de P<sub>4</sub> ou progestágenos, tem a finalidade de induzir a luteólise para promover uma queda abrupta nos níveis endógenos de P<sub>4</sub>, mimetizando a condição fisiológica encontrada no final do diestro (BARUSELLI et al., 2010).

Tratamentos hormonais combinando GnRH e PGF<sub>2α</sub> foram utilizados com sucesso em protocolos de sincronização para IA em bovinos de corte e de leite. Esta combinação hormonal tornou-se um protocolo de IATF muito conhecido “*Ovsynch*” (PURSLEY et al., 1995). Este protocolo consiste numa aplicação de GnRH no dia 0 (D<sub>0</sub>), seguido por uma aplicação de PGF<sub>2α</sub> sete dias mais tarde e outra aplicação de GnRH 48 horas após a PGF<sub>2α</sub>. A IATF é realizada 15 horas mais tarde e uma taxa de prenhez de 42 a 48% podem ser alcançadas (BÓ et al., 2003).

#### 2.4.2.3 Progesterona ou progestágenos

Atualmente existe uma ampla variedade de produtos (dispositivo, implante ou produto de uso oral) que liberam P<sub>4</sub> ou progestágenos de forma eficiente, com objetivo de sincronizar o estro e/ou a ovulação.

A função da P<sub>4</sub> nos protocolos de IATF é bloquear o pico de LH (KINDER et al., 1996) evitando a maturação folicular final, o estro e a ovulação do FD (STOCK; FORTUNE, 1993; SAVIO et al., 1993). Quando associada ao tratamento com E<sub>2</sub> ocorre a

emergência sincronizada de uma nova onda de crescimento folicular, regressão do FD, e se associados a  $PGF_{2\alpha}$ , proporcionam sincronização do estro (BARUSELLI et al., 2010).

Os implantes auriculares são constituídos por uma fonte de progestágenos, como por exemplo, o norgestomet. O tratamento com norgestomet envolve a inserção de um implante auricular por via SC contendo de 3 a 6 mg do produto. O implante é deixado no local por um período de nove dias e uma aplicação de 5 mg de VE associado a 3 mg de norgestomet é realizada no momento da implantação. Na IA, vacas e novilhas são inseminadas 12 horas após a observação do estro, já na IATF a inseminação acontece com 48 horas (novilhas) ou 56 horas (vacas) após a remoção do implante (BÓ et al., 2003).

Os dispositivos intravaginais contêm  $P_4$  natural e atingem concentrações plasmáticas em torno de 4 a 5 ng/ml, o suficiente para suprimir a frequência e a amplitude dos pulsos de LH e permitir o crescimento de ondas foliculares durante o tratamento. Simulando a fase luteínica do ciclo estral e evitando a ovulação durante o tratamento, estes produtos são utilizados por um período de sete a 12 dias, com a finalidade de manter elevados os níveis de  $P_4$  e suprimir o pico endógeno do LH. Em animais cíclicos, a regressão do CL é alcançada pela aplicação de  $E_2$  no início do tratamento ou pela administração de  $PGF_{2\alpha}$  no momento da retirada do dispositivo ou implante (BARUSELLI et al., 2004b).

Em bovinos de corte, a associação do dispositivo de  $P_4$  intravaginal e BE constitui um dos protocolos de IATF mais conhecido no mundo (BÓ et al., 2002). O tratamento consiste na inserção de um dispositivo de  $P_4$  por via intravaginal associado à administração de 2 mg de BE por via IM em vacas e novilhas no  $D_0$ . Na remoção do dispositivo ( $D_7$  ou  $D_8$ ) aplica-se a  $PGF_{2\alpha}$  e 24 horas depois 1 mg de BE por via IM. A IATF é realizada entre 52 e 56 horas após a remoção do dispositivo (BÓ et al., 2003).

Atualmente, o protocolo de IATF mais empregado associa a inserção do dispositivo de  $P_4$  intravaginal à aplicação de 2 mg de BE no  $D_0$  (SIQUEIRA et al., 2009). No  $D_8$  o dispositivo de  $P_4$  é removido e aplicam-se  $PGF_{2\alpha}$ , 1 mg de CE e 300 a 400 UI de eCG por via IM. A IA é realizada entre 48 e 60 horas após a retirada da fonte de  $P_4$  (SALES et al., 2011). Outro protocolo comum consiste na inserção de um implante auricular contendo norgestomet associado à aplicação de VE no  $D_0$  e eCG no dia  $D_9$ . A IA também é realizada entre 48 e 60 horas após a remoção do implante (SÁ FILHO et al., 2010).

Dispositivos de  $P_4$  novos podem ser reutilizados mais uma ou duas vezes nos protocolos de IATF, dependendo da concentração de  $P_4$ . Dependendo da categoria animal, os resultados de taxa de gestação podem ser compatíveis ou superiores quando se emprega dispositivos usados, comparado aos novos. Especula-se que resultados melhores com

os dispositivos usados estejam relacionados ao fato do folículo apresentar maior crescimento em ambiente com menor nível de P<sub>4</sub>, permitindo maior frequência de pulso de LH e um maior diâmetro do folículo pré-ovulatório (BÓ et al., 2003).

#### 2.4.2.3.1 Progesterona Injetável

A ação da P4 injetável na sincronização do ciclo estral em bovinos tem sido relatada há décadas (CHRISTIAN; CASIDA, 1948; ULBERG; LINDLEY, 1960). Nos primeiros estudos, os animais eram tratados com aplicações diárias de P4 diluída em veículo oleoso, sob diferentes doses e por períodos de até 20 dias. Estes tratamentos resultavam em altas taxas de sincronização do estro, no entanto, apresentavam baixa fertilidade e o tratamento era pouco prático devido às aplicações parenterais, diárias da P4 (MACMILLAN; PETERSON, 1993).

Um estudo mais recente com P4 injetável foi realizado por Fike et al. (1999) que investigaram a combinação de acetado de melengestrol com P4 injetável e 17 $\beta$ -estradiol na sincronização do ciclo estral de bovinos de corte. Apesar de haver outro estudo mais recente (CALLEJAS et al., 2006), nenhum trabalho analisou o efeito da P4 injetável (aplicada em dose única) em substituição ao dispositivo/implante de P4 no protocolo de IATF de bovinos, permanecendo uma grande lacuna a ser investigada.

#### 2.4.3 Indução Sincronizada da Ovulação

A ovulação sincronizada do FD pode ser induzida com o uso de hormônios indutores da ovulação, ou seja, com GnRH, LH, hCG ou E<sub>2</sub> (BE ou CE) ao final do tratamento.

Os fármacos utilizados para indução da ovulação agem por *feedback* positivo, tanto na liberação pulsátil de LH, através dos níveis de E<sub>2</sub> e GnRH, quanto pela ligação direta do hCG ou LH nos receptores de LH do folículo pré-ovulatório (BARUSELLI et al., 2010).

Cada indutor de ovulação possui um tempo específico entre a indução e o momento da ovulação. O GnRH possui um intervalo de 26 a 30 horas entre a indução e a ovulação (WILTBANK; HAUGHIN, 2003). O hCG e o LH possuem um intervalo de 24 a 26 horas. A aplicação do BE 24 horas após a remoção da fonte de P<sub>4</sub> induz o pico de LH em 22 horas e a ovulação entre 44 a 45 horas (MAIO et al., 2006). Já a aplicação do CE no momento

da retirada do dispositivo de P<sub>4</sub>, induz o pico de LH em 45 a 49 horas (SALES et al., 2007) e a ovulação entre 67 a 70 horas após o tratamento (SALES et al., 2008).

#### 2.4.4 Uso do eCG nos Protocolos de IATF

Nesta revisão já foi discutida a relação entre o anestro e a condição nutricional da fêmea no pós-parto. O retorno da atividade ovariana tende a ser mais longo em vacas com balanço energético negativo, e esta condição é muito comum no período final da gestação e início da lactação.

Na condição de anestro, o tratamento com P<sub>4</sub> assegura que a primeira ovulação seja acompanhada com a expressão do estro e funcionamento normal da fase lútea. O uso do eCG pode acompanhar o tratamento com a P<sub>4</sub> para assegurar a ovulação em vacas que estão em anestro profundo (BÓ et al., 2003).

O eCG é um fármaco de alto peso molecular com tempo de meia vida longo de até 72 horas, sendo produzido nos cálices endometriais da égua com 40 a 130 dias de gestação (MURPHY; MARTINUK, 1991). O eCG possui capacidade de se ligar aos receptores foliculares de FSH e LH (SOUMANO et al., 1996) e aos receptores de LH do CL (STEWART; ALLEN, 1981).

O uso do eCG no momento da remoção dos dispositivos de P<sub>4</sub> promove um aumento no crescimento folicular, maior pico de LH pré-ovulatório e melhor sincronia do estro e da ovulação, resultando em melhores taxas de prenhez quando empregado em vacas com baixo ECC ou que estejam amamentando (BÓ et al., 2003; BARUSELLI et al., 2004a).

## REFERÊNCIAS

- ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. 2013. Disponível em: <[http://www.abiec.com.br/3\\_rebanho.asp#](http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp#)>. Acesso em: 20/02/2013.
- ADAMS, G.P.; JAISWAL, R. Follicular dynamics in cattle: Historical overview and research update. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, n.2, p.377-396, 2008.
- AERTS, J.M.J.; BOLS, P.E.J. Ovarian follicular dynamics: A review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.171-179, 2010.
- ASBIA. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. 2011. Disponível em: <<http://www.asbia.org.br/novo/relatorios/>>. Acesso em: 20/08/2012.
- BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; REIS, E.L.; CARVALHO, N.A.T.; CARVALHO, J.B. Manipulação hormonal do estro e da ovulação. In: Curso sobre Manipulação do ciclo estral em bovinos de corte, v.1, 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2004b. 39p.
- BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O.; NASSER, L.F.; BO, G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.479-486, 2004a.
- BARUSELLI, P.S.; SALES, J.N.S.; SÁ FILHO, M.F. Atualização dos protocolos de IATF e TETF. In: 4º Simpósio internacional de reprodução animal aplicada, v.4, 2010, Londrina. **Anais...** Londrina: SIRAA, 2010, p.166-185.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v.43, p.31-40, 1995.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; TRIBULO, H.E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R.J. Follicular wave dynamics after estradiol-17 $\beta$  treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v.41, p.1555-1569, 1994.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTÍNEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.307-326, 2003.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRÍBULO, R.; TRÍBULO, H.; MAPLETOFT, R.J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v.57, p.53-72, 2002.
- CANTY, M.J.; BOLAND, M.P.; EVANS, A.C.O.; CROWE, M.A. Alterations in follicular IGFBP-2, -3 and -4 mRNA expression and intrafollicular IGFBP concentrations during the first follicle wave in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v.93, p.199-217, 2006.
- COLAZO, M.G.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R.J. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. **Theriogenology**, v.60, p.855-865, 2003.

