



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DENIS VINICIUS BONATO

**ESTRATÉGIAS TÉCNICAS E FARMACOLÓGICAS PARA O
INCREMENTO DA EFICIÊNCIA REPRODUTIVA EM FÊMEAS
BOVINAS**

Londrina
2020

DENIS VINICIUS BONATO

**ESTRATÉGIAS TÉCNICAS E FARMACOLÓGICAS PARA O
INCREMENTO DA EFICIÊNCIA REPRODUTIVA EM FÊMEAS
BOVINAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda.

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

B699 Bonato, Denis Vinicius.
Estratégias técnicas e farmacológicas para o incremento da eficiência reprodutiva em fêmeas bovinas / Denis Vinicius Bonato. - Londrina, 2020.
70 f.

Orientador: Marcelo Marcondes Seneda.
Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Reprodução de bovinos - Tese. 2. Controle farmacológico de ciclo estral - Tese. 3. Contagem de folículos antrais na espécie bovina - Tese. I. Seneda, Marcelo Marcondes. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619

DENIS VINICIUS BONATO

ESTRATÉGIAS TÉCNICAS E FARMACOLÓGICAS PARA O INCREMENTO DA EFICIÊNCIA REPRODUTIVA EM FÊMEAS BOVINAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes
Seneda
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Fábio Morotti
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Roberta Garbelini Gomes Zanin
Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná -
IAPAR-EMATER

Prof. Dr. Gustavo Martins Gomes dos Santos
Sheep Embryo Reprodução Animal

Prof. Dr. Fábio Luiz Bim Cavalieri
Centro de Ensino Superior de Maringá –
UNICESUMAR

Londrina, 18 de fevereiro de 2020.

Dedico este trabalho a toda minha família, de modo especial a minha mãe Elza e meu irmão José Douglas, que com muito amor e carinho, foram a base para que eu conseguisse me tornar médico veterinário, ajudando a superar as dificuldades, dando o apoio e o incentivo necessário para perseverar em minha caminhada!

À minha amada esposa Francieli, meu alicerce nesses quatro anos de doutorado, sendo conselheira, fonte de carinho, amor, coragem, inspiração, respeito, amizade e muitas alegrias durante essa jornada e os demais dias dos nossos oito anos de casados!

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu a condição de seguir pelos melhores caminhos, pelas oportunidades, proteção e discernimento durante os quatro anos do doutorado.

Ao professor Dr. Marcelo Marcondes Seneda por toda orientação na pesquisa e na formação acadêmica, pela confiança, empolgação e disposição em repassar seu grande conhecimento. Agradeço também pela orientação para a vida, conselhos, amizade e respeito que tem por todos seus alunos. Por tantas vezes, que mesmo sem dizer nada, demonstrou com exemplos o caminho correto a seguir para ser uma pessoa e um profissional melhor.

Aos professores Dr. Fábio Morotti, Dr. Flavio Antonio Barca Junior, Dra. Katia Cristina Silva Santos, Dra. Roberta Garbelini Gomes Zanin, Dr. Gustavo Martins Gomes dos Santos, Dr. Fábio Luiz Bim Cavalieri, pela disponibilidade e contribuições na qualificação e defesa da tese.

A todos os colegas do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (ReproA) pela amizade, ajuda e por toda a troca de experiências, algo que contribuiu de forma fundamental para minha formação. De modo especial agradeço as colegas Camila Rosa e Camila Bizarro que me ajudaram muito no início do doutorado, ao amigo professor Dr. Fábio Morotti pelas diversas sugestões nos delineamentos, demais ajudas nos experimentos e diversos ensinamentos. Ao colega de turma de doutorado Fábio Moraes, todo conhecimento e experiência de campo que me repassou. A todos os estagiários, alunos da UEL ou curriculares, por tantas planilhas digitadas e todo empenho dedicado aos experimentos do laboratório.

Aos médicos veterinários Emanuel Binotto Ferreira, Daniel Nunes Gomes e Luidi Carrer Filho que abriram as portas das propriedades de seus clientes e ajudaram na execução dos experimentos.

Ao meu pai José Ari, que mesmo tendo partido precocemente, tenho certeza de que esteve sempre ao meu lado e intercedeu junto a Deus para que tudo desse certo. A minha amada mãe Elza, mulher guerreira, que ficou viúva com dois filhos pequenos e conseguiu, com muita fibra, superar tantas dificuldades, dando o sustento necessário para que eu conseguisse seguir com meus estudos. Ao meu irmão José Douglas, que desempenhou muito bem o papel de irmão mais velho, sendo

um bom exemplo e sempre dando ótimos conselhos.

Aos meus avós e tios, que por muitas vezes preencheram o lugar do meu pai, me dando atenção, carinho e educação, agradeço também por me despertarem a paixão pelo campo e pelo cuidado de animais. Aos meus sogros Nena e Emílio pelo apoio, respeito e encorajamento para seguir em frente. Aos meus demais familiares (cunhados, primos, afilhados e sobrinhos) agradeço a torcida, apoio e momentos de alegria que compartilhamos.

Por fim, agradeço a minha querida esposa Fran, que sem dúvidas foi fundamental para que eu conseguisse chegar até aqui, por sempre compreender e ajudar a superar as dificuldades. Agradeço por sua ajuda *in loco* nos experimentos, por estar junto nas viagens cansativas e mesmo não tendo muito contato com o meio rural, ter calçado botas de borracha e entrado nos barracões e currais, sempre atenta para que as etapas dos experimentos fossem cumpridas. Sem dúvidas Deus foi muito generoso ao colocar você em minha vida, agradeço muito por todo seu amor e carinho.

Meu muito obrigado!

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”

Paulo Freire

BONATO, Denis Vinicius. **Estratégias técnicas e farmacológicas para o incremento da eficiência reprodutiva em fêmeas bovinas.** 2020. 70 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

O objetivo do primeiro trabalho foi avaliar o efeito das categorias nulíparas, primíparas e múltiparas sobre as taxas de manifestação de estro e de prenhez de fêmeas tratadas com GnRH no momento da inseminação artificial em tempo-fixado (IATF). Foram utilizadas matrizes da raça Nelore alocadas por categoria, compreendendo 144 nulíparas, 132 primíparas e 255 múltiparas. As matrizes foram submetidas a um protocolo de IATF. Para identificar a manifestação de estro, no oitavo dia do protocolo, a região sacrococcígea foi pintada e no dia da inseminação artificial, a ausência da tinta indicava o estro. As fêmeas que não manifestaram estro foram tratadas com 10 μ g de GnRH. As taxas de manifestação de estro e prenhez foram analisadas por um modelo de regressão logística. A taxa de manifestação de estro foi inferior ($P = 0.006$) na categoria das primíparas (61,36%) em comparação com as nulíparas (76,39%) e as múltiparas (75,69%). As taxas de prenhez entre as categorias foram semelhantes, tanto para as que manifestaram estro (nulíparas 84,54%, primíparas 86,42% e múltiparas 80,31%; $P = 0.398$) quanto para as que não manifestaram estro (nulíparas 41,18%, primíparas 56,86% e múltiparas 58,06%; $P = 0.244$), inclusive a taxa de prenhez total (nulíparas 74,3%, primíparas 75% e múltiparas 74,9%; $P = 0.989$). As primíparas apresentaram menor taxa de manifestação de estro e não houve diferença da taxa de prenhez entre as categorias. No segundo trabalho para compreender melhor a relação da contagem de folículos antrais (CFA) e o desempenho reprodutivo, foram realizados dois experimentos. No primeiro, o objetivo foi avaliar a repetibilidade da CFA nos dias do protocolo de indução de ovulação, enquanto no segundo foi comparar a dinâmica e hemodinâmica ovariana de vacas com baixa e alta CFA. Para avaliar a repetibilidade da CFA, 20 vacas foram submetidas à sincronização de ovulação e avaliação da CFA por ultrassonografia diariamente. Para comparar a dinâmica folicular de fêmeas de alta e baixa CFA, a CFA de 80 vacas da raça Holandesa foi aferida e destas selecionadas 9 fêmeas para o grupo de baixa (≤ 15 folículos) e 9 para o grupo de alta (≥ 25 folículos). A dinâmica folicular foi acompanhada diariamente por ultrassonografia nos modos B e Doppler, durante os dias do protocolo e onze dias após a ovulação, para avaliar o corpo lúteo (CL). Para determinar a constância da CFA realizou-se o cálculo de repetibilidade. Para os dados da dinâmica, as variáveis paramétricas foram analisadas pelo teste T. Adotou-se significância quando $p \leq 0,1$. A repetibilidade da CFA nos diferentes dias do protocolo foi de 0,98. Os animais de baixa CFA demonstraram maior diâmetro do folículo pré-ovulatório (FO) (16,09 x 15,00mm; $P = 0.059$), maior área de vascularização do FO (17,36 x 8,16mm²; $P = 0.005$), maior área de CL (579,10 x 405,80mm²; $P = 0.0001$) e maior área de perfusão sanguínea do CL (97,16 x 68,30 mm²; $P = 0.021$). A CFA tem alta repetibilidade nos diferentes dias do protocolo e as vacas de baixa CFA demonstraram FOs e CLs maiores e com maior perfusão sanguínea.

Palavras-chave: *Bos taurus indicus*; *Bos taurus taurus*; ovulação; contagem de folículos antrais; biotecnologias da reprodução.

BONATO, Denis Vinicius. **Technical and pharmacological strategies for the improvement of reproductive efficiency of bovine females**. 2020. 70pp. Thesis (Doctorate in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

The objective of first study was to evaluate the effect of nulliparous, primiparous and multiparous categories on the rates of estrus and pregnancy of females who did not manifest estrus and are treated with GnRH at the time of fixed-time artificial insemination (FTAI). 531 matrices were used, all of the Nellore breed allocated by category, comprising 144 nulliparous, 132 primiparous and 255 multiparous. The matrices were submitted to an FTAI protocol. To identify the manifestation of estrus, on the eighth day of the protocol, the sacrococcygeal region was painted and on the day of artificial insemination, females that showed estrus demonstrated absence of paint in this region. Females that did not show estrus were treated with 10 µg of GnRH. The rates of estrus and pregnancy manifestation were analyzed using a logistic regression model. The rate of estrus manifestation was lower ($P = 0.006$) in the primiparous (61.36%) category compared to nulliparous (76.39%) and multiparous (75.69%). Pregnancy rates between categories were similar, both for those who manifested estrus (nulliparous 84.54%, primiparous 86.42% and multiparous 80.31%; $P = 0.398$) and for those who did not manifested estrus (nulliparous 41.18%, primiparous 56.86% and multiparous 58.06%; $P = 0.244$), including the total pregnancy rate (nulliparous 74.3%, primiparous 75% and multiparous 74.9%; $P = 0.989$). Primiparous presented a lower rate of manifestation of estrus and there was no difference in pregnancy rates between categories. In the second study to better understand the relationship between antral follicle count (AFC) and reproductive performance, two experiments were performed. In the first, the objective was to evaluate the repeatability of AFC in the days of the ovulation induction protocol, while in the second it was to compare the dynamics and hemodynamics of cows with low and high AFC. To evaluate the repeatability of the AFC, 20 cows were submitted to synchronization of ovulation and evaluation of the AFC by ultrasonography daily in the protocol and eleven days after ovulation. To compare follicular dynamics of females with high and low AFC, the AFC of 80 cows was measured and from these 9 females were selected for the low group (≤ 15 follicles) and 9 for the high group (≥ 25 follicles). Follicular dynamics were monitored daily by B-mode and Doppler ultrasonography, during the days of the protocol and eleven days after ovulation, to evaluate the corpus luteum (CL). To determine the constancy of AFC, a repeatability calculation was performed. For the dynamics data of the low and high animals, the parametric variables were analyzed by the T test. Significance was adopted when $p \leq 0.1$. The repeatability of the AFC on the different days of the protocol was 0.98. The animals with low AFC showed a larger diameter of the preovulatory follicle (POF) (16.09 x 15.00mm; $P = 0.059$), a greater vascularization area of the POF (17.36 x 8.16mm²; $P = 0.005$), larger area of CL (579.10 x 405.80mm²; $P = 0.0001$) and greater area of blood perfusion of CL (97.16 x 68.30 mm²; $P = 0.021$). AFC has high repeatability on the different days of the protocol and cows with low AFC demonstrated larger POFs and CLs with greater blood perfusion.

Key words: *Bos taurus indicus*; *Bos taurus taurus*; ovulation; antral follicle count; biotechnologies of reproduction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO A - Efeito da categoria de fêmeas Nelore (nulíparas, primíparas e múltiparas) na taxa de manifestação de estro e na taxa de prenhez à IATF, associado ao uso estratégico do GnRH

- Figura 1** - Protocolo farmacológico utilizado para sincronização de ovulação nas fêmeas Nelore dos grupos experimentais, demonstrando a diferença na dose de CE usado em novilhas e vacas..... 44
- Figura 2** - Representação esquemática da garupa das vacas, exemplificando a forma que foi realizada a identificação de estro nos animais de ambos os grupos experimentais..... 44
- Figura 3** - Taxa de manifestação de estro de diferentes categorias (nulíparas, primíparas e múltiparas) de fêmeas Nelore no protocolo de sincronização de ovulação 45

ARTIGO B - Avaliação ultrassonográfica da dinâmica ovariana de vacas da raça Holandesa com diferentes contagens de folículos antrais

- Figura 1** - Protocolo farmacológico utilizado para sincronização da ovulação, destacando os momentos em que foram realizadas as avaliações ultrassonográficas..... 55
- Figura 2** - Imagem em modo Doppler colorido do folículo pré-ovulatório de uma das vacas do experimento..... 58
- Figura 3** - Imagem da medição da área de dois corpos lúteos 59
- Figura 4** - Imagem em modo Doppler colorido do corpo lúteo de uma das vacas do experimento, demonstrando o contorno realizado manualmente para medir a área vascularizada..... 59
- Figura 5** - Frequência de distribuição da contagem de folículos antrais (CFA) dos animais avaliados no experimento sobre a repetibilidade da CFA em diferentes dias do protocolo de sincronização da ovulação 61
- Figura 6** - Contagem de folículos antrais (CFA) de cada vaca ao longo dos dias de avaliação..... 62

- Figura 7** - Média da contagem dos folículos antrais (CFA) nos diferentes dias do protocolo de sincronização da ovulação e no décimo dia após a ovulação 62
- Figura 8** - Diâmetro médio e erro padrão do diâmetro do folículo dominante nos dias que antecederam a ovulação (*-P = 0.059)..... 64

LISTA DE TABELAS

- ARTIGO A - Efeito da categoria de fêmeas Nelore (nulíparas, primíparas e múltíparas) na taxa de manifestação de estro e na taxa de prenhez à IATF, associado ao uso estratégico do GnRH**
- Tabela 1 -** Taxa de prenhez de diferentes categorias de fêmeas Nelore submetidas a inseminação artificial em tempo-fixado associada ao uso estratégico de GnRH em fêmeas que não manifestaram estro 46
- ARTIGO B - Avaliação ultrassonográfica da dinâmica ovariana de vacas da raça Holandesa com diferentes contagens de folículos antrais**
- Tabela 1 -** Comparação dos parâmetros da dinâmica folicular e hemodinâmica ovariana das vacas da raça Holandesas de alta produção leiteira com baixa e alta contagem de folículos antrais (CFA) 63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFC / CFA	<i>Antral follicles count</i> / Contagem de folículos antrais
AGNES	Ácidos graxos não esterificados
ANOVA	Análise de variância
BEN	Balanço energético negativo
CL	<i>Corpus luteum</i> / Corpo lúteo
D0	Dia inicial do protocolo de sincronização da ovulação
D4	Quarto dia do protocolo de sincronização da ovulação
D7	Sétimo dia do protocolo de sincronização da ovulação
D8	Oitavo dia do protocolo de sincronização da ovulação
D9	Nono dia do protocolo de sincronização da ovulação
D10	Décimo dia do protocolo de sincronização da ovulação
D11	Primeiro dia após a ovulação do protocolo de sincronização
D21	Décimo primeiro dia após a ovulação do protocolo de sincronização
E2	Estrógeno
ECC	Escore de condição corporal
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
FSH	<i>Follicle Stimulant Hormone</i> - Hormônio folículo estimulante
FTAI/IATF	<i>Fixed-time artificial insemination</i> / Inseminação artificial em tempo-fixo
GLM	Modelo linear generalizado
GnRH	<i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i> - Hormônio liberador de gonadotrofinas
H0	Hipótese nula
IA	Inseminação artificial
LH	Hormônio luteinizante
P4	Progesterona

PIB	Produto interno bruto
POF / FO	<i>Pre-ovulatory follicle</i> / Folículo pré-ovulatório
ReproA	Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal
SE	Erro padrão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DA FÊMEA BOVINA	18
2.2	FISIOLOGIA REPRODUTIVA DA FÊMEA BOVINA	20
2.2.1	Desenvolvimento do Oócito.....	20
2.2.2	Controle Neuroendócrino das Funções Gonadais.....	20
2.2.3	Desenvolvimento Folicular no Ciclo Estral	21
2.2.3.1	Folículo primordial	21
2.2.3.2	Folículo primário.....	22
2.2.3.3	Folículo secundário	22
2.2.3.4	Folículo antral.....	22
2.2.3.5	Folículo dominante	23
2.2.3.6	Folículo atrésico	25
2.2.3.7	Corpo lúteo.....	25
2.3	CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL PARA IATF	25
2.4	TÉCNICAS DE ULTRASSONOGRAFIA APLICADAS NA AVALIAÇÃO REPRODUTIVA DE FÊMEAS BOVINAS.....	28
2.5	USO DA ULTRASSONOGRAFIA NA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAI BOVINOS (CFA) E A RELAÇÃO COM O DESEMPENHO REPRODUTIVO	29
3	REFERÊNCIAS	31
4	HIPÓTESES	38
5	OBJETIVOS	39
5.1	OBJETIVO GERAL.....	39
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
6	ARTIGO A – EFEITO DA CATEGORIA DE FÊMEAS NELORE (NULÍPARAS, PRIMÍPARAS E MULTÍPARAS) NA TAXA DE	

	MANIFESTAÇÃO DE ESTRO E NA TAXA DE PREENHEZ À IATF, ASSOCIADO AO USO ESTRATÉGICO DO GnRH	40
7	ARTIGO B – AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DA DINÂMICA OVARIANA DE VACAS DA RAÇA HOLANDESA COM BAIXA E ALTA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS.....	52
8	CONCLUSÕES	70

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura, tanto para a produção de carne quanto de leite, é uma importante atividade para a economia brasileira, gerando empregos e contribuindo para a distribuição de renda (GRIGOL et al., 2019; JUNG e MATTE JÚNIOR, 2017). A bovinocultura de corte movimentou no ano de 2018 um montante de R\$ 597,22 bilhões, representando 8,7% do produto interno bruto (PIB) total do Brasil, mantendo o país no topo da lista mundial dos países exportadores de carne bovina (ABIEC, 2019).