COUTINHO, G.T.R.M.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.; FERREIRA, A.M.; PALHÃO, P.M.; NOGUEIRA, L.A.G. Avaliação ultra-sonográfica da dinâmica folicular e lútea em vacas da raça Guzerá. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1089-1096, 2007.

CHRISTIAN, R.E.; CASIDA, L.E. The effects of progesterone in altering the estrous cycle of the cow. **Journal of Animal Science**, v.7, p.540, 1948.

CROWE, M.A. Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, n.5, p.20-28, 2008.

CROWE, M.A.; PADMANABHAN, V.; MIHM, M.; BEITINS, I.Z.; ROCHE, J.F. Resumption of follicular waves in beef cows is not associated with periparturient changes in follicle-stimulating hormone heterogeneity despite major changes in steroid and luteinizing hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, v.58, p.1445-1450, 1998.

CUERVO-ARANGO, J.; GARCÍA-ROSELLÓ, E.; GARCÍA-MUÑOZ, A.; ALLDECABRES-TORRES, X.; MARTÍNEZ-ROS, P.; GONZÁLEZ-BULNES, A. The effect of a single high dose of PGF2 $\alpha$  administered to dairy cattle 3.5 days after ovulation on luteal function, morphology, and follicular dynamics. **Theriogenology**, v.76, p.1736-1743, 2011.

DISKIN, M.G. Heat watch: A telemetric system for heat detection in cattle. **The Veterinary Quarterly**, v.30, p.37-48, 2008.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. ProdSTAT. 2010. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/573/default.aspx.htm>>. Acesso em: 30/04/2011.

FARNWORTH, P.G. Gonadotrophin secretion revisited. How many ways can FSH leave a gonadotroph?. **Journal of Endocrinology**, v.145, p.387-395, 1995.

FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L.; SOLER, J.M.P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47, p.1489-1505, 1997.

FIKE, K.E.; WEHRMAN, M.E.; LINDSEY, B.R.; BERGFELD, G.; MELVIN, E.J.; QUINTAL, J.A.; ZANELLA, E.L.; KOJIMA, F.N.; KINDER, J.E. Estrus synchronization of beef cattle with a combination of melengestrol acetate and an injection of progesterone and 17 $\beta$ -estradiol. **Journal of Animal Science**, v.77, p.715-723, 1999.

FORDE, N.; BELTMAN, M.E.; LONERGAN, P.; DISKIN, M.; ROCHE, J.F.; CROWE, M.A. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v.124, p.163-169, 2011.

GALINA, C.S.; ORIHUELA, A.; RUBIO, I. Behavioural trends affecting oestrus detection in Zebu cattle. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.465-470, 1996.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; BEG, M.A.; KOT, K. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. **Reproduction**, v.124, p.475-482, 2002.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; KULICK, L.J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: Establishment of follicle deviation in less than 8 h through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, v.52, p.1079-1093, 1999.

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

GINTHER, O.J.; KOT, K.; KULICK, L.J.; MARTIN, S.; WILTBANK, M.C. Relationship between FSH and ovarian follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.108, p.271-279, 1996.

GUIBAULT, L.A.; DUFOURT, J.J.; THATCHER, W.W.; DROST, M.; HAIBEL, G.K. Ovarian follicular development during early pregnancy in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.73, p.127-135, 1986.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Foliculogênese, maturação ovocitária e ovulação. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. Barueri: Manole, 2004, p.69-82.

HANSENY, P.J. Effects of Environment on Bovine Reproduction. In: YOUNGQUIST, R.S.; THRELFALL, W.R. **Current therapy in large animal theriogenology**. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 2007, p.431-442.

HENAO, G.; OLIVERA-ÁNGEL, M.; MALDONADO-ESTRADA, J.G. Follicular dynamics during postpartum anestrus and the first estrous cycle in suckled or non-suckled Brahman (*Bos indicus*) cows. **Animal Reproduction Science**, v.63, p.127-136, 2000.

HILLIER, S.G. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. **Human Reproduction Update**, v.9, p.188-191, 1994.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Pecuária Municipal de 2009. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/acervo/html>>. Acesso em: 30/04/2011.

KINDER, J.E.; KOJIMA, F.N.; BERGFELD, E.G.M.; WEHRMAN, M.E.; FIKE, K.E. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. **Journal of Animal Science**, v.74, p.1424-1440, 1996.

KNIGHT, P.G.; GLISTER, C. TGF- $\beta$  superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v.132, p.191-206, 2006.

LAMB, G.C. Sincronização do estro utilizando CIDR e GnRH. In: Curso novos enfoques na produção e reprodução de Bovinos, Uberlândia, **Anais**, p.215-224, 2004.

LAMB, G.C.; DAHLEN, C.R.; LARSON, J.R.; MARQUEZINI, G.; STEVENSON, J.S. Control of the estrous cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle: A review. **Journal of Animal Science**, v.88, p.181-192, 2010.

LARISON, L.L.; BALL, P.J.H. Regulation of estrus cycle in dairy cattle: A review. **Theriogenology**, v.38, p. 255-267, 1992.

LUCY, M.C. The bovine dominant ovarian follicle. **Journal of Animal Science**, v.85, p.89-99, 2007.

MACKEY, D.R.; SREENAN, J.M.; ROCHE, J.F.; DISKIN, M.G. The effect of progesterone alone or in combination with estradiol on follicular dynamics, gonadotropin profiles, and estrus in beef cows following calf isolation and restricted suckling. **Journal of Animal Science**, v.78, p.1917-1929, 2000.

MAGALHÃES, D.M.; FERNANDES, D.D.; ARAUJO, V.R.; ALMEIDA, A.P.; MATOS, M.H.T.; FIGUEIREDO, J.R. Papel do hormônio foliculo estimulante na foliculogênese *in vivo* e *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.171-182, 2009.

MAIO, J.R.H.; SANDOVAL, G.A.F.; SOUZA, E.D.F.; NOGUEIRA, G.P.; CIPRIANO, R.S.; PERECIN, F.; GARCIA, J.M. Concentração sérica de LH em vacas Nelore ciclando ou ovariectomizadas submetidas ao tratamento com 2.0 mg de Benzoato de estradiol. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2006, v.34, p.360 (Resumo).

MARTINEZ, M.F.; BÓ, G.A.; MAPLETOFT, R.J. Synchronization of follicular wave emergence and ovulation for reproductive biotechnologies. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, v.1, 2004, Londrina. **Anais...** Londrina: SIRAA, 2004, p.26-55.

MARTINEZ, M.F.; ADAMS, G.P.; KASTELIC, J.P.; BERGFELT, D.R.; MAPLETOFT, R.J. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. **Theriogenology**, v.54, p.757-769, 2000.

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 Nelores x Angus (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*)**. 2003. 98f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 2003.

MURPHY, B.D.; MARTINUK, S.D. Equine chorionic gonadotrophin. **Endocrine Reviews**, v.12, p.27-44, 1991.

NEBEL, R.L.; JOBST, S.M. Evaluation of a systematic breeding programs for lactating dairy cows: A review. **Journal Dairy Science**, v.81, p.1169-1174, 1998.

NOGUEIRA, G. P. Puberdade e Maturidade Sexual de Novilhas Bos Indicus. In: 2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, v.1, 2006, Londrina. Londrina. **Anais...** Londrina: SIRAA, 2006, p.180-190.

PEREA, F.P.; DE ONDIZ, A.D.; PALOMARES, R.A.; HERNÁNDEZ, H.J.; GONZÁLEZ, R.; SOTO, E.R. Control of postpartum anestrous with an intra-vaginal progesterone device plus eCG or calf removal for 120 h in suckled crossbred cows managed in a pasture-based system. **Animal Reproduction Science**, v.106, <sup>3</sup>/<sub>4</sub>, p.298-310, 2008.

PETERSON, C.A.; HUHN, J.C.; KESLER, D.J. Norgestomet- and oestradiol valerate-induced luteolysis is dependent upon the uterus. **Animal Reproduction Science**, v.55, p.253-259, 2000.

PURSLEY, J.R.; MEE, M.O.; WILTBANK, M.C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 and GnRH. **Theriogenology**, v.44, p.915-923, 1995.

QUINTANS, G.; VIÑOLES, C.; SINCLAIR, K.D. Follicular growth and ovulation in postpartum beef cows following calf removal and GnRH treatment. **Animal Reproduction Science**, v.80, p.5-14, 2004.

RHODES, F.M.; MCDOUGALL, S.; BURKE, C.R.; VERKERK, G.A.; MACMILLAN, K.L. Invited review: Treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.1876-1894, 2003.

RIVERA, G.M., FORTUNE, J.E. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins -4 and -5 in bovine follicular fluid: implications for ovarian follicular selection and dominance. **Endocrinology**, v.144, p.2977-2987, 2003.

ROCHE, J.F. Control and regulation of folliculogenesis - A symposium in perspective. **Reviews of Reproduction**, v.1, p.19-27, 1996.

SÁ FILHO, M.F.; AMARAL, J.P.B.; MANTOVANI, A.P.; REIS, E.L.; NICHI, M.; BARUSELLI, P.S. Effect of synthetic progesterone (Afisterone®) administration at the moment of CIDR® insertion on follicular wave emergence in beef heifers. In: International Congress on Animal Reproduction, v.1, 2004, Porto Seguro. **Proceedings...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004, p.127.

SÁ FILHO, M.F.; BALDRIGHI, J.M.; SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A.; CARVALHO, J.B.P.; BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S. Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v.129, p.132-139, 2011.

SÁ FILHO, M.F.; CRESPILO, A.M.; SANTOS, J.E.P.; PERRY, G.A.; BARUSELLI, P.S. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, v.120, p.23-30, 2010.

SALES, J.N.; CREPALDI, G.A.; GIROTTO, R.W.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. **Animal Reproduction Science**, v.124, p.12-18, 2011.

SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A.; CARVALHO, J.B.P.; GIROTTO, R.W.; MAIO, J.R.G.; RODRIGUES, M.P.; CARVALHO, C.A.B.; FERREIRA, R.M.; AYRES, H.; BARUSELLI, P.S. Momento da ovulação e taxa de concepção de vacas Nelore tratadas com diferentes fontes de cipionato ou de benzoato de estradiol para induzir a ovulação em protocolos de IATF. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2008, v.36, p.486 (Resumo).

SALES, J.N.S.; CRESPALDI, G.A.; MAIO, J.R.G.; SOUZA, E.F.D.; CARREIROS, S.S.; VERONEZ, D.G.; BARUSELLI, P.S. Perfil de liberação de LH após tratamento com cipionato de estradiol em novilhas Nelore ovariectomizadas. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2007, v.35, p.1028 (Resumo).

SANTOS, R.R.; CELESTINO, J.J.H.; LOPES, C.A.P.; MELO, M.A.P.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.1, p.9-15, 2008.

SARTORELLI, E.S.; CARVALHO, L.M.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J.; BARROS CM. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v.63, p.2382-2394, 2005.

SAUMANDE, J. La folliculogénese chez les ruminants. **Recueil Veterinaire de Medicina**, v.167, p.205-218, 1991.

SAVIO, J.D.; TATCHER, W.W.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R.L.; WOLFENSON, D. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.97, p.197-203, 1993.

SENEDA, M.M.; GODMANN, M.; MURPHY, B.D.; KIMMINS, S.; BORDIGNON, V. Developmental regulation of histone H3 methylation at lysine 1 in the porcine ovary. **Reproduction**, v.135, p.829-838, 2008.

SENEDA, M.M.; SILOTO, L.S.; MOROTTI, F.; SCHNEIDER, C.L. Fisiologia do crescimento folicular em bovinos. In: 4º Simpósio internacional de reprodução animal aplicada, v.4, 2010, Londrina. **Anais...** Londrina: SIRAA, 2010, p.14-22.

SILVA, A.R.R.; REYES, A.; GAMBARINI, M.L.; RUMPF, R.; OLIVEIRA, C.C.; OLIVEIRA FILHO, B.D. Estudo da dinâmica folicular em novilhas da raça Gir através de ultra-sonografia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.2, p.130-132, 2001.

SILVA, K.C.F. **Estudo comparativo da recuperação de complexo *cumulus* oócito e da população de folículos pré-antrais entre fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus***. 2009. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2009.

SIQUEIRA, L.C.; OLIVEIRA, J.F.; ROVANI, M.T.; FERREIRA, R.; BORGES, L.F.; GONÇALVES, P.B. Effects of estradiol and progestins on follicular regression before, during, and after follicular deviation in postpartum beef cows. **Theriogenology**, v.71, p.614-619, 2009.

SOTO-SUAZO, M.; ZORN, T.M. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. **Animal Reproduction**, v.3, p.147-160, 2005.

SOUMANO, K.; SILVERSIDES, D.W.; DOIZÉ, F.; PRINCE, C.A. Follicular 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and cytochromes P450 17 alpha-hydroxylase and aromatase messenger ribonucleic acids in cattle undergoing superovulation. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1419-1426, 1996.

STAGG, K.; SPICER, L.J.; SREENAN, J.M.; ROCHE, J.F.; DISKIN, M.G. Effect of calf isolation on follicular wave dynamics, gonadotrophin, and metabolic hormone changes, and interval to first ovulation in beef cows fed either of two energy levels postpartum. **Biology of Reproduction**, v.59, p.777-783, 1998.

STEWART, F.; ALLEN, W.R. Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophins. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.62, p.527-536, 1981.

STOCK, A.E.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dominance in cattle: Relationship between prolonged growth and the ovulatory follicle and endocrine parameters. **Endocrinology**, v.132, p.1108-1114, 1993.

SUNDERLAND, S.J.; CROWE, M.A.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F.; IRELAND, J.J. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, p.547-555, 1994.

ULBERG, L.C.; LINDLEY, C.E. Use of progesterone and estrogen in the control of reproductive activities in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.19, p.1132-1142, 1960.

VAILES, L.D.; WASHBURN, S.P.; BRITT, J.H. Effects of various steroid milieus or physiological states on sexual behavior of Holstein cows. **Journal of Animal Science**, v.70, p.2094-2103, 1992.

VAN DEN HURK, R.; ABIR, R.; TELFER, E.E.; BEVERS, M.M. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. **Human Reproduction Update**, v.6, p.457-474, 2000.

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

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G.; ARMSTRONG, D.G. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, v.82, p.63-74, 2004.

WILLIAMS, G.L.; GAZAL, O.S.; GUZMÁN VEGA, G.A.; STANKO, R.L. Mechanisms regulating suckling-mediated anovulation in the cow. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.289-297, 1996.

WILTBANK, M.C.; HAUGHIAN, J.M. GnRH: Bases fisiológicas para entender sua utilização em protocolos de sincronização. In: Curso novos enfoques na produção e reprodução de bovinos, v.1, 2003, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: CONAPEC Jr., 2003, p.121-131.

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

### 3 HIPÓTESE

---

- Vacas Nelore (*Bos indicus*) submetidas ao protocolo de IATF à base de progesterona injetável apresentam dinâmica folicular ovariana e taxa de prenhez semelhantes às vacas sincronizadas com dispositivo intravaginal de progesterona.

## 4 OBJETIVOS

---

### 4.1 GERAL

- Comparar a dinâmica folicular ovariana de vacas Nelore (*Bos indicus*) sincronizadas com protocolo de IATF à base de progesterona injetável *versus* dispositivo intravaginal de progesterona.

### 4.2 ESPECÍFICOS

- Verificar o número de vacas com folículos  $\geq 5$  mm no D4, a taxa de crescimento folicular, o diâmetro do folículo dominante na IATF e do folículo pré-ovulatório, a taxa de ovulação e o diâmetro do corpo lúteo de vacas Nelore sincronizadas com protocolos de IATF à base de progesterona injetável e dispositivo intravaginal; e
- Verificar a dinâmica folicular ovariana e a taxa de prenhez de vacas Nelore, com e sem corpo lúteo, sincronizadas com protocolo de IATF à base de progesterona injetável e dispositivo intravaginal.

---

**ARTIGO I - Original paper****Ovarian follicular dynamics of Nelore (*Bos indicus*) cows subjected to a fixed-time artificial insemination protocol with injectable progesterone**

Laboratory of Animal Reproduction, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Parana,  
Brazil

**Abstract:** This study aims to evaluate ovarian follicular dynamics of Nelore cows subjected to fixed-time artificial insemination (FTAI) with injectable progesterone (P4) or intravaginal device. In the device group, 20 cows received an intravaginal device with 1 g of P4 and administration of 2 mg estradiol benzoate (EB) intramuscularly (im) on D0. The device was removed on D8, followed by administration of 500 µg of cloprostenol, 300 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG) and 1 mg of estradiol cypionate (EC), im. The cows were inseminated on D10. In the injectable group, 350 mg of P4 (300 mg subcutaneously and 50 mg im) and 2 mg of EB im were administered on D0 to 16 cows. On D6, 500 µg of cloprostenol, 300 IU of eCG and 1 mg of EC were administered im. The FTAI was performed on D8. Ultrasonography was performed to determine follicular parameters. Sixty-five percent of cows from the device group (13/20) and 75% from the injectable group (12/16) showed follicles  $\geq 5$  mm on D4 ( $p>0.05$ ). The average rate of follicular growth was  $0.92\pm 0.25$  mm/day for the device group and  $1.06\pm 0.45$  mm/day for the injectable group ( $p>0.05$ ). The average diameter of the dominant follicle at FTAI was  $11.4\pm 1.4$  mm for the device group and  $10.8\pm 1.8$  mm for the injectable group ( $p>0.05$ ). In the device group, ovulatory follicles had an average diameter of  $12.1\pm 1.4$  mm, and in the injectable group  $12.3\pm 1.6$  mm ( $p>0.05$ ). Ninety percent of the device group (18/20) and 37.5% of the injectable group (6/16) demonstrated ovulation ( $p<0.05$ ). The average diameter of the corpus luteum was  $18.7\pm 4.3$  mm for the device group and  $17.7\pm 3.6$  mm for the injectable group. The ovarian follicular dynamics was similarly between groups, but the ovulation rate was higher in the cows synchronized by intravaginal device.

**Keywords:** *Bos indicus*. Ultrasonography. Follicular growth. Ovulation. Dominant follicle.

**1. Introduction**

Most programs of FTAI in cattle use progesterone (P4) or progestin as the principal hormonal basis for synchronizing the estrous cycle, treatment may be administered in the form of an intravaginal device, an ear implant or an oral medication. The purpose of P4 in FTAI protocols is to promote synchronization of estrus by mimicking a corpus luteum (CL) or prolonged luteal phase (Baruselli et al. 2004).

The intravaginal device contains natural P4 that exerts negative feedback on estradiol and inhibits the LH surge during the treatment period (5-10 days), thereby preventing estrus

and ovulation of the dominant follicle (DF); (Stock and Fortune 1993; Savio et al. 1993). When associated with estrogen, P4 promotes regression of the DF and the synchronized emergence of a new follicular wave (Baruselli et al. 2004). If given with PGF2 $\alpha$  promotes synchronization of estrus and when associated with estradiol, GnRH or LH promotes synchronization of ovulation (Bó et al. 2002).