A produção de carne, apesar da importância no cenário econômico, vem sofrendo várias críticas quanto aos impactos ambientais que gera (FLORINDO et al., 2020). Esses impactos estão relacionados principalmente com a baixa produtividade da bovinocultura de corte nacional (PASHAEI KAMALI et al., 2016). Deste modo, as pesquisas vem demonstrando a necessidade de melhorias na eficiência de produção, empregando tecnologias que resultem em um volume maior de carne produzida, com o menor impacto ambiental que um sistema de baixa produtividade (FLORINDO et al., 2020; JUNG e MATTE JÚNIOR, 2017).

Para que ocorra um incremento na produtividade da bovinocultura de corte e necessário aplicar tecnologias nas áreas da nutrição, sanidade e o melhoramento genético dos rebanhos (REESE et al., 2020; SERRANO-PÉREZ et al., 2020; WANG et al., 2020; ZEINELDIN et al., 2018). No quesito melhoramento genético, o emprego de biotécnicas reprodutivas tem contribuído substancialmente para a melhoria da eficiência produtiva da pecuária de corte (TAYLOR-ROBINSON et al., 2014). No Brasil uma biotécnica reprodutiva que vem sendo empregada de forma crescente e tem contribuído para o incremento genético dos bovinos de corte é a inseminação artificial em tempo-fixo (IATF) (BARUSELLI et al., 2018).

A IATF é uma técnica que utiliza o controle farmacológico do ciclo estral, por meio de protocolos farmacológicos, visando induzir a ovulação de forma sincronizada (BÓ e BARUSELLI, 2014). Essa biotécnica possui protocolos bem estabelecidos e de resultados comprovados (BARUSELLI et al., 2018). Contudo, diversos estudos continuam sendo realizados visando gerar informações que possam ajudar nesse controle farmacológico e melhorar as taxas de prenhez da IATF (FERREIRA et al., 2018). Rodrigues et al. (2019) avaliaram o uso de um análogo sintético ao hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), em vacas múltiparas da

raça Nelore, que não expressam estro durante o protocolo e identificaram um incremento de 9,77% na taxa de prenhez em relação ao grupo controle.

Com relação a bovinocultura de leite, o Brasil está em sexta colocação na produção mundial de leite, produzindo acima de 23 milhões de toneladas/ano (USDA, 2018). Tamanho volume de leite, resulta em grande movimentação financeira, por meio da aquisição de insumos, transporte e comercialização do produto *in natura* ou industrializado, com isso, a atividade também contribui significativamente com o PIB brasileiro (CERVO et al., 2017). Contudo, a produção de leite do Brasil não é suficiente para suprir a demanda do mercado interno, tornando o país dependente de importação de grande volume de produtos lácteos (MORAES E BENDER FILHO, 2017). Nesse sentido, visando atender essa demanda, é necessário maximizar a eficiência produtiva dos rebanhos leiteiros (CERVO et al., 2018).

Um dos fatores que limitam de forma impactante a eficiência produtiva de bovinos é o desempenho reprodutivo, pois fêmeas que tem a primeira concepção mais tarde ou tem grande intervalo entre partos, produzem menor volume de leite quando são avaliadas a longo prazo (JIMENEZ-KRASSEL et al., 2017). A baixa eficiência reprodutiva é mais frequente em vacas de alta produção leiteira, isso quando comparadas com outras categorias de fêmeas bovinas (ADRIAENS et al., 2018). Esses problemas ocasionam baixas taxas de concepção e estão entre as principais causas de descarte prematuro do rebanho de animais com alto mérito produtivo, conseqüentemente, resultando em importantes prejuízos financeiros ao pecuarista (JIMENEZ-KRASSEL et al., 2017).

Estudos realizados com vacas de alta produção leiteira, demonstram que existem alguns parâmetros relacionados com melhor desempenho reprodutivo, dentre esses parâmetros está a contagem de folículos antrais (CFA) (MOROTTI et al., 2017; MOROTTI et al., 2018). A CFA é a quantidade total de folículos antrais identificados por ultrassonografia em ambos os ovários de cada fêmea (MOROTTI et al., 2017).

A CFA também está relacionada com outros índices produtivos da fêmea bovina, podendo predizer maior tempo de permanência no rebanho, que reflete em maior produção de leite durante a sua vida, resultando em um sistema de produção mais eficiente economicamente (JIMENEZ-KRASSEL et al., 2017). Entretanto, as pesquisas existentes não explicam claramente a relação da CFA com desempenho reprodutivo e produtivo, necessitando assim, de trabalhos mais esclarecedores sobre

o assunto (MOSSA et al., 2012; JIMENEZ-KRASSEL et al., 2017; MOROTTI et al., 2017).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DA FÊMEA BOVINA

A maioria do rebanho bovino brasileiro é composto por animais da raça Nelore, isso se dá ao fato de que a raça é muito adaptada ao ambiente tropical e ao sistema extensivo de criação, algo que é predominante na pecuária de corte nacional, principalmente na cria (AMBROSINI et al., 2016; DA SILVA et al., 2016). O sistema de criação extensivo é muito utilizado devido ao baixo custo de manutenção dos animais, que consomem basicamente pasto e são suplementados apenas com fonte mineral (FLORINDO et al., 2017). Sendo assim, para que as vacas tenham um bom desempenho reprodutivo em sistema extensivo é necessário ter boa disponibilidade de forragens e de alta qualidade nutricional (LOPES et al., 2011).

Contudo, a sazonalidade na disponibilidade de forragens, muitas vezes associada com lotação inadequada, falta de tratamentos culturais ou falhas de manejo das plantas forrageiras, faz com que muitas vacas tenham o parto no momento de condições nutricionais desfavoráveis (DE FIGUEIREDO et al., 2017; VIEIRA et al., 2005). Essa condição faz com que a vaca de corte entre em balanço energético negativo (BEN) e tenha um período de anestro mais prolongado (GIRALDO ARANA; URIBE VELÁSQUEZ, 2012). Essa relação entre o BEN e o anestro ocorre devido ao fato de que a vaca prioriza a energia para a lactação e manutenção, voltando a ciclicidade apenas em condições metabólicas favoráveis (CUNHA et al., 2013; OLIVEIRA; BONATO; DOS SANTOS, 2011). Além disso, existe o efeito mamada em vacas de corte lactantes, em que o ato do bezerro sugar a papila mamária da vaca inibe os picos de hormônio luteinizante (LH) necessários para a ovulação, sendo também um fator que aumenta o período de anestro (SILVA FILHO et al., 2015).

O maior período de anestro resultada em intervalos entre partos mais prolongados, comprometendo o desempenho reprodutivo dos rebanhos de cria (YAVAS; WALLON, 2000). A IATF tem contribuído para o retorno da ciclicidade, reduzindo o intervalo entre partos, mesmo em vacas lactantes mantidas em sistema extensivo (ALVAREZ et al., 2018; BÓ; BARUSELLI, 2014). Tendo em vista que, a biotécnica é baseada no controle farmacológico do ciclo estral da vaca, através de protocolos farmacológicos que visam estimular a emergência de uma nova onda

folicular e em uma ovulação de forma sincronizada, possibilitando assim, o uso da inseminação artificial (IA) sem a necessidade e esperar a vaca apresentar naturalmente o estro (BARUSELLI et al., 2018; BÓ; BARUSELLI, 2014).

Com relação a bovinocultura de leite, apesar de ter uma média de produção geral considerada baixa, o Brasil possui em alguns locais do país rebanhos de raças especializadas e com alta produtividade, como é o caso da região de Castro - PR, que possui rebanhos com produção média superior aos 35 litros/vaca/dia (IBGE, 2019). Rebanhos de alta produção leiteira normalmente tem animais com baixo desempenho reprodutivo e isso ocorre principalmente devido ao alto metabolismo hepático que esses animais têm (SARTORI et al., 2004). Esse metabolismo hepático exacerbado acaba catabolizando os hormônios reprodutivos esteroides (SARTORI et al., 2004; SARTORI; GUARDIEIRO, 2010).

Além disso, vacas de alta produção leiteira, na maioria das vezes, tem um BEN mais severo que vacas de corte e isso pode resultar em grande mobilização de reservas corpóreas, causando uma severa dislipidemia (SARTORI; GUARDIEIRO, 2010). Essa dislipidemia, denominada cetose, resulta em acúmulo de ácidos graxos não esterificados (AGNES) na corrente sanguínea (BONATO et al., 2015). Leroy et al. (2005) identificaram a presença de AGNES no fluido folicular de vacas em BEN. No estudo realizado por Leroy et al. (2008) os autores observaram que o desenvolvimento de oócitos bovinos é prejudicado em meios com a presença de AGNES. Sendo assim, a qualidade do oócito de vacas leiteiras de alta produção, nem sempre é boa, podendo comprometer a concepção, mesmo quando ocorre a ovulação (LEROY et al., 2005).

O efeito mamada em vacas de corte e as alterações metabólicas, que afetam tanto vacas de corte como de leite, estão entre os principais problemas que limitam o bom desempenho reprodutivo de fêmeas bovinas (SARTORI; GUARDIEIRO, 2010; SILVA FILHO et al., 2015; YAVAS; WALLON, 2000). Contudo, a compreensão da fisiologia reprodutiva de fêmeas bovinas vem possibilitando o desenvolvimento de tecnologias que estão contribuindo para melhorar o desempenho reprodutivo de fêmeas de corte e de leite (GARCIA-ISPIERTO et al., 2018; OOSTHUIZEN et al., 2018; THATCHER, 2017).

2.2 FISIOLOGIA REPRODUTIVA DA FÊMEA BOVINA

2.2.1 Desenvolvimento do Oócito

Na maioria das espécies animais, o gameta feminino é considerado um elemento fundamental à vida, pois constitui o elo celular feminino entre as presentes e futuras gerações. De forma que, as características desta célula, como a origem, diferenciação e funções são de extrema relevância para a biologia do desenvolvimento. O gameta feminino é denominado oócito, este tipo celular é basicamente formado por meio de dois processos: a oogênese e a foliculogênese (SCHUETZ, 1985).

A oogênese é um processo complexo que envolve o surgimento, crescimento e maturação de uma célula, o oócito, única em sua capacidade de propagar outra geração de organismo. Este processo conduz à ovulação de oócitos competentes no desenvolvimento (GUGLIELMO; ALBERTINI, 2013). Durante a oogênese, o oócito adquire competência meiótica através da expressão gênica, de forma que a competência do oócito é então regulada por um conjunto de fatores de transcrição bem coordenados (JAGARLAMUDI; RAJKOVIC, 2012).

Além disso, nos mamíferos, o desenvolvimento folicular ovariano é controlado (através de um controle neuroendócrino) por múltiplos sinais regulatórios que liberam gonadotrofinas e reguladores intra-ovarianos que interagem para promover a ativação folicular primordial, crescimento, proliferação, sobrevivência e diferenciação celular (JAGARLAMUDI; RAJKOVIC, 2012).

2.2.2 Controle Neuroendócrino das Funções Gonadais

A hipófise é uma glândula pequena localizada na base do encéfalo, que tem por função a secreção de importantes hormônios reprodutivos, os chamados hormônios gonadotróficos, tais como: o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). Estes hormônios, por sua vez, controlam o desenvolvimento das gônadas, os ovários e os testículos, bem como suas atividades hormonais e reprodutivas (NETT et al., 2002).

A função gonadal em bovinos é evidentemente dependente da

secreção pulsátil de gonadotrofinas da hipófise (VIZCARRA et al., 1997). O hipotálamo, que se liga a hipófise pelo pedúnculo hipofisário, tem por função controlar a secreção de gonadotrofinas pela secreção pulsátil de GnRH na circulação portal da hipófise (KNOBIL, 1990). Isso é facilitado pela presença de neurônios especiais do hipotálamo, que produzem e secretam o GnRH que controla a secreção dos hormônios gonadotróficos, FSH e LH, da hipófise anterior (HALLF et al., 1988). A liberação de pulsos de LH mostra-se totalmente dependente do GnRH pulsátil, enquanto a liberação de FSH está associada apenas a uma pequena proporção dos pulsos de GnRH (ACOSTA; MIYAMOTO, 2004; PAWSON; MCNEILLY, 2005).

Especificamente em fêmeas, os hormônios gonadotróficos atuam de forma diferente, o FSH estimula o desenvolvimento de folículos ovarianos, enquanto o LH origina a ovulação e a formação do corpo lúteo, além de promover, conseqüentemente, a produção de estrogênio e progesterona no ovário. Além disso, a frequência e amplitude de pulsos de GnRH também varia durante os diferentes estágios reprodutivos e de acordo com a condição metabólica do animal (HALLF et al., 1988; KNOBIL, 1990).

2.2.3 Desenvolvimento Folicular no Ciclo Estral

O ciclo estral, que é o intervalo entre duas ovulações, dura em média 21 dias na espécie bovina, podendo variar de 17 a 24 dias e é composto por duas fases, sendo a primeira a fase lútea e a segunda a folicular. No decorrer do ciclo, ocorrem duas (mais comum em fêmeas *Bos taurus taurus*) ou três (mais comum em fêmeas *Bos taurus indicus*) ondas de crescimento de folículo ovariano. Cada onda consiste na emergência de uma quantidade de folículos, na seleção de um folículo dominante e atresia ou ovulação do folículo dominante, ou nesse caso, também chamado de folículo pré-ovulatório (FORDE et al., 2011; FORTUNE, 1994). Além disso, o crescimento folicular é marcado por estágios progressivos que vão do desenvolvimento de um folículo primordial até a ovulação ou atresia de um folículo antral (CHOUDARY; GIER; MARION, 1968).

2.2.3.1 Folículo primordial

A formação de folículos ocorre durante a vida fetal, assim antes que

o crescimento folicular tenha início, a fêmea já apresenta folículos que neste estágio são denominados folículos primordiais. O folículo primordial consiste em um oócito circundado por uma camada de células achatadas da granulosa (YANG; FORTUNE, 2006). Acredita-se que esta camada de células da granulosa tenha função nutricional, além de secretar inibidores da maturação do oócito que permitem mantê-lo no estágio de prófase I da meiose. No entanto, alguns fatores produzidos pelo próprio folículo primordial podem induzir a quebra da quiescência do folículo primordial e ativar o desenvolvimento folicular (ACOSTA; MIYAMOTO, 2004; NILSSON; SKINNER, 2001).