Although estradiol/P4-based FTAI protocols are highly efficient in synchronizing *Bos indicus* cows (Sá Filho et al. 2010; Sales et al. 2012) many progress to facilitate reproductive management, minimize service, and reduce costs, are necessary to remain at the forefront of new advances in reproductive biotechnology. In this respect, the use of an injectable P4 source to control the estrous cycle would improve current FTAI programs and others reproductive biotechnologies.

The isolated effect of injectable P4 on the estrous cycle of cattle has been investigated in a few studies (Ulberg and Lindley 1960; Fike et al. 1999), but to date no studies have investigated the use of injectable P4 to replace another source of P4 in FTAI protocols in cattle, especially in *Bos indicus*. One of the major advantages of injectable P4 is the reduction of labor when it is used on a large scale.

The aim of this study was to evaluate ovarian follicular dynamics of Nelore cows subjected to FTAI protocols using injectable P4 or an intravaginal device.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Site, animals and feed management*

The experiment was conducted during the breeding season (November to March) in South America, latitude 23° 24' 23" and longitude 57° 26' 4". The climate in this region is tropical, with an average temperature of 24°C and a rainy season from November to January.

Thirty six multiparous Nelore cows (*Bos indicus*) between 72 and 84 months of age were used for the study. These cows with 45 to 60 days postpartum, had a body condition score (BCS) between 2.5 and 3.5 (2.6 $\pm$ 0.2) using a scale of 0 to 5 (Ayres et al. 2009). The average weight of these cows was 448.9 $\pm$ 39.7 kg.

During the experimental period, the cows were maintained by continuous grazing of *Brachiaria brizantha* and *Brachiaria humindícula*. They were given access to mineralized salt and water *ad libitum*.

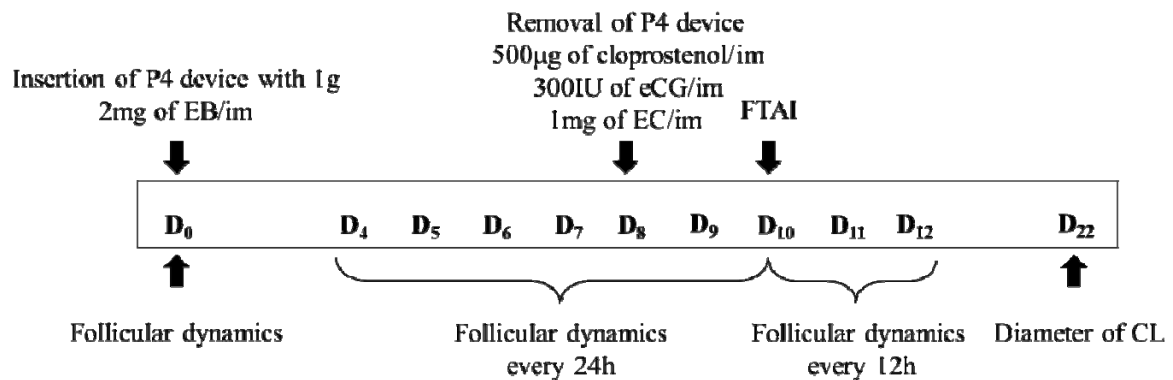
## 2.2. Animal selection

The cows were previously selected according to the low ovarian activity. Palpation and transrectal ultrasonography using an Aloka ultrasound, model SSD-500, equipped with a 5 MHz linear transducer (Aloka, Tokyo, Japan) were performed to select only the cows with absence of CL and large follicles (< 8 mm); (Baruselli et al. 2004).

## 2.3. Experimental design

The animals were randomly allocated into two in groups: 20 cows were subjected to conventional FTAI as outlined in Fig. 1 and another 16 animals received the injectable protocol as described in Fig. 2. In the injectable group, FTAI was performed on D8, 48 h after administration of EC. This timing was established according to the results of previous studies. Only the P4 was different between groups.

**Figura 1** - Schema of the FTAI protocol used for cows that received the intravaginal P4 device, including a schedule of ultrasound evaluations.



P4 - Progesterone (DIB®, Syntex, Buenos Aires, Argentina).

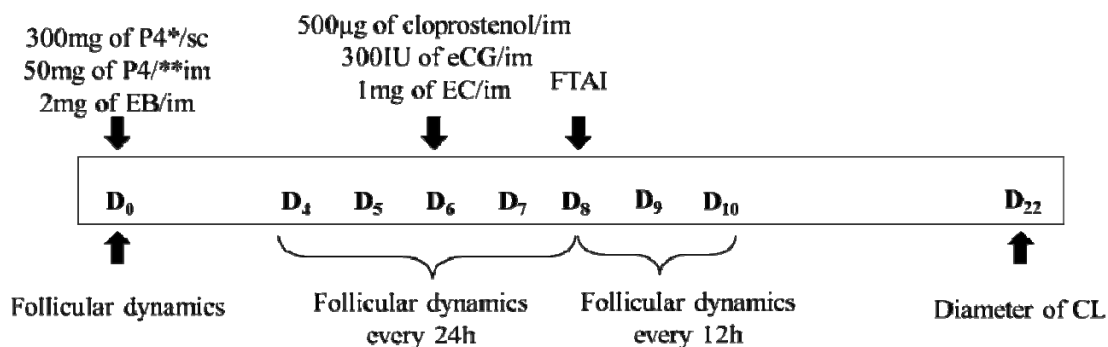
EB - Estradiol benzoate (Syntex®, Syntex, Buenos Aires, Argentina).

Cloprostenol (Cyclase® DL, Syntex, Buenos Aires, Argentina).

eCG - Equine chorionic gonadotropin (Novormon®, Syntex, Buenos Aires, Argentina).

EC - Estradiol cypionate (Cipiosyn®, Syntex, Buenos Aires, Argentina).

**Fig. 2** - Schema of the FTAI protocol used for cows that received the injectable P4, including a schedule of ultrasound evaluations.



\*Natural progesterone in vehicle of slow absorption.

\*\*Natural progesterone in vehicle of fast absorption.

EB - Estradiol benzoate (Syntex®, Syntex, Buenos Aires, Argentina).

Cloprostenol (Cyclase® DL, Syntex, Buenos Aires, Argentina).

eCG - Equine chorionic gonadotropin (Novormon®, Syntex, Buenos Aires, Argentina).

EC - Estradiol cypionate (Cipiosyn®, Syntex, Buenos Aires, Argentina).

#### 2.4. Follicular dynamics

Evaluation of follicular dynamics was performed by transvaginal ultrasonography using an Aloka® ultrasound, SSD-500, equipped with a 7.5 MHz micro convex transducer (Aloka, Tokyo, Japan) and coupled to a follicular aspiration guide.

During the evaluation of follicular dynamics, the following parameters were assessed: the presence of follicles  $\geq 5$  mm on D4, the diameter of the dominant follicle (DF) at FTAI, the diameter of the ovulatory follicle (OF), the ovulation rate and the average diameter of the CL. All data were obtained in both ovaries and recorded individually for further monitoring.

For each evaluation, both ovaries were scanned by ultrasound. Follicles  $\geq 5$  mm were identified and measured by ultrasound own resources, taking into account the average of two cross-sectional linear measurements of the follicular antrum (Ginther et al. 1989).

The DF was defined as the one that grew to at least  $> 8$  mm and exceeded the diameter of all other follicles (Figueiredo et al. 1997). Ovulation was monitored by ultrasound every 12 h after FTAI, detected by the absence of the previously identified DF and confirmed by the later presence of a CL in the same ovary (Ginther et al. 1989).

On the 12th day after FTAI, the diameter of the CL was measured in the same ovary that previously contained the DF. The diameter of the CL was determined by the average of two linear measurements of the cross-sectional surface of the CL (Ginther et al. 1989).

### *2.5. Parameters evaluated and statistical analyses*

The groups were evaluated for the presence of follicles  $\geq 5$  mm on D4 (%), the average rate of follicular growth (mm/day), the diameter of the DF at FTAI (mm), the diameter of the OF (mm), the ovulation rate (%) and the average diameter of the CL (mm).

Individual information from each cow was collected in a data set for statistical analysis. The average rate of follicular growth was calculated for each cow of each group according Figueiredo et al. (1997).

Quantitative variables such as average rate of follicular growth, diameter of the DF at FTAI, and diameter of the OF and CL were assessed by analysis of variance (ANOVA). If the difference between groups (P4 device vs. P4 injectable) was significant, data were examined by Student T test. Frequency data such as the presence of follicles  $\geq 5$  mm on D4 and ovulation rate were analyzed by Fisher's exact test.

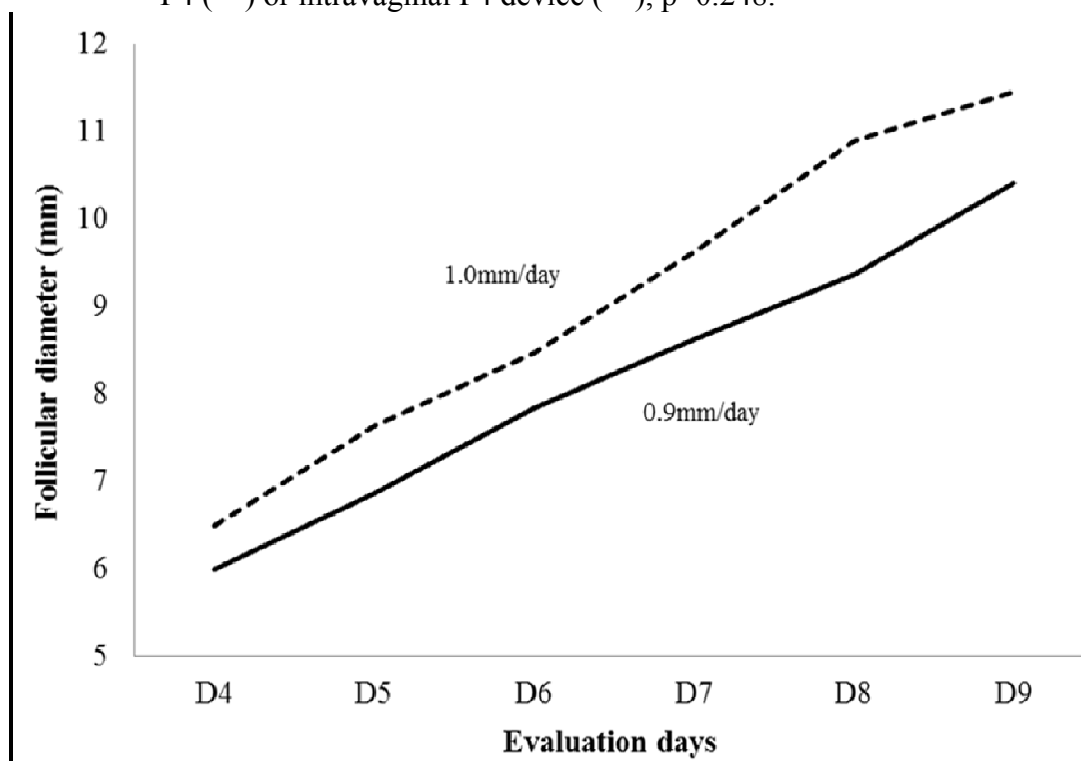
All data were analyzed using the Statistical Software MNITAB15 program. The significance level for rejecting the H0 (null hypothesis) was 5%; namely, a level of significance  $< 0.05$  was considered to be the effect of categorical variables and their interactions. Data are given as the mean  $\pm$  one standard deviation (M $\pm$ SD).

## **3. Results**

The ultrasonography performed on D4 showed that follicles  $\geq 5$  mm were present in 65% of cows (13/20) from the device group and 75% of cows (12/16) from the injectable group ( $p=0.718$ ), with a mean follicular diameter of  $5.9\pm 0.6$  and  $6.5\pm 0.7$  mm, respectively ( $p=0.086$ ).

The average rate of follicular growth this experiment is shown in Fig. 3.

**Figura 3** - The average rate of follicular growth of Nelore cows synchronized by injectable P4 (---) or intravaginal P4 device (—),  $p=0.248$ .



The ovulation rate up to 48 h after FTAI was 90% (18/20) for the device group and 37.5% (6/16) for the injectable group ( $p=0.001$ ). In the device group, ovulation occurred at the following times: 0 to 12 h, 5% (1/20); 12 to 24 h, 70% (14/20); 24 to 36 h, 15% (3/20); and no ovulation from 36 to 48 h. There was no ovulation from 0 to 12 h in the injectable group; however, ovulation was later observed in 18.8% (3/16) between 12 and 24 h, 6.2% (1/16) between 24 and 36 h and 12.5% (2/16) between 36 and 48 h.

Table 1 shows the diameter of the DF at FTAI, diameter of the OF and the diameter of the CL as the mean  $\pm$  SD.

**Table 1** - Average diameter of the dominant follicle (DF) at FTAI, ovulatory follicle (OF) and corpus luteum (CL) of Nelore cows synchronized with protocol-based injectable P4 or intravaginal P4 device.

Variables	Groups		p-value
	Device	Injectable	
Average diameter of the DF at FTAI (mm)	11.4±1.4	10.8±1.8	0.320
% total of follicles 8.5 - 11 mm at FTAI	35	50	-
% total of follicles 11.1 - 14.4 mm at FTAI	65	50	-
Average diameter of the OF (mm)	12.1±1.4	12.3±1.6	0.880
% total of OF from 8.5 - 11 mm	27.7	16.6	-
% total of OF from 11.1 - 14.4 mm	66.6	83.3	-
% total of OF > 14.4 mm	5.5	-	-
Average diameter of CL (mm)	18.7±4.3	17.7±3.6	0.581

#### 4. Discussion

The FTAI protocol with injectable P4 showed similar follicular dynamics compared to the cows synchronized with an intravaginal device. However, the injectable group showed lower ovulation rate, possibly due to progesterone metabolism.

In the present study, we evaluated the presence of follicles  $\geq 5$  mm on D4, when 65% of cows in the device group showed follicles with a mean diameter of  $5.9\pm 0.6$  mm and 75% of cows injectable group had follicles with a mean diameter of  $6.5\pm 0.7$  mm. The exact time of follicular emergence was not determined, however, these results from D4 demonstrate that injectable P4 was effective in producing a follicular wave.

The average rate of follicular growth in our study was  $0.9\pm 0.2$  mm/day for the device group and  $1.0\pm 0.4$  mm/day for the injectable group ( $p=0.248$ ). During evaluation of the natural follicular dynamics of multiparous *Bos indicus* cows, Coutinho et al. (2007) found similar growth rates with  $1.0\pm 0.1$  mm/day in cows with three waves per cycle and  $0.8\pm 0.1$  mm/day in the cows with two waves per cycle.

To determine a dose of P4 that allows control of ovarian follicular waves, Callejas et al. (2006) also evaluated the follicular growth rate and diameter of the DF in *Bos taurus* cows treated with the following daily doses of P4: 600 mg, 400 mg, 200 mg and no P4 (control group). P4 was given im and administered daily from days 3 to 9 of the estrous cycle. The average rate of follicular growth was greater for the control group ( $1.63\pm 0.30$  mm/day) than

for 200 mg ( $0.56 \pm 0.19$  mm/day), 400 mg ( $0.6 \pm 0.23$  mm/day) and 600 mg ( $0.11 \pm 0.13$  mm/day). The control group also demonstrated a greater mean DF diameter ( $14.3 \pm 1.3$  mm) than groups treated with P4 doses of 200 mg ( $8.8 \pm 1.1$  mm), 400 mg ( $8.2 \pm 0.8$  mm) or 600 mg ( $6.6 \pm 0.6$  mm). In our experiment, the dose of injectable P4 used (350 mg P4 only on D0) induced follicular growth rates similar to the device group. If compared to study Callejas et al. (2006), was greater than cows given daily P4 and less than those receiving no hormone treatment.

The average diameter of the DF at FTAI was similar between groups,  $11.4 \pm 1.4$  mm for the device group and  $10.8 \pm 1.8$  mm for the injectable group. In a study of follicular dynamics in *Bos taurus* beef cows, Mackey et al. (2000) investigated the effect of P4 administration alone or in combination with estradiol. They observed a greater DF diameter than recorded in the present study, with variation from  $12.5 \pm 0.6$  to  $16.0 \pm 0.7$  mm. Higher average has been demonstrated in *Bos taurus* compared to *Bos indicus* cows (Figueiredo et al. 1997). In Nelore cows, however, Sales et al. (2012) found an average DF diameter of  $13.4 \pm 0.4$  mm at FTAI when ovulation was induced by EB. Siqueira et al. (2009) found similar data in *Bos taurus* beef cows, which had follicular diameters of  $10.5 \pm 0.1$ ,  $10.7 \pm 0.1$  and  $10.6 \pm 0.4$  mm when synchronized with intravaginal devices containing 250 mg of medroxyprogesterone acetate, devices containing 250 mg of medroxyprogesterone acetate plus 100 mg of P4 given im, or 1 g of P4, respectively.

In our study, 65% of cows from the device group presented with follicles between 11.1 and 14.4 mm and 35% between 8.5 and 11 mm, very close to other results in *Bos indicus* females with P4 device (Sá Filho et al. 2010). In the injectable group, 50% of cows presented with follicles between 11.1 and 14.4 mm and 50% between 8.5 and 11 mm. Fewer cows in the injectable group had follicles  $> 11$  mm at FTAI. The ultrasonography performed 48 h after FTAI showed that over half of non-ovulating cows continued with DF growth; thus, it is possible that the DF of cow receiving injectable P4 requires a longer growth period.

Considering only cows that ovulated, 28% of device group (5/18) ovulated follicles between 8.5 and 11 mm, 67% (12/18) produced follicles between 11.1 and 14.4 mm and the remaining 6% (1/18) ovulated follicles  $> 14.4$  mm. In the injectable group, 17% (1/6) ovulated follicles between 8.5 and 11 mm and 83% (5/6) between 11.1 and 14.4 mm. The injectable group demonstrated a lower ovulation rate than the device group, with only 37.5% (6/16) ovulating in comparison to 90% (18/20), respectively ( $p=0.001$ ). In both groups, most cows that ovulated did so within 12-24 h of FTAI (18.8% of the injectable and 70% of the device). In postpartum Nelore cows synchronized with an estradiol/P4-based FTAI protocol,

Sales et al. (2012) observed a lower ovulation rate to the device group, with 77.8% of cows (21/27) induced by EB and 82.8% (24/29) by EC. The ovulation rate of the injectable group was lower than observed in the device group or in the literature.

In the device group we observed ovulatory response similar to that reported by (Sá Filho et al. 2010). These authors reported that the size of the DF at FTAI has a positive correlation with the ovulation rate. Gimenes et al. (2008) reported that in *Bos indicus* cattle, the ovulatory response rate is 33%, 80% and 90% for follicles of 7 - 8.4 mm, 8.5 - 10 mm and > 10 mm, respectively.

In the present study, all cows given an intravaginal device responded to the synchronization protocol, and 90% ovulated. All cows given the injectable P4 also responded to the protocol, presenting with a wave of follicular growth and follicles > 8.5 mm at FTAI; however, in this group only 37.5% ovulated. Perhaps it may be influenced by BCS (Rodrigues et al. 2011), since cows with BCS around 3 had better ovulation rate. Possibly cows with high or low BCS has a lower rate of P4 injectable metabolism.

The ultrasonography performed 48 h after FTAI also showed that over half of non-ovulatory cows continued to experience DF growth. A longer period of DF growth may enhance the ovulation rate and delay P4 metabolism. Another possibility would be to test other ovulation inducers, such as GnRH or LH. A study of the plasma profile of injectable P4 may result in important information to better direct its use in FTAI protocols.

In the present study, the size of the CL was evaluated 12 days after FTAI. Machado et al. (2008) reported that the maximum size of the CL occurs between days 13.4 and 14.4 of the estrous cycle, and a maximum concentration of P4 occurs between days 12.2 and 15.2.

In summary, postpartum Nelore cows subjected to the FTAI protocol with injectable P4 showed that follicles  $\geq 5$  mm on D4, follicular growth, diameters of the DF, OF and CL were all similar to those observed in the cows synchronized with an intravaginal device. However, the ovulation rate was significantly higher in the device group. It is possible that injectable P4 undergoes different metabolism, resulting in variable levels of LH. Further studies are necessary to better inform the use of injectable P4 in FTAI protocols in *Bos indicus* females.