2.2.3.2 Folículo primário

A transição do estágio de folículo primordial para folículo primário pode ser longa (FORTUNE, 2003). Os folículos primários podem ser definidos como um oócito envolvido por uma única camada de células cuboides da granulosa (YANG; FORTUNE, 2006).

2.2.3.3 Folículo secundário

O folículo secundário é definido como um oócito cercado de duas ou mais camadas de células cuboides da granulosa, com ausência de antro folicular (FORTUNE, 2003; YANG; FORTUNE, 2006). Sobre o desenvolvimento folicular sabe-se que, ainda durante a fase pré-ovulatória, o evento da secreção dos hormônios gonadotróficos pela hipófise anterior, principalmente de FSH determina o crescimento acelerado de alguns folículos primários em secundários. Além disso, a fase de crescimento folicular inclui um período de transcrição do oócito, essa transcrição é portanto, ativada no folículo secundário e trata-se de um processo essencial para aquisição da competência meiótica e de desenvolvimento do oócito (HYTTEL et al., 1997).

2.2.3.4 Folículo antral

Durante a fase inicial de crescimento folicular, após a formação do folículo secundário, ocorre o aumento rápido no número de células e conseqüentemente o aumento de camadas da granulosa desencadeado pela

secreção dos hormônios gonadotróficos (FSH e LH). Além da camada de células da granulosa, outro agrupamento celular denominado “teca”, constituído por células fusiformes derivadas de células do interstício ovariano, tem origem nesse estágio. A camada interna da teca tem por função secretar mais hormônios sexuais esteroides, o estrogênio e a progesterona. Enquanto a camada externa da teca, constituída de tecido conjuntivo torna-se a cápsula do folículo em desenvolvimento. Após essa fase inicial, as células da granulosa iniciam a secreção de um líquido folicular com uma alta concentração de estrogênio, que culmina no aparecimento de um antro dentro das camadas de células da granulosa, dando origem ao folículo antral (JIANG et al., 2003; RODGERS; IRVING-RODGERS, 2010).

Dessa forma, o desenvolvimento de folículos antrais, especialmente em bovinos, depende da presença de FSH, entretanto folículos antrais grandes podem alterar sua dependência gonadotrófica de FSH para LH. Além disso, em bovinos, existe também uma hierarquia na população de folículos antrais com um número muito superior de folículos responsivos à gonadotrofina, alguns poucos folículos dependentes de gonadotrofina e apenas um folículo ovulatório (CAMPBELL; SCARAMUZZI; WEBB, 1995). Assim, pode-se dizer que o crescimento de folículos antrais em bovinos é composto por duas fases distintas, uma de crescimento lento onde ocorre a formação do antro, nessa primeira etapa o folículo atinge cerca de 3 mm de diâmetro, enquanto na segunda etapa ou fase rápida ocorre crescimento de coorte, seleção de folículo e crescimento do folículo dominante (MIHM; BLEACH, 2003).

2.2.3.5 Folículo dominante

Um dos folículos começa a crescer mais que os outros, dando origem a um folículo dominante. Este estágio é dependente de gonadotrofina, de forma que as vias de sinalização de LH e FSH executam uma função essencial na diferenciação, seleção e sobrevivência dos folículos (PALERMO, 2007). Nesta etapa ocorre liberação aumentada de LH e reduzida de FSH (BAIRD; MCNEILLY, 1981), essa diferença na secreção pode ser resultante do armazenamento de LH e FSH em diferentes grânulos secretores dentro da mesma célula (MCNEILLY et al., 2003). Por outro lado, no decorrer do ciclo, essa situação se altera, os níveis de FSH aumentam, enquanto do LH diminuem (PAWSON; MCNEILLY, 2005).

A seleção folicular durante o desenvolvimento do folículo dominante sofre influência da concentração de FSH plasmático, pois o aumento do FSH plasmático durante a transição luteo-folicular é condição crítica para o crescimento do folículo mais sensível ao FSH. Porém, quando a secreção folicular de estradiol é induzida por gonadotrofina, ocorre a inibição da secreção hipofisária de FSH, consequentemente reduzindo a concentração de FSH nos folículos em desenvolvimento e interrompendo o desenvolvimento do folículo menos sensível ao FSH (PALERMO, 2007).

Especialmente em bovinos, o aumento da produção de estrogênio a partir dos folículos recrutados parece ter relação com aumentos no RNA mensageiro que, por sua vez, codificam enzimas esteroidogênicas apropriadas, receptores de gonadotrofinas, bem como fatores reguladores locais (FORTUNE, 1994; WEBB et al., 2003).

O único folículo, que é recrutado para dominância, continua a crescer, atinge o desenvolvimento durante a pré-ovulação é então denominado de folículo maduro (FORTUNE, 1994). Antes da ovulação ocorrer a parede externa do folículo incha-se rapidamente e forma uma estrutura denominada estigma, que libera um líquido folicular viscoso e o oócito circundado por células, denominadas de coroa radiada. Em seguida a teca externa libera enzimas digestivas que enfraquecem a parede capsular do folículo, o que facilita a expansão do mesmo, além de provocar a destruição do estigma. Ao mesmo tempo ocorre a formação de novos vasos sanguíneos e secreção de prostaglandina, que causam vasodilatação folicular. Devido a intensificação da vascularização nessa etapa, conhecer a mudança do perfil do fluxo sanguíneo local nos folículos é essencial para compreensão da fisiologia ovariana do ciclo estral. Para esta finalidade, estudos utilizando a ultrassonografia em modo Doppler são utilizados para caracterizar as alterações relacionadas ao fluxo sanguíneo da parede folicular durante os diferentes estágios do ciclo estral em vacas (ACOSTA; MIYAMOTO, 2004).

Todos esses fatores unidos culminam na liberação do oócito ou ovulação. Assim, a ovulação é um estágio dependente de LH, embora o FSH e o LH atuem sinergicamente causando a dilatação do folículo durante os últimos dias antes da ovulação. O LH possui também efeito sobre as células da granulosa e da teca (ACOSTA; MIYAMOTO, 2004).

2.2.3.6 Folículo atrésico

Os folículos que não se desenvolvem ou involuem, sofrem atresia, sendo então denominados folículos atrésicos. Esse fenômeno de atresia torna-se mais intenso conforme os folículos se aproximam do tamanho em que poderiam ser recrutados para uma provável ovulação (FORTUNE, 1994). Em espécies monovulatórias como os bovinos, acredita-se que a relação entre fatores extra-ovarianos e intra-foliculares são determinantes para o desenvolvimento do folículo ovulatório ou para a atresia do mesmo (WEBB et al., 2003).

2.2.3.7 Corpo lúteo

Após a ovulação as células remanescentes da teca interna tornam-se células luteínicas, de maior diâmetro, com a presença de inclusões lipídicas e vascularização bem desenvolvida, evidenciada principalmente por ultrassonografia em modo Doppler. Essa massa de células é denominada corpo lúteo, enquanto o processo todo é dito luteinização. Além disso, essa estrutura é considerada glandular transitória, pelas suas características estruturais, como a ampla presença de organelas celulares secretoras, indicativas de células endócrinas (FIELDS; FIELDS, 1996; SALLES; ARAÚJO, 2010).

As células luteínicas esteroidogênicas possuem uma grande quantidade de retículo endoplasmático liso e mitocôndrias esféricas compactadas, que acredita-se ter relação com a produção de progesterona. Por meio dessa importante característica o corpo lúteo pode executar sua principal função, a produção e secreção de progesterona, que por sua vez, bloqueia a liberação hipofisária de gonadotrofinas e prepara o útero para uma possível gestação (FIELDS; FIELDS, 1996).

2.3 CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL PARA IATF

O controle farmacológico do ciclo estral em bovinos é a base para a aplicação de uma importante biotécnica reprodutiva, a IATF (MALUF et al., 2010). A IATF vem sendo difundida no Brasil pelos benefícios que traz aos sistemas de produção de bovinos de corte e de leite (BARUSELLI et al., 2018; BÓ; BARUSELLI,

2014; MONTEIRO et al., 2015). A IATF possibilita realizar a inseminação artificial (IA) sem a necessidade de identificação do estro (BÓ; BARUSELLI, 2014). A identificação do estro é algo que limita muito o emprego da IA, tendo em vista que, o cio é demonstrado quando uma vaca fica parada e aceita ser montada por outra vaca e essa monta ocorre em frações de segundos ou acontece durante a noite, sendo necessário um monitoramento constante do rebanho para que o estro seja precisamente identificado, algo que de forma prática é difícil de ser executado (BARUSELLI et al., 2018; BÓ; BARUSELLI, 2014, INFORZATO et al., 2008).

Em rebanhos de corte a IATF tem possibilitado a realização de cruzamentos entre raças zebuínas, que devido a rusticidade, são usadas como maternas no rebanho nacional, com raças taurinas, que demonstram precocidade para acabamento de carcaça, carne macia e marmoreio (KIPPERT et al., 2008; SANTOS et al., 2019; TEIXEIRA; ALBUQUERQUE, 2005). A grande maioria dos touros de raças taurinas dificilmente poderiam ser usados para cobrir naturalmente vacas em sistema extensivo, tendo em vista, a baixa adaptabilidade ao ambiente tropical (CHACUR et al., 2014; GARCIA, 2017; HORN; MORAES; GALINA, 1999). O uso de cruzamentos na bovinocultura de corte realizado com duas raças puras de origens distintas, como vem sendo utilizado no Brasil com as raças Nelore e Angus, possibilita obter um produto (F1) com 100% de heterose (TEIXEIRA; ALBUQUERQUE, 2005). Essa heterose culmina em maior ganho de peso, rusticidade e melhor qualidade de carne, sendo importante diferencial de aceitação de mercado, para a venda de bezerros (KIPPERT et al., 2008; TEIXEIRA; ALBUQUERQUE, 2005).

Além da possibilidade de cruzamentos a IATF permite a formação de lotes homogêneos de bezerros para a comercialização e concentra manejos, ou seja, um número grande de animais é inseminado no mesmo dia e conseqüentemente, o monitoramento dos partos é facilitado por ocorrer em uma pequena janela de tempo (GODOI; SILVA; DE PAULA, 2010; INFORZATO et al., 2008). Na bovinocultura de leite a IATF, além de ser uma importante ferramenta para o ganho genético, vem possibilitando reduzir o intervalo entre partos, tendo em vista que, as vacas de alta produção tendem a terem cios silenciosos, dificultando a identificação do estro mesmo sendo manejadas de forma mais intensa (SANTOS; SOUSA, 2014; SARTORI; GUARDIEIRO, 2010).

O controle farmacológico para a IATF é baseado em um protocolo farmacológico, que é iniciado em um dia aleatório do ciclo estral, ou seja, em vacas

que estão em diferentes momentos do ciclo e tem por objetivo fazer com que tenha a emergência de uma nova onda de folículos antrais, a dominância de um folículo e a ovulação da forma mais sincronizada possível, para que o oócito esteja na tuba uterina dentro do período de viabilidade dos espermatozoides, que são depositados no útero de todas as vacas no mesmo intervalo de tempo (BÓ; BARUSELLI, 2014; GODOI; SILVA; DE PAULA, 2010; INFORZATO et al., 2008). No Brasil, em bovinos de corte normalmente é aplicado um protocolo com três ou quatro manejos (BÓ; BARUSELLI, 2014; MENEGHETTI; VASCONCELOS, 2008). Esse protocolo inicia-se, na maioria dos casos, com a introdução de um dispositivo intravaginal de progesterona e a aplicação de estrógeno, sendo usado principalmente o benzoato de estradiol (BÓ; BARUSELLI, 2014; MALUF et al., 2010). A associação do estrógeno com a progesterona no dia inicial do protocolo (D0) tem o objetivo de sincronizar a emergência da onda folicular (BÓ; BARUSELLI, 2014).

Em um protocolo de três manejos, no oitavo dia do protocolo (D8) o dispositivo de progesterona é removido e administrado um indutor de ovulação, que na maioria dos casos é o cipionato de estradiol, um agente luteolítico a base de prostaglandina, para baixar a progesterona de vacas com CL ativo e permitir a ovulação (BÓ; BARUSELLI, 2014; ROSA et al., 2019). Outro hormônio que vem sendo muito empregado no D8 é a gonadotrofina coriônica equina (eCG), que estimula o crescimento folicular mesmo em vacas que estão em anestro, pois possui em sua composição os hormônios FSH e LH (MELLO et al., 2015). Com esse protocolo exemplificado a IA é realizada normalmente 48 horas após a retirada o dispositivo de progesterona e a aplicação dos demais hormônios do D8, compreendendo assim o décimo dia do protocolo (D10) (BÓ; BARUSELLI, 2014).

Em vacas de aptidão leiteira os protocolos utilizados variam um pouco, podendo incluir mais dias de manejos, tendo em vista que, os animais já são manejados para serem ordenhados, e talvez pode incluir outros hormônios, contudo, é realizado com o mesmo objetivo que o protocolo usado em vacas de corte, ou seja, induzir uma ovulação de forma sincronizada (MONTEIRO et al., 2015; SARTORI, 2007).

Nem todas as vacas submetidas ao protocolo de IATF respondem bem ao protocolo, algumas não conseguem ter um folículo dominante ou ovulam de forma mais tardia, após o período de viabilidade do sêmen depositado no útero durante a IA (MENEGHETTI; VASCONCELOS, 2008; RODRIGUES et al., 2019).

Nesse sentido alguns estudos avaliaram a administração do GnRH em vacas que possuem um folículo dominante, mas de tamanho reduzido, indicando que não está próximo da ovulação (FIELDS et al., 2012; RODRIGUES et al., 2019). Essa administração de GnRH faz com que a hipófise anterior libere LH e induza a ovulação, aumentando a possibilidade de gestação em vacas que não responderam muito bem ao protocolo farmacológico (FIELDS et al., 2012).

Outro aspecto importante para avaliar a eficiência da IATF é realizar o diagnóstico de gestação, que possibilita identificar a quantidade de vacas que ficaram gestantes com o protocolo realizado (GODOI; SILVA; DE PAULA, 2010; MENEGHETTI; VASCONCELOS, 2008). O diagnóstico em bovinos normalmente é realizado por ultrassonografia transretal, que pode ser feito a partir dos trinta dias em modo B, avaliando a presença de um conceito viável no útero, ou de forma mais precoce, por modo Doppler, já no 22º dia após a IA, avaliando a perfusão sanguínea do corpo lúteo (PUGLIESI et al., 2017; ROSA et al., 2019).

2.4 TÉCNICAS DE ULTRASSONOGRAFIA APLICADAS NA AVALIAÇÃO REPRODUTIVA DE FÊMEAS BOVINAS

O modo B é uma tecnologia de diagnóstico ultrassonográfico que está presente nos aparelhos mais antigos, por isso acaba sendo a técnica de ultrassonografia comumente mais usada em bovinos (KAUFFOLD; ALTHOUSE, 2007; PUGLIESI et al., 2017). Essa técnica é baseada na emissão de ondas sonoras, através da vibração dos cristais presentes no transdutor do aparelho de ultrassom (KAUFFOLD; ALTHOUSE, 2007). Essas ondas, quando posicionadas no órgão ou estrutura que está sendo examinada, são absorvidas ou refletidas, dependendo da densidade do que está sendo avaliado (MEIBURGER; ACHARYA; MOLINARI, 2018). O eco das ondas refletidas é captado pelo transdutor, que conduz até o processador do aparelho, que codifica a alteração de ecogenicidade em uma imagem que varia de preto até branco, ou seja, em uma escala de cinza (KAUFFOLD; ALTHOUSE, 2007; MEIBURGER; ACHARYA; MOLINARI, 2018).

De forma prática, em modo B as estruturas com maior densidade, como ossos, são codificadas em tons de cinza mais próximos do branco, sendo chamadas de hiperecoicas, estruturas com densidade mais baixa, como órgãos internos, são codificadas com tons de cinza mais escuros, sendo denominadas de

hipoecoicas e estruturas com densidade muito baixa, como por exemplo líquidos, são denominados de anecoicos, aparecendo no transdutor em um tons de cinza mais próximo do preto (KAUFFOLD; ALTHOUSE, 2007). O modo B possibilita na reprodução de fêmeas bovinos avaliar e medir o tamanho de folículos antrais, fazer o diagnóstico de afecções reprodutivas como cistos ou infecções uterinas, fazer o diagnóstico de gestação por avaliação uterina em conceptos com mais de 30 dias e avaliar a presença de CLs (VRISMAN et al., 2015).