### **Acknowledgements**

We acknowledge to Dr. Renato Castanho Francisco for supporting in this study, to staff of Farm Santa Edwiges (Yby Yaú, Paraguay) for allowing the use of their animals and facilities for this study and to Graduate Program in Animal Science from the State University of

Londrina, Londrina, Parana, Brazil. This research was supported by Farm Santa Edwiges and Coordination for the Improvement of Higher Level or Education Personnel (CAPES).

## References

- Ayres H, Ferreira RM, Torres-Júnior JRS, Demétrio CGB, Lima CG, Baruselli PS, 2009: Validation of body condition score as a predictor of subcutaneous fat in Nelore (*Bos indicus*) cows. *Livestock Sci* 123, 175-179.
- Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bó GA, 2004: The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci* 82-83, 479-486.
- Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Mapletoft RJ, 2002: The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 57, 53-72.
- Callejas SS, Alberio R, Cabodevila J, Dulout AF, Aller J, Catalano R, Teruel M, 2006: Influence of different doses of progesterone treatments on ovarian follicle status in beef cows. *Anim Reprod Sci* 91, 191-200.
- Coutinho GTRM, Viana JHM, Sá WF, Camargo LS, Ferreira AM, Palhão PM, Nogueira LAG, 2007: Avaliação ultra-sonográfica da dinâmica folicular e lútea em vacas da raça Guzará. *Arq Bras Med Vet Zootec* 59, 1089-1096.
- Figueiredo RA, Barros CM, Pinheiro OL, Soler JMP, 1997: Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology* 47, 1489-1505.
- Fike KE, Wehrman ME, Lindsey BR, Bergfeld G, Melvin EJ, Quintal JA, Zanella EL, Kojima FN, Kinder JE, 1999: Estrus Synchronization of Beef Cattle with a Combination of Melengestrol Acetate and an Injection of Progesterone and 17 $\beta$ -Estradiol. *J Anim Sci* 77, 715-723.
- Gimenes LU, Sá Filho MF, Carvalho NA, Torres-Junior JR, Souza AH, Madureira EH, Trinca LA, Sartorelli ES, Barros CM, Carvalho JB, Mapletoft RJ, Baruselli PS, 2008: Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology* 69, 852-858.
- Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP, 1989: Temporal association among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fert* 87, 223-230.
- Machado R, Bergamaschi MACM, Barbosa RT, Oliveira CA, Binelli M, 2008: Ovarian function in Nelore (*Bos taurus indicus*) cows after post-ovulation hormonal treatments. *Theriogenology* 69, 798-804.
- Mackey DR, Sreenan JM, Roche JF, Diskin MG, 2000: The effect of progesterone alone or in combination with estradiol on follicular dynamics, gonadotropin profiles, and estrus in beef cows following calf isolation and restricted suckling. *J Anim Sci* 78, 1917-1929.

- Rodrigues RO, Trevisanuto C, Cooke RF, Vasconcelosa JLM, 2011: Effects of body weight loss on serum progesterone concentrations of non-lactating dairy cows. *Theriogenology* 75, 131-137.
- Sá Filho MF, Crespilho AM, Santos JEP, Perry GA, Baruselli PS, 2010: Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrus response influences the likelihood of ovulation and pregnancy after synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Anim Reprod Sci* 120, 23-30.
- Sales JNS, Carvalho JBP, Crepaldi GA, Cipriano RS, Jacomini JO, Maio JRG, Souza JC, Nogueira GP, Baruselli PS, 2012: Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* 78, 510-516.
- Savio JD, Tatcher WW, Badinga L, de la Sota RL, Wolfenson D, 1993: Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *J Reprod Fertil* 97, 197-203.
- Siqueira LC, Oliveira JF, Rovani MT, Ferreira R, Borges LF, Gonçalves PB, 2009: Effects of estradiol and progestins on follicular regression before, during, and after follicular deviation in postpartum beef cows. *Theriogenology* 71, 614-619.
- Stock AE, Fortune JE, 1993: Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth and the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology* 132, 1108-1114.
- Ulberg LC, Lindley CE, 1960: Use of Progesterone and Estrogen in the Control of Reproductive Activities in Beef Cattle. *J Anim Sci* 19, 1132-1142.

**Author's address (for correspondence):** Marcelo Marcondes Seneda, Laboratório de Reprodução Animal, DCV, CCA, UEL, Londrina - PR. Cep: 86051-990, Brazil. Tel.: +55 43 3371 4064; Fax: +55 43 3371 4063.  
E-mail address: mseneda@uel.br (M.M. Seneda).

## ARTIGO II - Original paper

### Fixed-time artificial insemination with injectable progesterone: Ovarian follicular dynamics and pregnancy rates of Nelore (*Bos indicus*), with and without corpus luteum

\* Laboratory of Animal Reproduction, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

**Abstract:** This study aims to evaluate the ovarian follicular dynamics and pregnancy rate of Nelore cows, with or without corpus luteum (CL), subjected to fixed-time artificial insemination (FTAI) with injectable progesterone (P4) or intravaginal device. Forty-four multiparous cows were allocated into a 2x2 factorial. Twenty-two cows (11 with and 11 without CL) received an intravaginal device with 1 g of P4 and 2 mg estradiol benzoate (EB) intramuscularly (im) on D0. The device was removed on D8, followed by administration of 500 µg of cloprostenol and 300 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG), im. On D9, 1 mg of EB im was administered and FTAI performed on D10. Other 22 cows (11 with and 11 without CL) received 350 mg of P4 (300 mg subcutaneously and 50 mg im) and 2 mg of EB im on D0. On D6, 500 µg of cloprostenol and 300 IU of eCG were administered im. On D7, 1 mg of EB, im was administered and FTAI performed on D8. Ultrasonography was performed to determine follicular parameters. Cows with or without CL, treated with injectable P4 or intravaginal device showed similar follicles  $\geq 5$  mm on D4, rate of follicular growth, of behavioral estrus and diameter of CL ( $p>0.05$ ). Animals synchronized with an intravaginal device showed larger diameter of the dominant follicle (DF); ( $11.7\pm 2.0$  mm) and ovulatory follicle (OF); ( $11.8\pm 1.7$  mm) than those received injectable P4 ( $9.7\pm 1.7$  and  $10.6\pm 1.8$  mm, respectively); ( $p<0.05$ ). Absence of CL in cows synchronized with intravaginal device showed better diameter of OF ( $12.4\pm 1.3$  mm) compared with those treated with injectable P4 ( $10\pm 2.0$  mm); ( $p<0.05$ ). The ovulation occurred in 59% (13/22) of cows with CL, 77.2% (17/22) of animals without CL, 90.9% (20/22) of treated with intravaginal device and 45.5% (10/22) of synchronized with injectable P4 ( $p<0.05$ ). Cows without CL synchronized with intravaginal device showed better ovulation rate (100%, 11/11) than those treated with injectable P4, without CL (54.5%, 6/11) and with CL (36.3%, 4/11); ( $p<0.05$ ). The pregnancy rate was larger in the intravaginal device group (45.4%; 10/22) compared to injectable P4 groups (18.1%; 4/22); ( $p=0.05$ ). Despite the similarity in the follicles  $\geq 5$  mm on D4, rate of follicular growth, of behavioral estrus and diameter of CL, cows synchronized with intravaginal device showed better diameter of the DF at FTAI, of the OF, the ovulation and pregnancy rates.

**Keywords:** *Bos indicus*. Ultrasonography. Follicular growth. Ovulation and dominant follicle.

---

\* Corresponding author. Marcelo Marcondes Seneda, Laboratório de Reprodução Animal, DCV, CCA, UEL, Londrina - PR. Cep: 86051-990, Brazil. Tel.: +55 43 3371 4064; Fax: +55 43 3371 4063. E-mail address: mseneda@uel.br (M.M. Seneda).

## 1. Introduction

The Brazil holds a privileged position in the scenery of artificial insemination (AI) in cattle, by has the largest commercial herd (200 million of bovines) and the largest market of fixed-time artificial insemination (FTAI) in the world. Recently, AI showed expressive growth and this progress was mainly due to the use of FTAI that in 2002 about 100.000 cows were inseminated and in 2011 the FTAI reached 6.5 million of females.

The progesterone (P4) or progestin is the principal hormonal basis to synchronization of estrus in most programs of FTAI in cattle. This hormone may be used in the form intravaginal device, ear implant or oral administration [1].

During the treatment with intravaginal device (5-10 days), the P4 exerts negative feedback on estradiol and inhibits the LH surge, preventing estrus and ovulation of the dominant follicle (DF) [1]. When associated with estrogen on D0 promotes regression of the DF and synchronized emergence of a new follicular wave. The end of treatment, PGF2 $\alpha$  can be given to promote estrus synchronization and estradiol, GnRH or LH to induce ovulation synchronization [2].

Currently, there are many estradiol/P4-based FTAI, that are efficient in the control estrus and ovulation of cattle [3, 4], but all progress to facilitate the reproductive management, minimize service, reduce costs, it is necessary to remain at the forefront of new advances in reproductive biotechnology. In this respect, the use of an injectable P4 source to control the estrous cycle would improve current FTAI programs and others reproductive biotechnologies, because one of the major advantages of injectable P4 is the labor reduction when FTAI it is used in large scale.

The effects of injectable P4 in control estrous cycle of cattle [5, 6] or in FTAI protocols (Morotti et al., unpublished) has been poorly studied. Therefore, the aim of this study was to evaluate ovarian follicular dynamics and pregnancy rate of Nelore cows (*Bos indicus*), with or without CL, subjected to FTAI with injectable P4 or intravaginal P4 device.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Site, animals and feed management

The experiment was conducted during the breeding season (November to March) in South America, latitude 23° 24' 23" and longitude 57° 26' 4". The climate in this region is tropical, with an average temperature of 24°C and a rainy season from November to January.

Forty-four, multiparous Nelore cows (*Bos indicus*) between 72 and 84 months of age and with 45 to 60 days postpartum were used in this study. The animals had a body condition score (BCS) between 2.5 and 3.5 ( $2.8 \pm 0.1$ ) using a scale of 0 to 5 [7] and average weight of  $410.3 \pm 47.5$  kg.

During the experimental period, the cows were maintained by continuous grazing of *Brachiaria brizantha* and *Brachiaria humindícula*. They were given access to mineralized salt and water *ad libitum*.

## 2.2. Animal selection

The cows were previously selected according to ovarian activity. Palpation and transrectal ultrasonography using an Aloka ultrasound, model SSD-500, equipped with a 5 MHz linear transducer (Aloka, Tokyo, Japan) were performed to select 22 cows with CL and 22 cows without CL and large follicles  $< 8$  mm [1].

## 2.3. Experimental design and treatments

The selected animals were allocated into a 2x2 factorial. Eleven cows with and 11 without CL were subjected to conventional FTAI using an intravaginal device containing 1 g of P4 (DIB®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) and intramuscular (im) application of 2 mg estradiol benzoate (EB); (Syntex®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) on D0. Eight days later (D8) the device was removed and 500 µg of cloprostenol (DL Cyclase®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) and 300 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG); (Novormon®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) were applied im. On D9, 1 mg of EB (Syntex®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) was applied im and FTAI performed on D10, 48h after device removal.

Other cows (11 with and 11 without CL) received 350 mg of injectable P4 (300 mg subcutaneously<sup>1</sup> and 50 mg im<sup>2</sup>) and 2 mg of EB (im) on D0. Six days later (D6), 500 µg of cloprostenol and 300 IU of eCG were applied im. On D7, 1 mg of EB im was administered and FTAI performed on D8, 24h after the ovulation inductor. This timing was established according to the results of previous studies.

---

<sup>1</sup> Natural progesterone in vehicle sesame and peanut oil (slow absorption).

<sup>2</sup> Natural progesterone in vehicle sesame and peanut oil (fast absorption).

#### 2.4. Follicular dynamics

The follicular dynamics was performed by transvaginal ultrasonography using an Aloka® ultrasound, SSD-500, equipped with a 7.5 MHz micro convex transducer (Aloka, Tokyo, Japan) and coupled to a follicular aspiration guide.

Evaluations were performed on D0, D4 and every 24 h until FTAI. The ovulation was monitored every 12 h after insemination and assessment of the CL 12 days after FTAI. All data were obtained in both ovaries and recorded individually for further monitoring.

For each evaluation, both ovaries were scanned by ultrasound and follicles  $\geq 5$  mm were identified and measured by ultrasound own resources, taking into account the average of two cross-sectional linear measurements of the follicular antrum [8].

Behavioral estrus was observed twice daily during 1 h at 6:00 a.m. and 7:00 p.m. Observations began at the time of cloprostenol administration (D6 to injectable P4 and D8 to intravaginal device) until 60 h after. Estrus was considered to have occurred when the cow stood to be mounted by another cow (standing estrus).

The DF was defined as the one that grew to at least  $> 8$  mm and exceeded the diameter of all other follicles [9]. Ovulation was detected by the absence of the previously identified DF and confirmed by the later presence of a CL in the same ovary. On the 12th day after FTAI, the CL was measured in the same ovary that previously contained the DF [8]. The pregnancy rate was determined by ultrasonography, 35 days after of FTAI.

#### 2.5. Parameters evaluated and statistical analyses

The animals were evaluated for the presence of follicles  $\geq 5$  mm on D4 (%), the average rate of follicular growth (mm/day), the rate of behavioral estrus (%), the diameter of the DF at FTAI (mm), the diameter of the ovulatory follicle (OF); (mm), the ovulation rate (%), the diameter of the CL (mm) and of pregnancy rate (%).

Parametric data were assessed by analysis of variance (ANOVA). If the difference between groups was significant, data were examined by Tukey's test. Frequency data and dichotomous variables were analyzed by Chi-Square test.

All data were analyzed using the Statistical Software MNITAB16 program. The significance level for rejecting the H0 (null hypothesis) was 5%; namely, a level of significance  $\leq 0.05$  was considered to be the effect of categorical variables and their interactions. Parametric data are given as the mean  $\pm$  one standard deviation (M $\pm$ SD).

### 3. Results and Discussion

Data of follicles  $\geq 5$ mm on D4, follicular growth, estrous behavior rate and diameter of CL were similar between cows synchronized with intravaginal device or injectable P4. However, the animals that received injectable P4 showed lower diameter of the DF at FTAI, diameter of the OF and ovulation and pregnancy rates (Table 1).

The average rate of follicular growth in our study was similar between groups that received an intravaginal device ( $1.10 \pm 0.3$  mm/day) or an injectable P4 ( $1.19 \pm 0.4$  mm/day); ( $p=0.403$ ). No interaction was observed between the ovarian activity and P4 used, namely, the cows treated with injectable P4 or intravaginal device, regardless of the presence or absence of CL, did not influence the rate of follicular growth. This data are similar when compared with Coutinho et al. [10] ( $1.0 \pm 0.1$  mm/day) in multiparous *Bos indicus* cows and higher than found by Callejas et al. [11] in *Bos taurus* cows treated with the following daily doses of P4: 600 ( $0.1 \pm 0.1$  mm/day), 400 ( $0.6 \pm 0.2$  mm/day) and 200 ( $0.5 \pm 0.1$  mm/day). In this study, the dose of injectable P4 (350 mg P4 only on D0) induced similar follicular growth rates with intravaginal device.

The cows synchronized with intravaginal device showed larger diameter of the DF at FTAI ( $11.7 \pm 2.0$  mm) compared with those receiving injectable P4 ( $9.7 \pm 1.7$  mm); ( $p=0.003$ ). However was not interaction observed between the ovarian activity and P4 used. In *Bos indicus* beef cows synchronized with an estradiol/P4-based FTAI protocol Sá Filho et al. [3] found an average diameter of  $11.1 \pm 0.3$  mm at FTAI. Siqueira et al. [12] also found similar data in *Bos taurus* beef cows, which had follicular diameters of  $10.5 \pm 0.1$ ,  $10.7 \pm 0.1$  and  $10.6 \pm 0.4$  mm when synchronized with intravaginal device containing 250 mg of medroxyprogesterone acetate, intravaginal device with 250 mg of medroxyprogesterone acetate plus 100 mg of P4 given im or intravaginal device with 1 g of P4, respectively.

The cows synchronized with intravaginal device showed larger diameter of OF ( $11.8 \pm 1.7$  mm) than the cows that received injectable P4 ( $10.6 \pm 1.8$  mm); ( $p=0.005$ ). In this variable, the association of factors, intravaginal device and absence of CL, provided better diameter of OF ( $12.4 \pm 1.3$  mm) than factors, injectable P4 and absence of CL ( $10 \pm 2.0$  mm); ( $p=0.033$ ). On the other hand, the presence of CL in cows treated with injectable P4 ( $12.2 \pm 1.4$  mm) showed similar results with those that received intravaginal device ( $12.1 \pm 1.2$  mm); ( $p>0.05$ ); (Table 2). In postpartum beef cows, OF size can vary widely and may be  $< 11$  mm or  $> 16$  mm [13]. The data of present study (intravaginal and injectable groups) showed lower

diameter of OF than found by Sales et al. [4] that in Nelore cows undergoing FTAI observed  $13.1\pm 0.4$  and  $13.9\pm 0.4$ mm to ovulation induced by EB and EC, respectively.

**Table 1** - Follicular dynamics data and pregnancy of Nelore cows, with or without CL, synchronized with protocol-based injectable P4 or intravaginal device.

Treatments		Follicles $\geq$ 5mm on D4 (% / mm)	Follicular growth (mm/day)	Estrous behavior (%)	Diameter of the DF at FTAI (mm)	Diameter of the OF (mm)	Ovulation rate (%)	Diameter of CL (mm)	Pregnancy rate (%)
<b>Corpus luteum</b>	<i>Present</i>	49.9 6.1 $\pm$ 0.8	1.14 $\pm$ 0.3	77.2	10.5 $\pm$ 1.8	11.4 $\pm$ 1.3	59.0	17.3 $\pm$ 3.8	36.3
	<i>Absent</i>	54.5 6.6 $\pm$ 0.8	1.15 $\pm$ 0.4	86.3	10.8 $\pm$ 2.3	11.1 $\pm$ 2.2	77.2	16.6 $\pm$ 3.2	27.2
	<i>p-value</i>	0.165	0.942	0.434	0.705	0.563	0.195	0.489	0.517
<b>Progesterone</b>	<i>Intravaginal</i>	49.9 6.2 $\pm$ 0.8	1.10 $\pm$ 0.3	81.2	11.7 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	11.8 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	90.9 <sup>a</sup>	17.6 $\pm$ 3.5	45.4 <sup>a</sup>
	<i>Injectable</i>	54.5 6.5 $\pm$ 0.9	1.19 $\pm$ 0.4	81.2	9.7 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>	10.6 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>	45.5 <sup>b</sup>	16.1 $\pm$ 3.4	18.1 <sup>b</sup>
	<i>p-value</i>	0.376	0.403	1.00	0.003*	0.005*	0.001*	0.211	0.050*
<b>CL vs. P4</b>	<i>Mean</i>	6.4 $\pm$ 0.8	1.14 $\pm$ 0.3	81.5.2	10.7 $\pm$ 2.1	11.3 $\pm$ 1.8	68.1	17.0 $\pm$ 3.4	31.8
	<i>Interaction</i>	0.958	0.301	0.748	0.564	0.033* <sup>1</sup>	0.007* <sup>2</sup>	0.594	0.203

\* Statistical difference ( $p < 0.05$ ).

Different letters (a, b) within a column, numbers statistically different ( $p < 0.05$ ) for interaction between all factors.

(1, 2) To effect of injectable P4 and intravaginal device of cows with or without CL on the diameter of OF and ovulation rate refer to the Table 2.

**Table 2** - Average of diameter of the ovulatory follicle and ovulation rate of Nelore cows, with or without CL, synchronized with protocol-based injectable P4 or intravaginal device.