Contudo, Pugliesi et al. (2017) citam que o modo B é limitado quando se pretende avaliar aspectos relacionados com a viabilidade da estrutura que está sendo examinada, como é o caso de folículos pré-ovulatórios e CLs, em que é possível identificar a presença ou ausência, mas não a perfusão sanguínea e nos estudos realizados por Satheshkumar (2018) e Vrisman et al. (2018), folículos pré-ovulatórios e CLs com maior hemodinâmica foram relacionados com melhor desempenho reprodutivo. Porém para avaliar a hemodinâmica é necessário usar uma técnica de ultrassonografia denominada modo Doppler, que é um pouco mais moderna que o modo B (PUGLIESI et al., 2017).

No modo Doppler as ondas do transdutor conseguem captar estruturas em movimento, como no caso as células sanguíneas dentro dos vasos (VRISMAN et al., 2018). No caso do Doppler colorido, se as células sanguíneas estiverem seguindo na direção do transdutor, efeito Doppler positivo, ou se distanciando, efeito Doppler negativo, a imagem será codificada em tons que variam de vermelho para azul (PUGLIESI et al., 2017).

Nesse sentido, a associação de um adequado controle farmacológico com uma boa técnica de ultrassonografia, estão permitindo no atual cenário da pecuária moderna, a aplicação de tecnologias que auxiliam na melhoria da eficiência reprodutiva das fêmeas bovinas e conseqüente nos aspectos produtivos do sistema como um todo (BARUSELLI et al., 2018; PUGLIESI et al., 2017).

2.5 USO DA ULTRASSONOGRAFIA NA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS BOVINOS (CFA) E A RELAÇÃO COM O DESEMPENHO REPRODUTIVO

A CFA vem demonstrando ter relação com o desempenho reprodutivo de fêmeas bovinas (MOROTTI et al., 2017). Como no trabalho de Silva-Santos et al.

(2014), em que os autores identificaram, em fêmeas da raça Braford, que animais de alta CFA apresentam um melhor desempenho na produção *in vitro* de embriões. Além disso, os autores realizaram a CFA desde o momento da desama até os 24 meses de idade dos animais avaliados, identificando que a CFA varia entre diferentes animais, mas se mantém constante no mesmo animal, em diferentes avaliações.

Para realizar a CFA, Silva-Santos et al. (2014) utilizaram a ultrassonografia ovariana em modo B. Do mesmo modo, no trabalho de Morrotti et al. (2018) foi utilizada a ultrassonografia ovariana em modo B, para realizar a CFA de vacas da raça Nelore e dividir os animais em grupos de baixa, média e alta CFA. Os animais foram avaliados quanto a taxa de prenhez em um protocolo de IATF, em que as vacas de baixa CFA apresentam uma taxa de prenhez 12% maior que as vacas de alta CFA. Os trabalhos de Silva-Santos et al. (2014) e Morrotti et al. (2018) foram realizados com fêmeas de corte e na realidade do sistema de produção brasileiro.

Morrotti et al. (2018) descrevem que para realizar a CFA, cada ovário é completamente escaneado no exame ultrassonográfico, em que os folículos com mais de 3 mm são considerados e a CFA de cada animal corresponde a soma dos folículos observados no par de ovários, ou seja, a soma dos folículos encontrados no ovário direito e esquerdo.

Em trabalhos realizados fora da realidade brasileira, os autores descrevem que realizam a CFA também por ultrassonografia em modo B, como nos trabalhos de Ireland et al. (2008), Mossa et al. (2012) e Jimenez-Krassel et al. (2017). Contudo, os referidos trabalhos foram realizados com fêmeas da raça Holandesa e de alta produção leiteira. Nessa realidade, Ireland et al. (2008) e Mossa et al. (2012) identificaram que vacas de alta CFA tem um desempenho reprodutivo melhor que vacas de baixa CFA. Contrariando os achados de Ireland et al. (2008) e Mossa et al. (2012), o estudo realizado por Jimenez-Krassel et al. (2017) identificou que as vacas de baixa CFA demonstraram um menor intervalo entre partos e melhor taxa de prenhez. Assim é possível identificar a falta de trabalhos mais elucidativos, que utilizem a técnica de ultrassonografia em modo Doppler, para esclarecer a relação entre a CFA e o desempenho reprodutivo, principalmente para bovinos de leite na realidade do sistema de produção brasileiro.

3 REFERÊNCIAS

- ABIEC. Perfil da pecuária no Brasil. **BeefREPORT**, p. 49, 2019.
- ACOSTA, T. J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function : ovulation , corpus luteum formation and regression. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 127–140, 2004.
- ADRIAENS, I. et al. A novel system for on-farm fertility monitoring based on milk progesterone. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 9, p. 8369–8382, 2018.
- ALVAREZ, R. H. et al. Reproductive performance of *Bos indicus* beef cows treated with different doses of equine chorionic gonadotropin at the end of a progesterone-estrogen based protocol for fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v. 118, p. 150–156, 2018.
- AMBROSINI, D. P. et al. Genotype x environment interactions in reproductive traits of Nellore cattle in northeastern Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 48, n. 7, p. 1401–1407, 2016.
- BAIRD, T.; MCNEILLY, S. Relationship Between Secretion Concentration and the of Androgens and Estrogens by the Follicle in the Ewe ewes profound. **Biology of Reproduction**, v. 24, p. 1013–1025, 1981.
- BARUSELLI, P. S. et al. Review: Using artificial insemination v. natural service in beef herds. **Animal**, SUPPL. 1, p. 45–52, 2018.
- BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Animal**, v. 8, n. SUPPL. 1, p. 144–150, 2014.
- BONATO, D. V. et al. Cetose em vacas leiteiras de alta produção. **Revista Investigação**, v. 14, n. 6, p. 96–101, 2015.
- CAMPBELL, B. K.; SCARAMUZZI, R. J.; WEBB, R. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 49, p. 335–350, 1995.
- CERVO, H. J. et al. Economic values for production, functional and fertility traits in milk production systems in Southern Brazil. **Archivos de Zootecnia**, v. 66, n. 255, p. 419–427, 2017.
- CERVO, H. J. et al. Spatial distribution of productive, environmental, and socioeconomic factors to discriminate dairy cattle production in the south of Brazil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, p. 1–13, 2018.
- CHACUR, M. G. M. et al. Influência das épocas do ano na morfometria testicular e epididimária, características do sêmen e proteínas do sêmen em SDS-PAGE em zebus e taurinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, n. 1, p. 1–7, 2014.
- CHOUDARY, J. B.; GIER, H. T.; MARION, G. B. Cyclic changes in bovine vesicular follicles. **Journal of animal science**, v. 27, n. 2, p. 468–471, 1968.

CUNHA, R. R. et al. Inseminação artificial em tempo fixo em primíparas Nelore lactantes acíclicas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 4, p. 1041–1048, 2013.

DA SILVA, V. H. et al. Genome-wide detection of CNVs and their association with meat tenderness in Nelore cattle. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–23, 2016.

DE FIGUEIREDO, E. B. et al. Greenhouse gas balance and carbon footprint of beef cattle in three contrasting pasture-management systems in Brazil. **Journal of Cleaner Production**, v. 142, n. 2017, p. 420–431, 2017.

FERREIRA, R. M. et al. Synchronization treatments previous to natural breeding anticipate and improve the pregnancy rate of postpartum primiparous beef cows. **Theriogenology**, v. 114, p. 206–211, 2018.

FIELDS, M. J.; FIELDS, P. A. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. **Theriogenology**, v. 45, p. 1295–1325, 1996.

FIELDS, S. D. et al. Influence of standing estrus before an injection of GnRH during a beef cattle fixed-time AI protocol on LH release, subsequent concentrations of progesterone, and steroidogenic enzyme expression. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 42, n. 1, p. 11–19, 2012.

FLORINDO, T. J. et al. Carbon footprint and Life Cycle Costing of beef cattle in the Brazilian midwest. **Journal of Cleaner Production**, v. 147, p. 119–129, 2017.

FLORINDO, T. J. et al. Multicriteria decision-making and probabilistic weighing applied to sustainable assessment of beef life cycle. **Journal of Cleaner Production**, v. 242, 2020.

FORDE, N. et al. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3–4, p. 163–169, 2011.

FORTUNE, J. E. Ovarian Follicular Growth and Development in Mammals. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 225–232, 1994.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: Activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3–4, p. 135–163, 2003.

GARCIA-ISPIERTO, I. et al. Reproductive performance of lactating dairy cows after inducing ovulation using hCG in a five-day progesterone-based fixed-time AI protocol. **Theriogenology**, v. 107, p. 175–179, 2018.

GARCIA, A. Degeneração testicular: um problema superado ou ainda um dilema? **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 33–39, 2017.

GIRALDO ARANA, D.; URIBE VELÁSQUEZ, L. Estrategias para mejorar la condición corporal postparto en vacas de carne. **Biosalud**, n. 1, p. 71–89, 2012.

GODOI, C. R.; SILVA, E. F. P.; DE PAULA, A. P. Inseminação artificial em tempo fixo

(IATF) em bovinos de corte. **Pubvet**, v. 4, n. 14, p. 1–16, 2010.

GRIGOL, N. S. et al. Bovinocultura de corte e SAN: percepção de sustentabilidade de agentes da cadeia. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 26, n. 65, p. e019011, 2019.

GUGLIELMO, M. C.; ALBERTINI, D. F. The Structural Basis for Coordinating Oogenesis and Folliculogenesis. **Oogenesis**. p. 63–73, 2013.

HALLF, J. E. et al. Evidence of differential control of FSH and LH Secretion by Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) from the use of a GnRH antagonist*. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 67, n. 3, p. 524–531, 1988.

HORN, M. M.; MORAES, J. C. F.; GALINA, C. S. Qualidade do sêmen de touros das raças Aberdeen Angus e Brangus-Ibagé em frente à degeneração testicular experimental induzida por dexametasona. **Ciência Rural**, v. 29, n. 3, p. 523–526, 1999.

HYTTEL, P. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 23–32, 1997.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2018 PPM. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE**, p. 1–8, 2019.

INFORZATO, G. R. et al. Emprego de IATF (Inseminação Artificial Em Tempo Fixo) como alternativa na reprodução da pecuária. **Revista Científica Eletônica De Medicina Veterinária**, v. 11, p. 1–8, 2008.

IRELAND, J.L.H. et al. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction**, v.79, p.1219-1225, 2008.

JAGARLAMUDI, K.; RAJKOVIC, A. Molecular and cellular endocrinology oogenesis : transcriptional regulators and mouse models. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 356, n. 1–2, p. 31–39, 2012.

JIANG, J. Y. et al. Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles. **Reproduction**, v. 125, n. 2, p. 211–223, 2003.

JIMENEZ-KRASSEL, F. et al. A single ultrasound determination of ≥ 25 follicles ≥ 3 mm in diameter in dairy heifers is predictive of a reduced productive herd life. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 6, p. 5019–5027, 2017.

JUNG, C. F.; MATTE JÚNIOR, A. A. Produção leiteira no Brasil e características da bovinocultura leiteira no Rio Grande do Sul. **Ágora**, v. 19, n. 1, p. 34, 2017.

KAUFFOLD, J.; ALTHOUSE, G. C. An update on the use of B-mode ultrasonography in female pig reproduction. **Theriogenology**, v. 67, n. 5, p. 901–911, 2007.

KIPPERT, C. et al. Efeitos genéticos aditivos diretos e maternos e heterozigó ticos sobre os desempenhos pré e pós-desmama em uma população multirracial Aberdeen Angus x Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 8, p. 1383–1391, 2008.

KNOBIL, E. The GnRH pulse generator. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 163, n. 5, p. 1721–1726, 1990.

LEROY, J. L. M. R. et al. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. **Reproduction**, v. 130, n. 4, p. 485–495, 2005.

LEROY, J. L. M. R. et al. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: Are the oocyte and embryo in danger? Part I. The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 5, p. 612–622, 2008.

LOPES, M. A. et al. Análise de rentabilidade de sistema de produção de gado de corte em regime extensivo com baixa tecnologia no sul do estado de Minas Gerais. **Boletim de Indústria Animal**, v. 62, n. 2, p. 93–100, 2011.

MALUF, D. Z. et al. Avaliação da reutilização de implantes contendo progestágenos na taxa de prenhez em vacas de corte. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 1, p. 38–46, 2010.

MCNEILLY, A. S. et al. The differential secretion of FSH and LH: regulation through genes, feedback and packaging. **Reproduction**, v. 61, Supplement, p. 463–476, 2003.

MEIBURGER, K. M.; ACHARYA, U. R.; MOLINARI, F. Automated localization and segmentation techniques for B-mode ultrasound images: A review. **Computers in Biology and Medicine**, v. 92, p. 210–235, 2018.

MELLO, R. R. C. et al. Utilização da gonadotrofina coriônica equina (eCG) em protocolos de sincronização da ovulação para IATF em bovinos: revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 3, p. 129–134, 2015.

MENEGHETTI, M.; VASCONCELOS, J. L. M. Mês de parição, condição corporal e resposta ao protocolo de inseminação artificial em tempo fixo em vacas de corte primíparas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 4, p. 786–793, 2008.

MIHM, M.; BLEACH, E. C. L. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 217–237, 2003.

MONTEIRO, P. L. J. et al. Increasing estradiol benzoate, pretreatment with gonadotropin-releasing hormone, and impediments for successful estradiol-based fixed-time artificial insemination protocols in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 6, p. 3826–3839, 2015.

MORAES, B. M. M.; BENDER FILHO, R. Mercado Brasileiro de Lácteos : análise do impacto de políticas de estímulo à produção. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 55, n. 04, p. 783–800, 2017.

MOROTTI, F. et al. Ovarian follicular dynamics and conception rate in *Bos indicus* cows with different antral follicle counts subjected to timed artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 188, n. December 2017, p. 170–177, 2018.

MOROTTI, F. et al. Antral follicle count in cattle: advantages , challenges , and controversy. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 514–520, 2017.

MOSSA, F. et al. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 5, p. 2355–2361, 2012.

NETT, T. M. et al. Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1–2, p. 33–42, 2002.

NILSSON, E.; SKINNER, M. K. Cellular Interactions That Control Primordial Follicle Development and Folliculogenesis. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 8, n. 1, p. 17–20, 2001.

OLIVEIRA, V. S. A.; BONATO, G. L.; DOS SANTOS, R. M. Eficiência reprodutiva de vacas primíparas da raça Nelore. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, p. 1–4, 2011.

OOSTHUIZEN, N. et al. Administration of recombinant bovine somatotropin prior to fixed-time artificial insemination and the effects on fertility, embryo, and fetal size in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 96, n. 5, p. 1894–1902, 2018.

PALERMO, R. Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. **Reproductive BioMedicine**, v. 15, n. 3, p. 326–337, 2007.

PASHAEI KAMALI, F. et al. Environmental and economic performance of beef farming systems with different feeding strategies in southern Brazil. **Agricultural Systems**, v. 146, p. 70–79, 2016.

PAWSON, A. J.; MCNEILLY, A. S. The pituitary effects of GnRH. **Animal Reproduction Science**, v. 88, p. 75–94, 2005.

PUGLIESI, G. et al. Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 140–150, 2017.

REESE, S. T. et al. Pregnancy loss in beef cattle: A meta-analysis. **Animal Reproduction Science**, v. 212, p. 1-11, 2020.

RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F. Morphological classification of bovine ovarian follicles. **Reproduction**, v. 139, n. 2, p. 309–318, 2010.

RODRIGUES, W. B. et al. Timed artificial insemination plus heat II: Gonadorelin injection in cows with low estrus expression scores increased pregnancy in progesterone/estradiol-based protocol. **Animal**, v. 13, n. 10, p. 2313–2318, 2019.

ROSA, C. O. et al. Improvement on the efficiency of doses per conception by using a semen extender in timed artificial insemination. **Livestock Science**, v. 221, n. 2019, p. 77–81, 2019.

SALLES, M. F. G.; ARAÚJO, A. A. Corpo lúteo cíclico e gestacional : revisão. **Revista**

Brasileira de Reprodução Animal, v. 34, n. 3, p. 185–194, 2010.

SANTOS, C. L. R. et al. Genotype environment interaction on the weight gain of animals of the Nelore breed in the Midwest. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 71, n. 5, p. 1695–1702, 2019.

SANTOS, I. I. DOS; SOUSA, I. L. G. DE. Relação da taxa de gestação utilizando inseminação artificial em tempo fixo (IATF) com a taxa de produção de leite. **Saber digital**, v. 7, n. 1, p. 38–51, 2014.

SARTORI, R. et al. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 4, p. 905–920, 2004.

SARTORI, R. Manejo reprodutivo da fêmea leiteira. **Reprodução Animal**, v. 31, n. Xvii, p. 153–159, 2007.