<b>Progesterone vs. Corpus luteum</b>	<b>Ovulatory follicle<sup>1</sup> (mm)</b>	<b>Ovulation rate<sup>2</sup> (%)</b>
Injectable P4 with CL	12.2±1.4 <sup>a</sup>	36.3 <sup>c</sup>
Injectable P4 without CL	10±2.0 <sup>b</sup>	54.5 <sup>bc</sup>
Intravaginal device with CL	12.1±1.2 <sup>a</sup>	81.8 <sup>ab</sup>
Intravaginal device without CL	12.4±1.3 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>

Different letters (a, b, c) within a column, numbers statistically different ( $p < 0.05$ ).

The ovulation rate was lower in the animals treated with injectable P4 (45.5%, 10/22) than those synchronized with intravaginal device (90.9%, 20/22); ( $p=0.001$ ). Furthermore, it was observed an interaction between ovarian activity and P4 used ( $p=0.007$ ). Cows without CL and that received an intravaginal device showed better ovulation rate (100%, 11/11) than those treated with injectable P4, without CL (54.5%, 6/11) and with CL (36.3%, 4/11). However, cows without CL synchronized with injectable P4 showed similar ovulation rate those with CL treated with intravaginal device (81.8%, 9/11); (Table 2). Most cows ovulated within 12-24 h of FTAI (90% to injectable P4 and 95% to intravaginal device). In Nelore cows synchronized with an estradiol/P4-based FTAI protocol Sales et al. [4] observed a lower ovulation rate to the intravaginal device, with 77.8% of cows (21/27) induced by EB. The ovulation rate of the injectable P4 was lower than observed in the control or in the literature.

Actually, estradiol/P4-based FTAI protocols are highly efficient in synchronizing of wave of follicular growth and ovulation in *Bos indicus* cows [4, 14]. In the present study, only one cow of intravaginal device showed no follicular recruitment and growth, 95% of them responded to protocol and 90.9% ovulated. All cows given the injectable P4 showed follicular recruitment and growth, with follicles  $> 7$  mm at FTAI; however, only 45.4% of this group ovulated.

Beyond individual characteristics on the P4 metabolism, it is possible that the BCS also has some influence [15] resulting in variable levels of LH and affecting the ovulation. In the present study, the ovulation rate was better in cows with BCS close to 3.

In the animals of injectable P4, the ultrasonography performed until 48 h after FTAI also showed that some non-ovulatory cows continued to experience DF growth following by reduction in the diameter without achieve the ovulation. Maybe, a longer period of DF growth may enhance the diameter of the OF and ovulation rate. It could also to use others ovulation inducers, such as GnRH and LH. A study of the plasma profile of injectable P4 may result in important information to better direct its use in FTAI protocols.

In our study, the small number of animals ( $n=44$ ) is a limitation to evaluation the pregnancy rate, nevertheless we consider important to provide this data. The pregnancy rate was larger in the cows synchronized with intravaginal device (45.4%, 10/22) compared than those treated with injectable P4 (18.1%, 4/22); ( $p=0.05$ ). Similar data, was found in beef cows treated with 50 mg of P4 daily (for 14 days) followed 72 h later by 0.5 mg of EB, with 15% (4/26) of pregnancy rate. Already the animals that received 25mg of P4 and 1 mg of EB, the pregnancy rate was 38% (16/42) [5]. The lower fertility in our study was due a lower

ovulation rate of animals that received injectable P4. Despite the effect of P4 on the pregnancy rate, it was not observed interaction between ovarian activity and P4 used.

Pregnancy data of intravaginal device were lower than those found by Bader et al. [16], Schafer et al. [17] but similar found by Colazo et al. [18]. Studying Nelore cows synchronized with intravaginal P4 device, Silveira et al. [19] reported pregnancy rates of 53%. On the other hand, Baruselli et al. [20] obtained 43% and reported that these variations are attributed to different management of properties, allowing a diversification in pregnancy rate of 40 to 60%.

In conclusion, Nelore cows subjected to a FTAI protocol with injectable P4 showed similarity in the follicles  $\geq 5$  mm on D4, rate of follicular growth, of behavioral estrus and diameter of CL compared with intravaginal device. However the diameter of the DF at FTAI, of the OF, the ovulation and pregnancy rates were larger in the protocol with intravaginal device. It is possible that injectable P4 is not completely metabolized during the treatment for FTAI, resulting in variable levels of LH and blocking ovulation. Further studies are necessary to better clarify the use of injectable P4 at FTAI protocols.

### **Acknowledgements**

We acknowledge to Dr. Renato Castanho Francisco for supporting in this study, to staff of Farm Santa Edwiges (Yby Yauú, Paraguay) for allowing the use of their animals and facilities for this study and to Graduate Program in Animal Science from the State University of Londrina, Londrina, Parana, Brazil. This research was supported by Farm Santa Edwiges and Coordination for the Improvement of Higher Level or Education Personnel (CAPES).

### **References**

- [1] Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bó GA. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci* 2004; 82/83:479-86.
- [2] Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Mapletoft RJ. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 2002; 57:53-72.
- [3] Sá Filho MF, Crespilho AM, Santos JEP, Perry GA, Baruselli PS. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrus response influences the likelihood of ovulation and pregnancy after synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Anim Reprod Sci* 2010; 120:23-30.

- [4] Sales JNS, Carvalho JBP, Crepaldi GA, Cipriano RS, Jacomini JO, Maio JRG, Souza JC, Nogueira GP, Baruselli PS. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* 2012; 78:510-16.
- [5] Ulberg LC, Lindley CE. Use of progesterone and estrogen in the control of reproductive activities in beef cattle. *J Anim Sci* 1960; 19:1132-42.
- [6] Fike KE, Wehrman ME, Lindsey BR, Bergfeld G, Melvin EJ, Quintal JA, Zanella EL, Kojima FN, Kinder JE. Estrus synchronization of beef cattle with a combination of melengestrol acetate and an injection of progesterone and 17 $\beta$ -estradiol. *J Anim Sci* 1999; 77:715-23.
- [7] Ayres H, Ferreira RM, Torres-Júnior JRS, Demétrio CGB, de Lima CG, Baruselli PS. Validation of body condition score as a predictor of subcutaneous fat in Nelore (*Bos indicus*) cows. *Livestock Sci* 2009; 123:175-9.
- [8] Ginther OJ, Knopf, L, Kastelic, JP. Temporal association among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and three follicular waves? *J Reprod Fert* 1989; 87:223-30.
- [9] Figueiredo RA, Barros CM, Pinheiro OL, Soler JMP. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology* 1997; 47:1489-505.
- [10] Coutinho GTRM, Viana JHM, Sá WF, Camargo LS, Ferreira AM, Palhão PM, Nogueira LAG. Avaliação ultra-sonográfica da dinâmica folicular e lútea em vacas da raça Guzera. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2007; 59:1089-96.
- [11] Callejas SS, Alberio R, Cabodevila J, Dulout AF, Aller J, Catalano R, Teruel M. Influence of different doses of progesterone treatments on ovarian follicle status in beef cows. *Anim Reprod Sci* 2006; 91:191-200.
- [12] Siqueira LC, Oliveira JF, Rovani MT, Ferreira R, Borges LF, Gonçalves PB. Effects of estradiol and progestins on follicular regression before, during, and after follicular deviation in postpartum beef cows. *Theriogenology* 2009; 71:614-19.
- [13] Gimenes LU, Sá Filho MF, Carvalho NA, Torres-Junior JR, Souza AH, Madureira EH, Trinca LA, Sartorelli ES, Barros CM, Carvalho JB, Mapletoft RJ, Baruselli PS. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology* 2008; 69:852-58.
- [14] Sá Filho MF, Santos JE, Ferreira RM, Sales JN, Baruselli PS. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone based timed insemination protocols. *Theriogenology* 2011; 76:455-63.
- [15] Rodrigues RO, Trevisanuto C, Cooke RF, Vasconcelosa JLM. Effects of body weight loss on serum progesterone concentrations of non-lactating dairy cows. *Theriogenology* 2011; 75:131-37.

- [16] Bader JF, Kojima FM, Schafer DJ, Stegner JE, Eilersieck MR, Smith MF, Patterson DJ. A comparison of progestin-based protocols to synchronize ovulation and facilitate fixed-time artificial insemination in postpartum beef cows. *J Anim Sci* 2005; 83:136-43.
- [17] Schafer DJ, Bader JF, Meyer JP, Haden JK, Eilersieck MR, Lucy MC, Smith MF, Patterson DJ. Comparison of progestin-based protocols to synchronize estrus and ovulation before fixed-time artificial insemination in postpartum beef cows. *J Anim Sci* 2007; 85:1940-45.
- [18] Colazo MG, Kastelic JP, Whittaker PR, Gavaga QA, Wilde R, Mapletoft RJ. Fertility in beef cattle given a new or previously used CIDR insert and estradiol, with or without progesterone. *Anim Reprod Sci* 2004; 81:25-34.
- [19] Silveira, EC, Bortolotti, LA, Morotti, F, Seneda, MM Plasmatic level of progesterone and pregnancy rate in Nelore bovine synchronized with new intravaginal progesterone device (Biocowgest®). *Rev Acad Ciênc Agrár Ambient* 2012; in press.
- [20] Baruselli PS, Madureira EH, Marques MO, Rodrigues CA, Nasser LF, Silva RCP, Reis EL, Sá Filho MF. Efeito do tratamento com eCG na taxa de concepção de vacas Nelore com diferentes escores de condição corporal inseminadas em tempo fixo (análise retrospectiva). *Act Sci Vet* 2004; 32:228.

## 5. CONCLUSÕES

---

- Vacas Nelore sincronizadas com protocolo de IATF à base de progesterona injetável apresentam taxa de folículos  $\geq 5$  mm no D4, taxa de crescimento folicular diário, diâmetro do folículo dominante na IATF e tamanho de corpo lúteo semelhantes as vacas sincronizadas com dispositivo intravaginal de progesterona; e
- O diâmetro do folículo pré-ovulatório, a taxa de ovulação e a taxa de prenhez de vacas Nelore sincronizadas com dispositivo intravaginal de progesterona são superiores aos animais tratados com progesterona injetável.