SARTORI, R.; GUARDIEIRO, M. M. Fatores nutricionais associados à reprodução da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. SUPPL. 1, p. 422–432, 2010.

SATHESHKUMAR, S. Peri-follicular blood flow in the follicle from which ovulation occurs in cows. **Animal Reproduction Science**, v. 198, n. May, p. 154–159, 2018.

SCHUETZ, A. W. Local Control Mechanisms During Oogenesis and Folliculogenesis. **Oogenesis**. p. 1-81, 1985.

SERRANO-PÉREZ, B. et al. Maternal nutrient restriction in early pregnancy increases the risk of late embryo loss despite no effects on peri-implantation interferon-stimulated genes in suckler beef cattle. **Research in Veterinary Science**, v. 128, n. October 2019, p. 69–75, 2020.

SILVA FILHO, M. L. et al. Influence of biostimulation and temporary weaning on follicular dynamics and pregnancy rates in Nelore cows (*Bos taurus indicus*). **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 7, p. 1285–1291, 2015.

SILVA-SANTOS, K.C. et al. Antral follicle populations and embryo production - in vitro and in vivo - of *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.228-32, 2014.

TAYLOR-ROBINSON, A. W. et al. The potential for modification in cloning and vitrification technology to enhance genetic progress in beef cattle in Northern Australia. **Animal Reproduction Science**, v. 148, n. 3–4, p. 91–96, 2014.

TEIXEIRA, R. A.; ALBUQUERQUE, L. G. Heteroses materna e individual para ganho de peso pré-desmama em bovinos Nelore x Hereford e Nelore x Angus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 57, n. 4, p. 518–523, 2005.

THATCHER, W. W. A 100-Year Review: Historical development of female reproductive physiology in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10272–10291, 2017.

USDA. Dairy: World markets and trade. July. **United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service**, n. July, 2018.

VIEIRA, A. et al. Produtividade e eficiência de vacas nelore em pastagem de *Brachiaria decumbens* stapf nos cerrados do brasil central. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 4, p. 1357–1365, 2005.

VIZCARRA, J. A. et al. Effect of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on serum and pituitary concentrations of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone, GnRH receptors, and messenger ribonucleic acid for gonadotropin subunits in cows. **Endocrinology**, v. 138, n. 2, p. 594–601, 1997.

VRISMAN, D. P. et al. Avaliação reprodutiva de bovinos de leite da região de Guarapuava-PR. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 21, p. 334–345, 2015.

VRISMAN, D. P. et al. Corpus luteum dynamics after ovulation induction with or without previous exposure to progesterone in prepubertal Nellore heifers. **Theriogenology**, v. 106, p. 60–68, 2018.

WANG, L. et al. Origin and transmission of bovine viral diarrhoea virus type 1 in China revealed by phylodynamic analysis. **Research in Veterinary Science**, v. 128, n. November 2019, p. 162–169, 2020.

WEBB, R. et al. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. **Reproduction**, v. 61, p. 71–90, 2003.

YANG, M. Y.; FORTUNE, J. E. Testosterone stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 75, p. 924–932, 2006.

YAVAS, Y.; WALLON, J. S. Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: A review. **Theriogenology**, v. 1, n. 1, p. 1–23, 2000.

ZEINELDIN, M. et al. Synergetic action between the rumen microbiota and bovine health. **Microbial Pathogenesis**, v. 124, n. May, p. 106–115, 2018.

4 HIPÓTESES

- Primíparas da raça Nelore, em comparação com outras categorias, tem menor taxa de manifestação de estro e maior taxa de prenhez, quando não manifestam estro e são tratadas com GnRH no momento da IATF.
- Vacas da raça Holandesa com baixa CFA apresentam folículos pré-ovulatórios maiores e com maior área de perfusão sanguínea que vacas de alta CFA.
- Vacas da raça Holandesa de baixa CFA possuem corpos lúteos maiores e mais vascularizados, quando comparadas com vacas de alta CFA.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito da categoria (nulíparas, primíparas e múltiparas) sobre a taxa de prenhez de fêmeas Nelore que não manifestam estro no momento da inseminação artificial em tempo-fixo (IATF) e são tratadas com GnRH e, comparar a dinâmica e a hemodinâmica ovariana de vacas Holandesas com baixa e alta contagem de folículos antrais (CFA).

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a taxa de manifestação de estro de nulíparas, primíparas e múltiparas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) submetidas a IATF;

- Avaliar o efeito da categoria sobre a taxa de prenhez de fêmeas Nelore que não manifestaram estro no momento da IATF e são tratadas com GnRH;

- Comparar a CFA individual de vacas da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*) nos diferentes dias do protocolo (D0, D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10, D11 e D21);

- Comparar o diâmetro e a área de vascularização dos folículos pré-ovulatórios de vacas da raça Holandesa com baixa e alta CFA;

- Comparar a área dos corpos lúteos de vacas da raça Holandesa de baixa e alta CFA;

- Comparar a área de perfusão sanguínea dos corpos lúteos de vacas da raça Holandesa de baixa e alta CFA;

6 ARTIGO A – EFEITO DA CATEGORIA DE FÊMEAS NELORE (NULÍPARAS, PRIMÍPARAS E MULTÍPARAS) NA TAXA DE MANIFESTAÇÃO DE ESTRO E NA TAXA DE PREENHEZ À IATF, ASSOCIADO AO USO ESTRATÉGICO DO GnRH

O artigo A foi redigido conforme as normas do periódico Livestock Science.

Resumo

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito das categorias nulíparas, primíparas e múltiparas sobre a taxa de manifestação de estro e a taxa de prenhez de fêmeas que não manifestaram estro, mas foram tratadas com GnRH no momento da inseminação artificial em tempo-fixado (IATF). Foram utilizadas 531 matrizes, todas da raça Nelore, com escore de condição corporal (ECC) variando entre 2,75 a 3,5 (escala de 1 a 5). Os animais foram alocados de acordo com a categoria, compreendendo 144 nulíparas, 132 primíparas e 255 múltiparas. As primíparas e múltiparas estavam lactantes e com período pós-parto de 35 a 60 dias. As matrizes foram submetidas a um protocolo de IATF. Para identificar a manifestação de estro, no oitavo dia do protocolo, a região sacrococcígea foi pintada e no dia da inseminação artificial, as fêmeas que manifestaram estro demonstraram ausência de tinta nesta região. As fêmeas que não manifestaram estro foram tratadas com 10µg de GnRH. As taxas de manifestação de estro e prenhez foram analisadas por um modelo de regressão logística. A taxa de manifestação de estro foi inferior ($P = 0.006$) na categoria das primíparas (61,36%) em comparação com as nulíparas (76,39%) e as múltiparas (75,69%). Foi semelhante entre as categorias as taxas de prenhez das fêmeas que manifestaram estro (nulíparas 84,54%, primíparas 86,42% e múltiparas 80,31%; $P = 0.398$), das matrizes que não manifestaram estro e receberam GnRH (nulíparas 41,18%, primíparas 56,86% e múltiparas 58,06%; $P = 0.244$) e a taxa de prenhez total (nulíparas 74,3%, primíparas 75% e múltiparas 74,9%; $P = 0.989$). O grupo das primíparas teve menor taxa de manifestação de estro e não houve diferença da taxa de prenhez entre as categorias com o uso de GnRH.

Palavras-chave: *Bos taurus indicus*, ovulação, concepção, bovinocultura de corte e biotecnologia da reprodução.

1. Introdução

A inseminação artificial em tempo-fixado (IATF) é uma técnica amplamente difundida, com protocolos farmacológicos bem estabelecidos e de resultados comprovados (Baruselli et al., 2018). Entretanto, a busca do avanço na viabilidade econômica associada a sustentabilidade exige ainda a melhora dos índices produtivos (Florindo et al., 2017; Rosa et al., 2019). O progresso do conhecimento na IATF permite a adaptação e a evolução dos protocolos, resultando em melhores índices (Baruselli et al., 2018). Assim, diversos estudos visam gerar informações que possam ajudar no incremento das taxas de prenhez à IATF (Ferreira et al., 2018; Gouvêa et al., 2018; Pfeifer et al., 2015).

Nogueira et al. (2019) avaliaram a relação da taxa de prenhez com a manifestação de estro de 3121 fêmeas da raça Nelore submetidas à IATF. Os referidos autores identificaram que os animais que manifestam estro apresentam taxa de prenhez 20,91% maior do que as vacas que não demonstram. As vacas que não manifestam estro durante até o momento da IATF normalmente não respondem adequadamente ao protocolo e não apresentam um folículo dominante de tamanho adequado para produzir a quantidade de estrógeno suficiente para manifestação do estro (Gentry Jr et al., 2016). Dessa forma, apresentam menor probabilidade de ficarem gestantes devido à possibilidade de não ovular ou ovular após o período de viabilidade do sêmen utilizado na inseminação artificial (IA) realizada em tempo-fixado (Gentry Jr et al., 2016; Nogueira et al., 2019).

A administração do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) em animais que possuem folículos dominantes, mas de tamanho inferior, aumenta a chance da ovulação ocorrer dentro do período de viabilidade do sêmen, possibilitando o desenvolvimento da gestação, mesmo em animais que são inseminados em tempo-fixado (Fields et al., 2012). Partindo desse princípio, Rodrigues et al. (2019) avaliaram o efeito da administração do GnRH em vacas multíparas que não manifestam estro no dia da IATF e identificaram aumento na taxa de prenhez.

Contudo, existem diferenças no desempenho reprodutivo das categorias de fêmeas bovinas (Marques et al., 2015). Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito das categorias nulíparas, primíparas e multíparas sobre a taxa de manifestação de estro e a taxa de prenhez de fêmeas que não manifestam estro, mas foram tratadas com GnRH no momento da IATF.

2. Material e métodos

Local do Experimento e Animais

O experimento foi realizado em uma única fazenda, localizada no município de Tamarana, Paraná, Brasil, que realiza à mais de uma década um trabalho de seleção de animais da raça Nelore, utilizando genética melhoradora para características maternas, descartando animais com problemas ou baixa eficiência reprodutiva e aplicando técnicas que visam um adequado controle sanitário do rebanho. Para o experimento foram utilizadas 531 fêmeas bovinas (*Bos taurus indicus*), da raça Nelore, com escore de condição corporal (ECC) variando entre 2,75 a 3,5, pontuado em uma escala de 1 a 5 (Lowman et al., 1976). As fêmeas foram mantidas em pastagem de *Brachiaria brizantha* cultivar marandu e suplementadas com fonte mineral *ad libitum*. Embora os animais receberam o mesmo manejo, a título de estudo, as fêmeas foram alocadas em três grupos experimentais de acordo com a categoria, compreendendo 144 novilhas nulíparas, 132 vacas primíparas e 255 vacas múltíparas.

As novilhas tinham entre 24 e 30 meses, as primíparas entre 33 e 39 meses e as múltíparas tinham mais de 44 meses de idade. As vacas dos grupos das primíparas e múltíparas estavam lactantes, com período pós-parto variando de 35 a 60 dias no início do experimento. As fêmeas de todos os grupos foram submetidas a um protocolo de IATF com as mesmas práticas de manejos (**Figura 1**) e inseminadas usando o sêmen de um único touro previamente avaliado. As diferentes categorias foram comparadas quanto à taxa de manifestação de estro e taxa de prenhez.

Inseminação Artificial em Tempo-Fixo (IATF)

O protocolo de sincronização de ovulação (**Figura 1**) iniciou em todas as fêmeas do experimento em um dia aleatório do ciclo estral (D0), com a aplicação de 2mg de benzoato de estradiol (Syncrogen®, GlobalGen Vet Science, Jaboticabal, São Paulo, Brasil) e a inserção de um dispositivo intravaginal de primeiro uso, impregnado com 1g de progesterona (Repro neo®, GlobalGen Vet Science, Jaboticabal, São Paulo, Brasil) nos animais do grupo das primíparas e múltíparas. O grupo das novilhas recebeu um dispositivo contendo 0,5g de progesterona (Repro one®, GlobalGen Vet Science, Jaboticabal, São Paulo, Brasil). As novilhas receberam menor dosagem de

progesterona seguindo a recomendação de Martins et al. (2014). No D0, também foi realizada a avaliação do escore de condição corporal (ECC) de todas as fêmeas participantes do experimento.

Após 8 dias (D8), foi retirado o dispositivo de progesterona e aplicado nos animais de todos os grupos 300 UI de eCG (Gonadotrofina coriônica equina; eCGen®, GlobalGen Vet Science, Jaboticabal, São Paulo, Brasil), 0,526 mg de cloprostenol (PGF2 α , Induscio®, GlobalGen Vet Science, Jaboticabal, São Paulo, Brasil) e cipionato de estradiol (0,6 mg para novilha e 1 mg para primípara e múltipara; Cipion®, GlobalGen Vet Science, Jaboticabal, São Paulo, Brasil). A menor dose de cipionato de estradiol para as novilhas foi realizada considerando os trabalhos de Sá Filho et al. (2014) e Sá Filho et al. (2015). No D8, também foi realizado a pintura da região sacrococcígea de todos os animais para avaliar a manifestação de estro, seguindo a metodologia descrita por Nogueira et al. (2019) e como demonstrado na **Figura 2**.

No dia 10 (D10; após 48 horas da retirada do dispositivo intravaginal) todas as fêmeas foram inseminadas. Contudo, os animais que tiveram a pintura da base da cauda removida, como demonstrado na imagem C da **Figura 2**, foram inseminadas de forma convencional e os que apresentavam a base da cauda totalmente ou parcialmente pintada, exemplificado nas imagens A e B da **Figura 2**, após serem inseminadas, receberam uma injeção de 10 μ g de acetato de buserelina (IM, Prorelinn®, Boehringer Ingelheim Saúde Animal, Campinas, São Paulo, Brasil), hormônio sintético análogo ao GnRH. A avaliação para interpretação de presença parcial, total ou ausência de pintura na cauda foi realizada de acordo com o descrito por Nogueira et al. (2019). A **Figura 1** demonstra em destaque o momento da administração de GnRH nas fêmeas que não manifestaram estro.

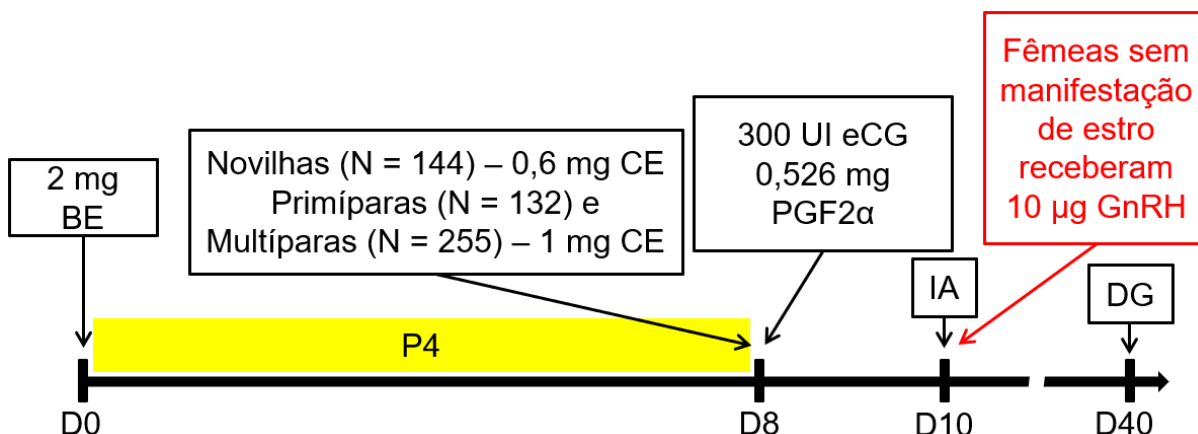


Figura 1. Protocolo farmacológico utilizado para a sincronização de ovulação nas fêmeas Nelore dos grupos experimentais, demonstrando a diferença na dose de CE usado em novilhas e vacas. Destacado em vermelho a dose de GnRH administrada nas fêmeas que não manifestaram estro. BE: benzoato de estradiol, P4: progesterona, eCG: gonadotropina coriônica equina, PGF2 α : prostaglandina, CE: cipionato de estradiol, IA: inseminação artificial, GnRH: hormônio liberador de gonadotrofina e DG: diagnóstico de gestação.

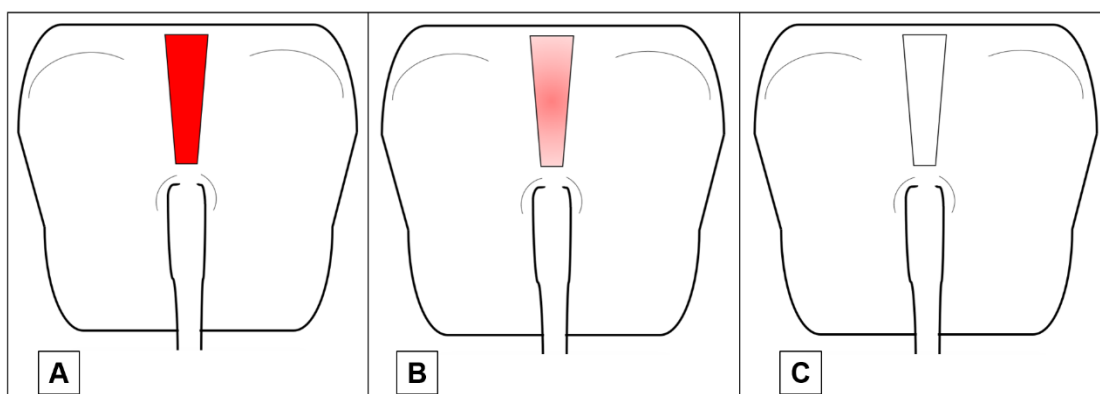


Figura 2. Representação esquemática da garupa das vacas, exemplificando a forma que foi realizada a identificação de estro nos animais de ambos os grupos experimentais. A: Pintura da região sacrococcígea, realizada no oitavo dia do protocolo de indução de ovulação (D8), se no décimo dia do protocolo (D10), momento da inseminação artificial (IA), o animal ainda apresentasse essa mesma pintura, significava ausência de estro. B: Animais que tiveram a tinta parcialmente removida, indicando que o animal teve um estro fraco até do momento da IA. C: Animais que tiveram a tinta totalmente removida, demonstrando que a fêmea teve um estro forte até do momento da IA.

O diagnóstico de gestação foi realizado em todas as fêmeas após 30 dias da IATF por ultrassonografia, com transdutor linear transretal de 5 MHz (Aloka SSD-500, Aloka Co. Ltda., Tóquio, Japão), sendo confirmado pela presença do concepto viável no útero. Tanto as inseminações artificiais quanto os diagnósticos de gestação foram realizados por um único médico veterinário capacitado.

Análise Estatística

O efeito das diferentes categorias (nulíparas, primíparas e múltíparas) na taxa

de manifestação de estro, taxa de concepção das fêmeas que manifestaram estro e taxa de concepção das matrizes que receberam GnRH foram analisados por um modelo de regressão logística binária, incluindo o efeito da categoria como variável fixa no modelo e o ECC como covariável. Na presença de um efeito significativo, as taxas foram comparadas pelo teste de Qui-quadrado para o ranking das categorias. Para análise descritiva, os dados estão apresentados como porcentagem (%). Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico Minitab®, versão 18.1. O nível de significância para rejeitar H0 (a hipótese nula) foi de 5%, portanto, um nível de significância $\leq 0,05$ foi considerado para indicar um efeito das variáveis categóricas e suas interações.

3. Resultados

Não foi observado efeito ($P > 0.1$) do ECC sobre a taxa de prenhez de todas as categorias de fêmeas. A taxa de manifestação de estro geral foi de 72,32% (384/531), sendo inferior ($P = 0.006$) na categoria das primíparas (61,36% - 81/132), quando comparada com a porcentagem de manifestação de estro das nulíparas (76,39% - 110/144) e das múltíparas (75,69% - 193/255; **Figura 3**).

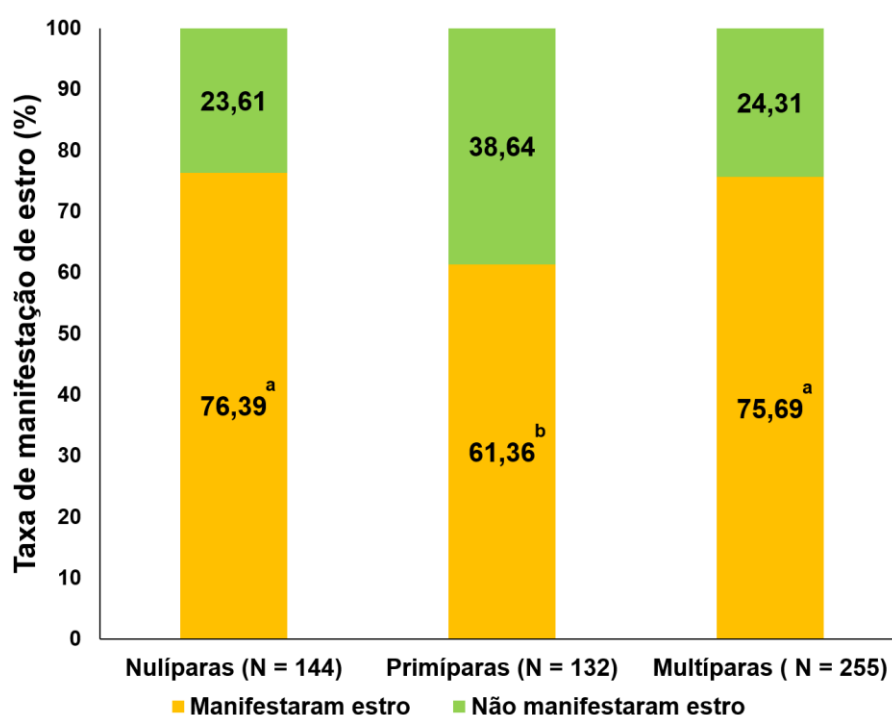


Figura 3. Taxa de manifestação de estro de diferentes categorias (nulíparas, primíparas e múltíparas) de fêmeas Nelore no protocolo de sincronização de ovulação. Valores com diferentes letras sobscritas representam significância estatística ($P = 0.006$).

A taxa de prenhez geral dos animais utilizados no experimento foi de 74,76% (397/531), sendo semelhante na comparação entre as três categorias ($P = 0,989$). A taxa de prenhez geral dos animais que manifestaram estro foi de 82,81% (318/384) e dos que não manifestaram estro, sendo tratados com GnRH, foi de 53,74% (79/147). Não houve diferença entre as categorias na taxa de prenhez dos animais que manifestaram estro ou não (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Taxa de prenhez de diferentes categorias de fêmeas Nelore submetidas a inseminação artificial em tempo-fixo associada ao uso estratégico de GnRH em fêmeas que não manifestaram estro.

Categoria	Prenhez/Estro	Prenhez/GnRH	Prenhez Total
Nulíparas	84,54% (93/110)	41,18% (14/34)	74,3% (107/144)
Primíparas	86,42% (70/81)	56,86% (29/51)	75% (99/132)
Múltiparas	80,31% (155/193)	58,06% (36/62)	74,9% (191/255)
Valor de P	0,398	0,244	0,989

4. Discussão

A categoria das primíparas foi o grupo com menor manifestação de estro, resultados semelhantes aos encontrados por Ferraz Junior et al., (2016), que também avaliaram a manifestação de estro em diferentes categorias de fêmeas Nelore. Segundo Cunha et al., (2013), isso ocorre devido ao fato de que a primípara é a categoria mais desafiada metabolicamente entre matrizes da raça Nelore, principalmente quando criadas em sistema exclusivamente a pasto, recebendo apenas suplementação mineral.

Esse desafio está relacionado, na maioria dos casos, com a necessidade que a primípara tem de dispor nutrientes suficientes para finalizar seu crescimento e para a lactação (Cunha et al., 2013). Apenas em condições favoráveis, a primípara irá disponibilizar nutrientes para uma nova gestação, demonstrando assim uma resposta inferior no desempenho reprodutivo geral (Oliveira et al., 2011).

Outra semelhança do presente estudo com o trabalho de Ferraz Junior et al. (2016) é que não houve efeito do ECC sobre desempenho reprodutivo entre as categorias avaliadas. Apesar do ECC ser um importante parâmetro para determinar a condição metabólica de fêmeas bovinas (Gionbelli et al., 2015), uma única avaliação

no momento do início do protocolo de IATF, como foi realizado no presente estudo e no de Ferraz Junior et al. (2016), não demonstra fidedignamente como está a condição de balanço energético da vaca. De acordo com D'Occhio et al. (2019), para relacionar o ECC com a condição metabólica e um melhor desempenho reprodutivo, é necessário realizar a avaliação em mais ocasiões, principalmente no momento do parto, algo difícil de ser realizado em bovinos criados em sistemas extensivos. Esse pode ser o motivo pelo qual as primíparas, mesmo demonstrando no início do protocolo um ECC adequado, tiveram menor taxa de manifestação de estro.

Contudo, as primíparas que manifestaram estro no momento da sincronização, tiveram uma taxa de prenhez semelhante a das nulíparas e múltiparas. Esse fato demonstra que se a primípara manifestar estro na sincronização, poderá ter um desempenho reprodutivo tão bom quanto as demais categorias. Independente da categoria, as fêmeas que manifestaram estro, apresentaram taxas de prenhez acima de 80% na sincronização, dados superiores aos encontrados por Nogueira et al. (2019), que obtiveram 60,91% de prenhez avaliando apenas fêmeas múltiparas da raça Nelore que manifestaram estro. Com relação as múltiparas do presente estudo, a taxa de prenhez total foi de 74,9%, valores altos quando comparados aos 54,01% encontrados por Rodrigues et al. (2019), que também administraram GnRH em múltiparas que não manifestaram estro.

Contudo, Rodrigues et al. (2019) citam que diversos fatores, como a condição de ambiente, têm grande influência no desempenho reprodutivo de fêmeas bovinas submetidas à IATF. Nesse sentido, quando compara-se a taxa de prenhez total das múltiparas com os dados demonstrados por Crepaldi et al. (2019), que obtiveram 68,4% de taxa de prenhez em fêmeas Nelore múltiparas, submetidas ao mesmo tipo de protocolo farmacológicos usado no presente estudo, é possível perceber que a diferença não é tão expressiva, demonstrando que a realidade de condições de ambiente onde o estudo de Crepaldi et al. (2019) foi realizado, provavelmente é mais parecida com as do presente estudo.

Além disso, Crepaldi et al. (2019) não administraram GnRH nas fêmeas que não manifestaram estro e, em comparação com os resultados presente estudo, mesmo os referidos autores tendo uma alta taxa de prenhez na categoria das múltiparas, foi 6,5 pontos percentuais mais baixos que os dados do presente estudo, demonstrando que a categoria da múltiparas é favorecida com um uso do GnRH. Não somente as múltiparas do presente estudo foram favorecidas com o uso do GnRH,

mas também as primíparas, tendo em vista que, mesmo tendo menor taxa de manifestação de estro, tiveram a mesma taxa de prenhez que as demais categorias.

O efeito do GnRH já havia sido comprovado no trabalho realizado por Rodrigues et al. (2019), que identificaram o efeito da administração do GnRH em 937 multíparas que não manifestaram estro no dia da IATF em relação ao grupo controle (NaCl 0,9%), observando um aumento na taxa prenhez de 9,77% com o uso GnRH. Diferente do estudo de Rodrigues et al. (2019), o presente trabalho avaliou o efeito de diferentes categorias sobre a uso do GnRH em animais que não manifestam estro. Marques et al. (2015) citam que primíparas e multíparas tendem a ter um desempenho reprodutivo inferior ao demonstrado por nulíparas

Marques et al. (2015) relacionam o desempenho inferior da primíparas e das multíparas com fato de estarem lactantes e isso possivelmente resultar em um desgaste energético para essas categorias, deixando os animais em balanço energético negativo (BEN). Animais em BEN não tem picos de hormônio luteinizante (LH) suficientes para promover a ovulação (Rodríguez e Torres, 2001). Outro ponto que pode prejudicar a ovulação em animais lactantes é a interação sensorial entre a vaca e o bezerro, que de acordo com Perea et al. (2008), essa interação estimula a secreção de opioides endógenos pelo hipotálamo, inibindo a secreção de GnRH e consequentemente a frequência de picos de LH necessários para ovulação. Além disso, existe o efeito de sucção do bezerro lactente, que em alguns estudos foi relacionado com a redução na quantidade de receptores intrafoliculares para LH (Campos et al., 2013; Perea et al., 2008).

Contudo, o uso do GnRH exógeno em animais lactantes, mesmo na presença do bezerro, faz com que ocorra a liberação do LH pela hipófise e promova a ovulação, resultando na prenhez de animais que naturalmente não ficariam gestantes quando inseminados em tempo-fixos (D'Occhio et al., 2019), algo que provavelmente ocorreu no grupo das primíparas e nas multíparas, que acabaram tendo a mesma taxa de prenhez que as nulíparas não lactantes.

Conclusão

A categoria das primíparas demonstrou menor taxa de manifestação de estro no protocolo de sincronização da ovulação para inseminação em tempo-fixos. Não houve diferença na taxa de prenhez entre as três categorias, tanto para as que

manifestaram estro, como para as que não manifestaram e foram tratadas com GnRH e na taxa de prenhez total.

Referências

- Baruselli, P.S., Ferreira, R.M., Sá Filho, M.F., Bó, G.A., 2018. Review: Using artificial insemination v. natural service in beef herds. *Animal*.
<https://doi.org/10.1017/S175173111800054X>
- Campos, J.T., Marinho, L.S.R., Lunardelli, P.A., Morotti, F., Seneda, M.M., 2013. Resynchronization of estrous cycle with eCG and temporary calf removal in lactating *Bos indicus* cows. *Theriogenology* 80, 619–623.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.05.029>
- Crepaldi, G.A., Sales, J.N.S., Giroto, R.W., Carvalho, J.G.S., Baruselli, P.S., 2019. Effect of induction of ovulation with estradiol benzoate at P4 device removal on ovulation rate and fertility in *Bos indicus* cows submitted to a TAI protocol. *Anim. Reprod. Sci.* 209, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106141>
- Cunha, R.R., Fernandes, C.A.C., Garcia, J.A.D., Gioso, M.M., 2013. Inseminação artificial em tempo fixo em primíparas Nelore lactantes acíclicas. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 65, 1041–1048.
<https://doi.org/10.1590/S0102-09352013000400015>
- D’Occhio, M.J., Baruselli, P.S., Campanile, G., 2019. Influence of nutrition, body condition, and metabolic status on reproduction in female beef cattle: A review. *Theriogenology* 125, 277–284.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.11.010>
- Ferraz Junior, M.V.C., Pires, A. V, Biehl, M. V, Santos, M.H., Barroso, J.P.R., Gonçalves, J.R.S., Sartori, R., Day, M.L., 2016. Comparison of two timed artificial insemination system schemes to synchronize estrus and ovulation in Nelore cattle. *Theriogenology* 86, 1939–1943.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.06.012>
- Ferreira, R.M., Conti, T.L., Gonçalves, R.L., Souto, L.A., Sales, J.N.S., Sá Filho, M.F., Elliff, F.M., Baruselli, P.S., 2018. Synchronization treatments previous to natural breeding anticipate and improve the pregnancy rate of postpartum primiparous beef cows. *Theriogenology* 114, 206–211.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.022>
- Fields, S.D., Gebhart, K.L., Perry, B.L., Gonda, M.G., Wright, C.L., Bott, R.C., Perry, G.A., 2012. Influence of standing estrus before an injection of GnRH during a beef cattle fixed-time AI protocol on LH release, subsequent concentrations of progesterone, and steroidogenic enzyme expression. *Domest. Anim. Endocrinol.* 42, 11–19.
<https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2011.08.002>
- Florindo, T.J., de Medeiros Florindo, G.I.B., Talamini, E., da Costa, J.S., Ruviaro, C.F., 2017. Carbon footprint and Life Cycle Costing of beef cattle in the Brazilian

- midwest. *J. Clean. Prod.* 147, 119–129.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.01.021>
- Gentry Jr, G.T., Walker, R.S., Gentry, L.R., 2016. Impacts of incorporation of follicle stimulating hormone into an estrous synchronization protocol for timed artificial insemination of crossbred beef cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 168, 19–25.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.021>
- Gionbelli, M.P., Duarte, M.S., Filho, S.C.V., Detmann, E., Chizzotti, M.L., Rodrigues, F.C., Zanetti, D., Gionbelli, T.R.S., Machado, M.G., 2015. Achieving body weight adjustments for feeding status and pregnant or non-pregnant condition in beef cows. *PLoS One* 10, 1–20.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112111>
- Gouvêa, V.N. De, Colli, M.H.A., Gonçalves Junior, A.W., Motta, J.C.L., Acedo, T.S., De Vasconcellos, G. de S.F.M., Tamassia, L.F.M., Ellif, F.M., Mingoti, R.D., Baruselli, P.S., 2018. The combination of β -carotene and vitamins improve the pregnancy rate at first fixed-time artificial insemination in grazing beef cows. *Livest. Sci.* 217, 30–36.
<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.09.002>
- Lowman, B.G., Scott, N.A., Somerville, S.H., 1976. East of Scotland College of Agriculture. Animal Production A, Department D. Condition Scoring of Cattle: Edinburgh School of Agriculture.
- Marques, M.D.O., Morotti, F., da Silva, C.B., Júnior, M.R., da Silva, R.C.P., Baruselli, P.S., Seneda, M.M., 2015. Influence of category-heifers, primiparous and multiparous lactating cows-in a large-scale resynchronization fixed-time artificial insemination program. *J. Vet. Sci.* 16, 367–371.
<https://doi.org/10.4142/jvs.2015.16.3.367>
- Martins, T., Peres, R.F.G., Rodrigues, A.D.P., Pohler, K.G., Pereira, M.H.C, Day, M.L., Vasconcelos, J.L.M., 2014. Effect of progesterone concentrations, follicle diameter, timing of artificial insemination, and ovulatory stimulus on pregnancy rate to synchronized artificial insemination in postpubertal Nelore heifers. *Theriogenology* 81, 446–453.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.10.020>
- Nogueira, E., Silva, M.R., Silva, J.C.B., Abreu, U.P.G., Anache, N.A., Silva, K.C., Cardoso, C.J.T., Sutovsky, P., Rodrigues, W.B., 2019. Timed artificial insemination plus heat I: Effect of estrus expression scores on pregnancy of cows subjected to progesterone-estradiol-based protocols. *Animal* 13, 2305–2312.
<https://doi.org/10.1017/S1751731119000442>
- Oliveira, V.S.A., Bonato, G.L., dos Santos, R.M., 2011. Eficiência reprodutiva de vacas primíparas da raça Nelore. *Acta Sci. Vet.* 39, 1–4.
- Perea, F.P., De Ondiz, A.D., Palomares, R.A., Hernández, H.J., González, R., Soto, E.R., 2008. 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. *Anim. Reprod. Sci.* 106, 298–310.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.05.003>

- Pfeifer, L.F.M., Castro, N.A., Melo, V.T.O., Neves, P.M.A., Cestaro, J.P., Schneider, A., 2015. Timed artificial insemination in blocks: A new alternative to improve fertility in lactating beef cows. *Anim. Reprod. Sci.* 163, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.10.002>
- Rodrigues, W.B., Silva, A.S., Silva, J.C.B., Anache, N.A., Silva, K.C., Cardoso, C.J.T., Garcia, W.R., Sutovsky, P., Nogueira, E., 2019. Timed artificial insemination plus heat II: Gonadorelin injection in cows with low estrus expression scores increased pregnancy in progesterone/estradiol-based protocol. *Animal* 13, 2313–2318. <https://doi.org/10.1017/S1751731119000454>
- Rodríguez, J.M.P., Torres, M.T.S., 2001. Efecto del consumo de energía en los procesos reproductores de la hembra bovina. Una revisión. *Rev. Científica da Fac. Ciências Veterinárias* 256–263.
- Rosa, C.O., Bonato, D.V., Souza, A.K., Morotti, F., Francisco, R.C., Basso, A.C., Martins, M.I.M., Seneda, M.M., 2019. Improvement on the efficiency of doses per conception by using a semen extender in timed artificial insemination. *Livest. Sci.* 221, 77–81. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.01.014>
- Sá Filho, M.F., Marques, M.O., Giroto, R., Santos, F.A., Sala, R. V, Barbuio, J.P., Baruselli, P.S., 2014. Resynchronization with unknown pregnancy status using progestin-based timed artificial insemination protocol in beef cattle. *Theriogenology* 81, 284–290. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.027>
- Sá Filho, M.F., Nasser, L.F.T., Penteadó, L., Prestes, R., Marques, M.O., Freitas, B.G., Monteiro, B.M., Ferreira, R.M., Gimenes, L.U., Baruselli, P.S., 2015. Impact of progesterone and estradiol treatment before the onset of the breeding period on reproductive performance of *Bos indicus* beef heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 160, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.06.024>

7 ARTIGO B – AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DA DINÂMICA OVARIANA DE VACAS DA RAÇA HOLANDESA COM BAIXA E ALTA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS

O artigo B foi redigido conforme as normas do periódico Theriogenology.

Resumo

A contagem de folículos antrais (CFA) vem sendo relacionada com o desempenho reprodutivo em diversos trabalhos. Com o intuito de compreender melhor a relação entre a CFA e o desempenho reprodutivos de fêmeas bovinas de aptidão leiteira, foram realizados dois experimentos em vacas da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*). O primeiro teve como objetivo avaliar se ocorre variação da CFA durante os dias do protocolo de indução de ovulação. O segundo teve o intuito comparar a dinâmica folicular e a perfusão sanguínea ovariana de vacas com baixa e alta CFA. Para avaliar a repetibilidade da CFA durante o protocolo, 20 vacas foram submetidas à sincronização de ovulação e tiveram a CFA aferida por ultrassonografia durante todos os dias do protocolo e onze dias após a ovulação. Para comparar dinâmica folicular ovariana de fêmeas de alta e baixa CFA, 80 vacas tiveram a quantidade de folículos antrais contada, sendo que, destas foram selecionadas apenas 9 fêmeas para o grupo de baixa (≤ 15 folículos) e 9 para o grupo de alta (≥ 25 folículos). As fêmeas ($n=18$) tiveram a dinâmica folicular acompanhada diariamente por ultrassom, em modo B e Doppler, durante os dias do protocolo e onze dias após a ovulação, para avaliar o corpo lúteo (CL). Foi comparado, entre os animais de alta e baixa CFA, o diâmetro do folículo pré-ovulatório (FO), a área de vascularização do FO, a área do CL e a área de vascularização do CL. Para determinar a constância da CFA nos dias do protocolo realizou-se o cálculo de repetibilidade. Para os dados da dinâmica dos animais de baixa e alta, as variáveis paramétricas foram analisadas pelo teste T e as não paramétricas pelo teste de Mann-Whitney. Para comparação do diâmetro folicular dentro dos grupos, as variáveis paramétricas foram analisadas por ANOVA. Adotou-se significância quando $p \leq 0,1$. A repetibilidade da CFA nos diferentes dias do protocolo foi de 0.98. Os animais de baixa CFA, demonstraram maior diâmetro do FO (16,09 x 15,00 mm; $P = 0.059$), maior área de vascularização do FO (17,36 x 8,16 mm²; $P = 0.005$), maior área de CL (579,10 x 405,80 mm²; $P = 0.0001$) e maior área

de perfusão sanguínea do CL (97,16 x 68,30 mm²; P = 0.021). A CFA tem alta repetibilidade nos diferentes dias do protocolo e as vacas de baixa CFA demonstraram FOs e CLs maiores e com maior perfusão sanguínea.

Palavras-chave: *Bos taurus taurus*; Doppler; Sincronização de ovulação; Corpo lúteo; Perfusão sanguínea ovariana.

1. Introdução

A contagem de folículos antrais (CFA) vem sendo relacionada com o desempenho reprodutivo de fêmeas bovinas em diversos trabalhos [1–9]. Os resultados de estudos realizados, avaliando vacas *Bos taurus indicus* da raça Nelore, submetidas à inseminação artificial em tempo-fixo (IATF), têm demonstrado um melhor desempenho reprodutivo de vacas com menor CFA [10,11]. Como é o caso do trabalho de Morotti et al. [12], que relataram uma taxa de prenhez 12,2 pontos percentuais maior nas fêmeas com baixa CFA.

Entretanto, estudos realizados com vacas *Bos taurus taurus*, avaliando exclusivamente animais da raça Holandesa, demonstraram resultados contraditórios. Mossa et al. [13] identificaram melhor desempenho reprodutivo em vacas com alta CFA, enquanto Jimenez-Krassel et al. [14] observaram que animais com baixa CFA demonstram melhor fertilidade e maior longevidade de vida produtiva.

Diferentes trabalhos relataram que a CFA varia entre indivíduos, mas apresenta alta repetibilidade no mesmo animal [1,5,12,15–17]. Contudo, em trabalhos que relacionam a CFA e o desempenho reprodutivo, em animais submetidos à IATF, não existe um consenso com relação ao momento do protocolo para realizar a CFA [10–12,18,19]. Levando em consideração que durante o protocolo de IATF existe, de forma relativamente sincronizada, a atresia e a emergência de uma onda folicular [20], outras investigações para avaliar se esses eventos dentro do protocolo interferem na CFA devem ser realizadas.

Além disso, outro ponto importante para compreender a relação entre a CFA e o desempenho reprodutivo em bovinos é realizar a avaliação da dinâmica ovariana [12]. Porém, a quantidade de trabalhos avaliando a dinâmica ovariana de acordo com a CFA é limitada e sem avaliação da hemodinâmica ovariana [12]. Com o uso da ultrassonografia em modo Doppler é possível compreender melhor as relações entre

a hemodinâmica ovariana e o desempenho reprodutivo na espécie bovina [21].

Nesse sentido, com o intuito de compreender melhor a relação entre a CFA e o desempenho reprodutivo de fêmeas bovinas de alta produção leiteira, foram realizados dois experimentos em vacas Holandesas (*Bos taurus taurus*). O primeiro teve como objetivo avaliar se ocorre variação da CFA durante os dias do protocolo de IATF e o segundo experimento teve como intuito avaliar a dinâmica folicular e a perfusão sanguínea ovariana de vacas com baixa e alta CFA.

2. Material e métodos

Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina - CEUA/UEL, sob protocolo 10877/2019/45. Os trabalhos foram realizados em uma única fazenda comercial localizada no município de Castro, Paraná, Brasil. Foram utilizadas vacas da raça Holandesa, com no mínimo duas lactações, período pós-parto variando de 40 a 60 dias, produção diária de leite entre 45 e 60 litros e mantidas em sistema *free stall*.

2.1 Experimento I – Repetibilidade da CFA em diferentes dias do protocolo de sincronização da ovulação em tempo-fixe

2.1.1. Protocolo de indução de ovulação em tempo-fixe

Vinte vacas ($n = 20$) foram submetidas a um protocolo de sincronização da ovulação como demonstrado na **Figura 1**, com início em um dia aleatório do ciclo estral, com a aplicação de 2mg de benzoato de estradiol (Syncrogen®, GlobalGen Vet Science, Jaboticabal, São Paulo, Brasil), 25µg de análogo sintético ao GnRH - licirelina (Tec-Relin®, Agener União Saúde Animal, Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil) e colocação de dispositivo intravaginal de primeiro uso, impregnado com 2g de progesterona (Repro sync®, GlobalGen Vet Science, Jaboticabal, São Paulo, Brasil). No sétimo dia após o início do protocolo (D7), foi aplicado 0,526mg de cloprostenol sódico (análogo sintético a prostaglandina - PGF2α, Induscio®, GlobalGen Vet Science, Jaboticabal, São Paulo, Brasil) e no oitavo dia (D8), foi retirado o dispositivo de progesterona, aplicado 0,526mg de cloprostenol e 1mg cipionato de estradiol (Cipion®, GlobalGen Vet Science, Jaboticabal, São Paulo, Brasil). Não foi realizada a

inseminação artificial nos animais do experimento, funcionando apenas de forma prática o protocolo utilizado como pré-sincronização.

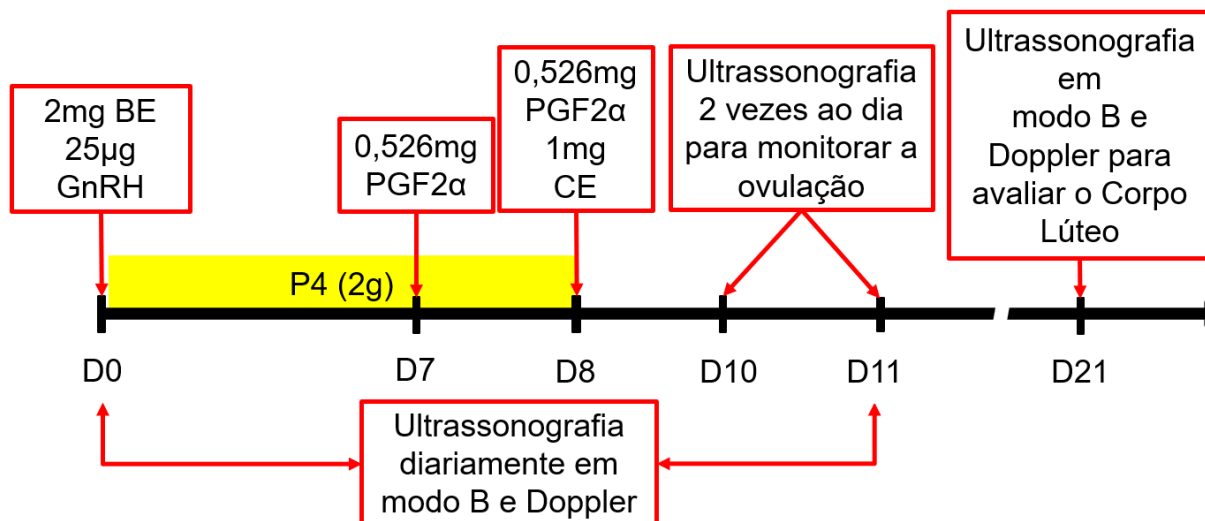


Figura 1. Protocolo farmacológicos utilizado para a sincronização da ovulação, destacando os momentos em que foram realizadas as avaliações ultrassonográficas. BE: benzoato de estradiol, GnRH: hormônio liberador de gonadotrofina, P4: progesterona, PGF2 α : prostaglandina e CE: cipionato de estradiol.

2.1.2. Avaliações ultrassonográficas e CFA

Para a CFA, desde o primeiro dia do protocolo (D0) até um dia após a ovulação (D11), foi realizado diariamente o exame com aparelho de ultrassom (SonoScape™, Modelo S8, Domed, Valinhos, Brasil), utilizando transdutor linear transretal de 5 a 10 MHz. Os exames foram todos realizados em modo B. No décimo primeiro dia após a ovulação (D21), novamente foi realizado o mesmo padrão e exame ultrassonográfico, para identificar se a presença do corpo lúteo (CL) iria alterar a CFA.

Para padronizar as avaliações ultrassonográficas, a face de cada ovário foi escaneada a partir da extremidade para o pedículo e, conforme os folículos antrais apareciam no monitor, eram contados. Foram considerados apenas folículos com diâmetro de 2mm ou mais. A CFA de cada animal foi considerada através da soma dos folículos identificados nos ovários direito e esquerdo. Todas as avaliações ultrassonográficas e contagens de folículos antrais foram realizadas pelo mesmo avaliador com experiência prévia. Os momentos das avaliações ultrassonográficas também estão detalhados na **Figura 1**.

2.2. Experimento II - Dinâmica ovariana de vacas da raça Holandesa com diferentes contagens de folículos antrais

2.2.1. Animais, CFA e delineamento experimental

Oitenta vacas tiveram a CFA aferida e destas foram selecionadas apenas animais com no máximo 15 folículos antrais, para o grupo de baixa, ou com no mínimo 25 folículos, para o grupo de alta CFA. As fêmeas que não estavam dentro dos limites de CFA dos grupos de baixa ou alta, foram retiradas do experimento. No mesmo dia que foi realizado a CFA, foi iniciado (D0) o protocolo de indução de ovulação em tempo-fixado, descrito no item 2.1.1. Animais que não responderam ao protocolo, que desenvolveram afecções císticas ovarianas ou que ovularam mais de um folículo também foram excluídos do experimento. Desta forma dezoito animais (n=18), sendo nove (n=9) do grupo de baixa e nove (n=9) no grupo de alta CFA, foram utilizados no experimento II.

Nos animais dos grupos de alta e baixa CFA foi acompanhado a dinâmica ovariana por ultrassonografia, nos modos B e Doppler, para comparar entre os dois grupos o diâmetro do folículo dominante, a área de vascularização em torno do folículo pré-ovulatório, a área do CL e a área de vascularização do CL. Semelhante ao realizado no experimento I, não foi realizada a inseminação artificial nos animais do experimento, funcionando na prática o protocolo utilizado como pré-sincronização.

2.2.2. Avaliações ultrassonográficas

Foi utilizado um aparelho de ultrassom (SonoScape™, Modelo S8, Domed, Valinhos, Brasil) com transdutor linear transretal de 5 a 10 MHz. Todas as avaliações realizadas no experimento, tanto em modo B quanto em Doppler, foram realizadas empregando a mesma configuração do aparelho de ultrassom. Para as avaliações em modo Doppler dos folículos e CLs, o transdutor era deixado parado por alguns segundos sobre o ponto de maior diâmetro da estrutura avaliada, permitindo que a perfusão sanguínea fosse visualizada.

No D0 do protocolo de indução de ovulação, iniciaram-se as avaliações da dinâmica ovariana nos animais selecionados para os grupos de alta e baixa CFA. Cada ovário foi escaneado, da extremidade até o pedículo, primeiramente em modo

B e imediatamente após em modo Doppler. As imagens geradas eram salvas no aparelho para posterior avaliação. Do D0 até o nono dia do protocolo (D9), as avaliações foram realizadas diariamente no mesmo horário. No décimo (D10) e no décimo primeiro dia (D11) as avaliações foram realizadas com intervalo de 12 horas, com intuito de identificar o momento mais aproximado da ovulação. Onze dias após a ovulação (D21), para avaliar o CL formado, foi realizado novamente o exame ultrassonográfico ovariano, seguindo os mesmos padrões das avaliações anteriores.

2.2.3. Avaliações das imagens da dinâmica do folículo ovulatório

Nas imagens salvas em modo B no aparelho, foi realizado a medição diária do diâmetro do folículo dominante do quarto dia do protocolo (D4) até o momento que ocorreu a ovulação, que foi determinada pela ausência do folículo pré-ovulatório nas imagens ultrassonográficas. O folículo dominante foi medido usando a função distância do próprio aparelho. O diâmetro foi medido nos dois maiores eixos, sendo considerado como diâmetro do folículo o valor médio entre as avaliações dos dois eixos.

2.2.4. Avaliação da vascularização do folículo pré-ovulatório

Em modo Doppler, na imagem em que o folículo apresentou o maior diâmetro, foi medida a área de vascularização em torno de cada folículo pré-ovulatório. Essa avaliação foi realizada na imagem do último exame ultrassonográfico em que o folículo foi identificado antes da ovulação. A medida da área de vascularização do folículo pré-ovulatório foi realizada usando a função tracejar do aparelho de ultrassom. Cada ponto colorido em torno do folículo foi contornado manualmente e o aparelho determinou a área em mm^2 , a área de vascularização de cada folículo correspondeu à soma da área de cada ponto de vascularização em torno do folículo. A medição da área de vascularização foi realizada como o demonstrado na **Figura 2**.

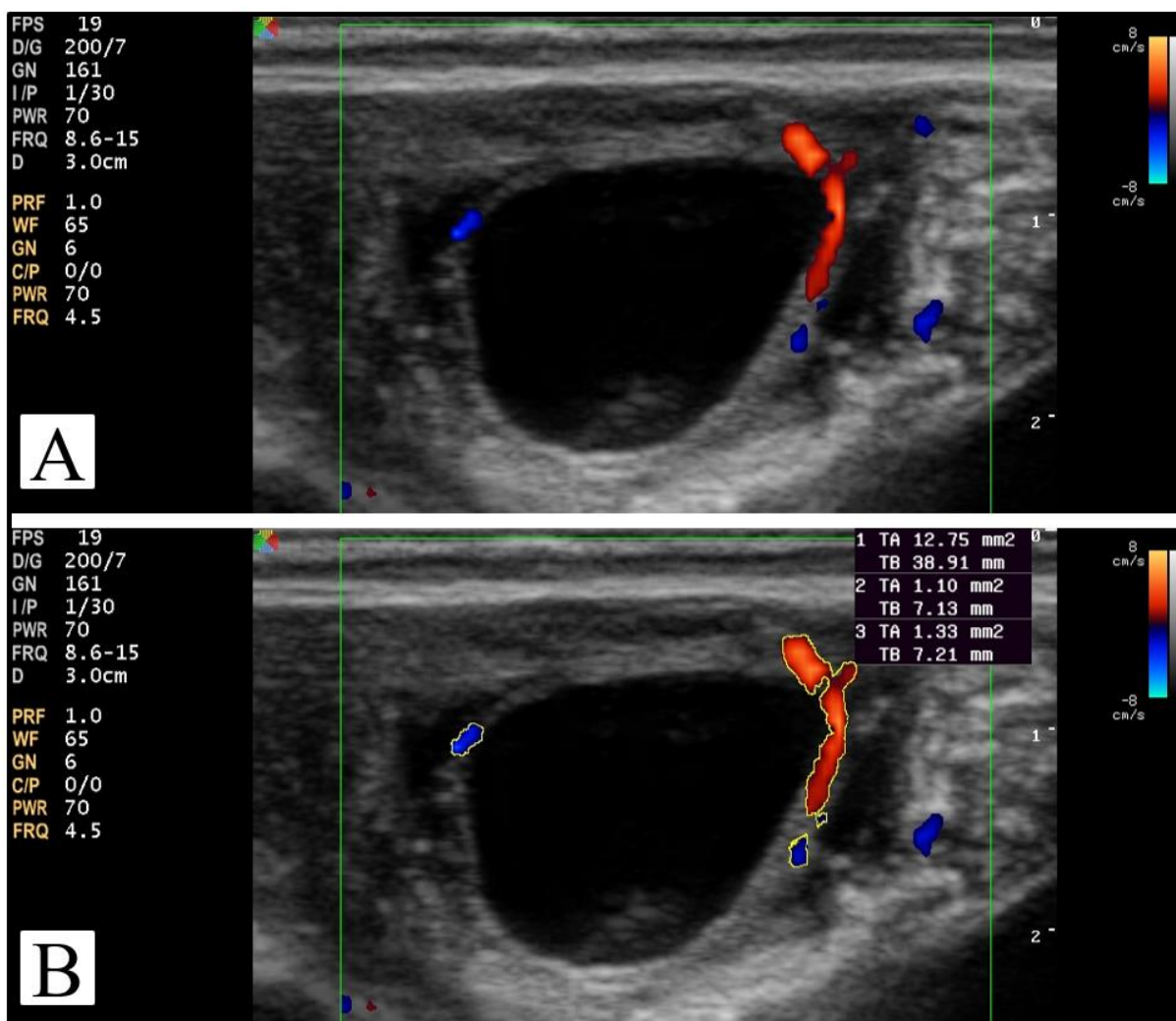


Figura 2. Imagem em modo Doppler colorido do folículo pré-ovulatório de uma das vacas do experimento. Em A, a imagem original do exame e, em B, destacando o contorno realizado manualmente para medir os pontos de vascularização, com a área de ponto demonstrada no canto superior direito da imagem B.

2.2.5. Avaliação da área e da perfusão sanguínea do corpo lúteo

Nas imagens, obtidas em modo B, os CLs tiveram a área central medida quando apresentaram o maior diâmetro. Essa medição foi realizada utilizando a função elipse do aparelho ultrassonográfico, como demonstrado na **Figura 3**. Quando o CL era cavitário, a área da cavidade também era medida e descontada, sendo considerada apenas a área líquida do CL.

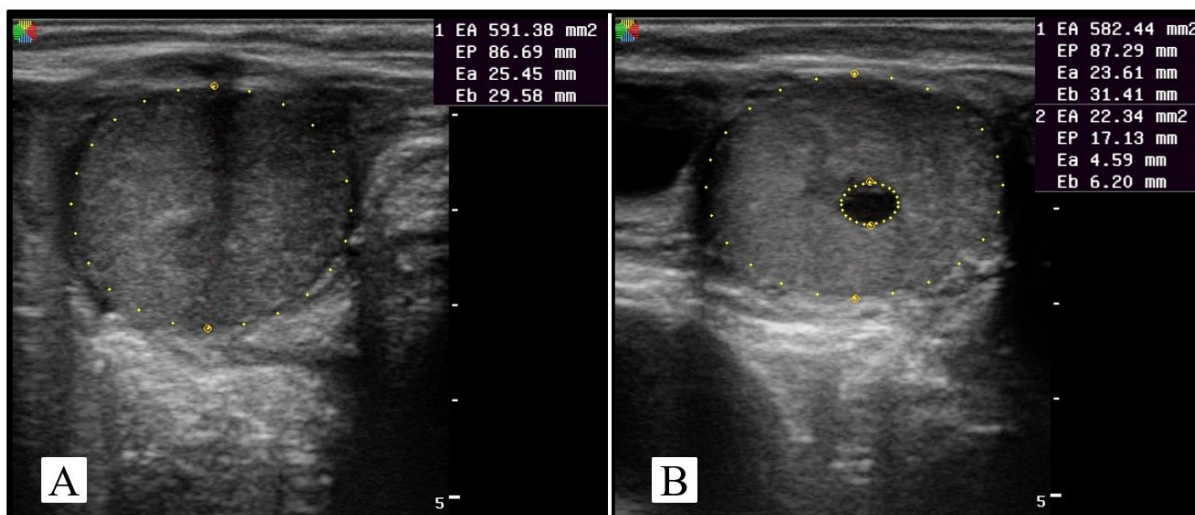


Figura 3. Imagem da medição da área de dois corpos lúteos. Em A demonstrando um corpo lúteo compacto (sem cavidade) e em B um corpo lúteo cavitário, em que foi medida também a área da cavidade, descontando-a para determinar a área líquida do corpo lúteo.

Dos exames realizados em modo Doppler colorido, na imagem em que o CL apresentou o maior diâmetro, foi medida a área de perfusão sanguínea usando a função tracejar do aparelho de ultrassom, como realizado no trabalho de Vrisman et al. [22]. Cada ponto colorido dentro ou ao redor do CL foi contornado manualmente e o aparelho determinou a área em mm^2 . A área de vascularização de cada CL correspondeu à soma da área de cada ponto de vascularização observado na imagem. A medição da área de vascularização do CL foi realizada como demonstrado no **Figura 4**. Obtendo os valores da área do CL e da área de perfusão sanguínea, foi realizado o cálculo da porcentagem de vascularização de cada CL.

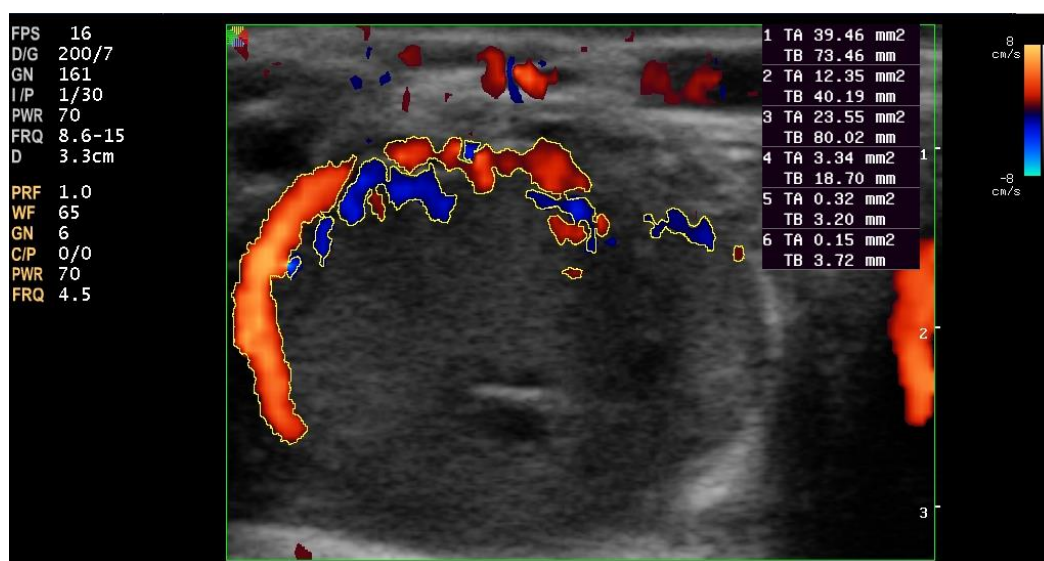


Figura 4. Imagem em modo Doppler colorido do corpo lúteo de uma das vacas do experimento, demonstrando o contorno realizado manualmente para medir a área vascularizada.

2.3. Análise Estatística

A comparação do número de folículos antrais ao longo das avaliações ultrassonográficas foi analisada por medidas repetidas, empregando o modelo linear generalizado (GLM), incluindo o dia da avaliação como efeito fixo e os animais como efeito aleatório. Na presença de um efeito significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

A fim de determinar a constância da CFA, realizou-se o cálculo de repetibilidade (variação de 0 – 1, sendo que 1 = perfeito), definida como a proporção da variância total que poderia ser atribuída à variação animal, sendo calculado da seguinte forma: $\delta^2 \text{ animal} / (\delta^2 \text{ animal} + \delta^2 \text{ do erro})$ de acordo com Boni et al. [23].

Os dados obtidos com a avaliação da dinâmica ovariana, dos animais de baixa e alta CFA, foram previamente analisados quanto à normalidade de distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk e quanto à homogeneidade de variâncias pelo Teste F. Variáveis paramétricas foram analisadas pelo teste T para amostras independentes e variáveis não paramétricas foram analisadas pelos de Mann-Whitney.

O diâmetro do folículo dominante ao longo das avaliações ultrassonográficas foi analisado por medidas repetidas, empregando o modelo linear generalizado (GLM), incluindo o dia da avaliação como efeito fixo e os animais como efeito aleatório. Na presença de um efeito significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Para a comparação do diâmetro folicular entre os grupos, os dados foram previamente analisados quanto à normalidade de distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk e quanto à homogeneidade de variâncias pelo Teste F. Variáveis paramétricas foram analisadas por ANOVA.

Para análise descritiva, os dados estão apresentados como média e erro padrão (SE). Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico Minitab®, versão 18.1. Adotou-se um valor de $p \leq 0,1$ como significativo.

3. Resultados

Com relação ao experimento que acompanhou a CFA durante os dias do protocolo de indução e no décimo primeiro dia após a ovulação, a repetibilidade da CFA encontrada foi de 0.98. A média da quantidade de folículos antrais na população de animais avaliada foi de 18,6 folículos em um total de 260 exames de pares

ovarianos. A frequência de distribuição da quantidade de folículos antrais dos animais avaliados está demonstrada na **Figura 5**, em que é possível identificar que a moda da CFA na população estudada foi de 16 folículos. A CFA individual de cada vaca avaliada ao longo dos diferentes dias do protocolo e no décimo primeiro dia após a ovulação está demonstrada na **Figura 6**.

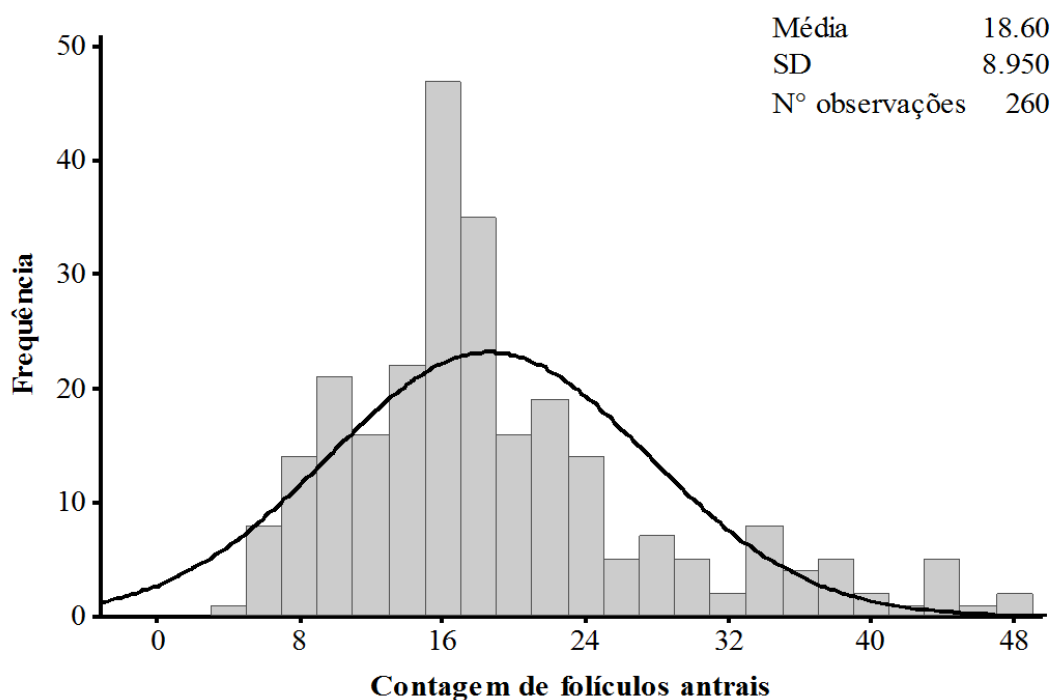


Figura 5. Frequência de distribuição da contagem de folículos antrais (CFA) dos animais avaliados no experimento sobre a repetibilidade da CFA em diferentes dias do protocolo de sincronização da ovulação.

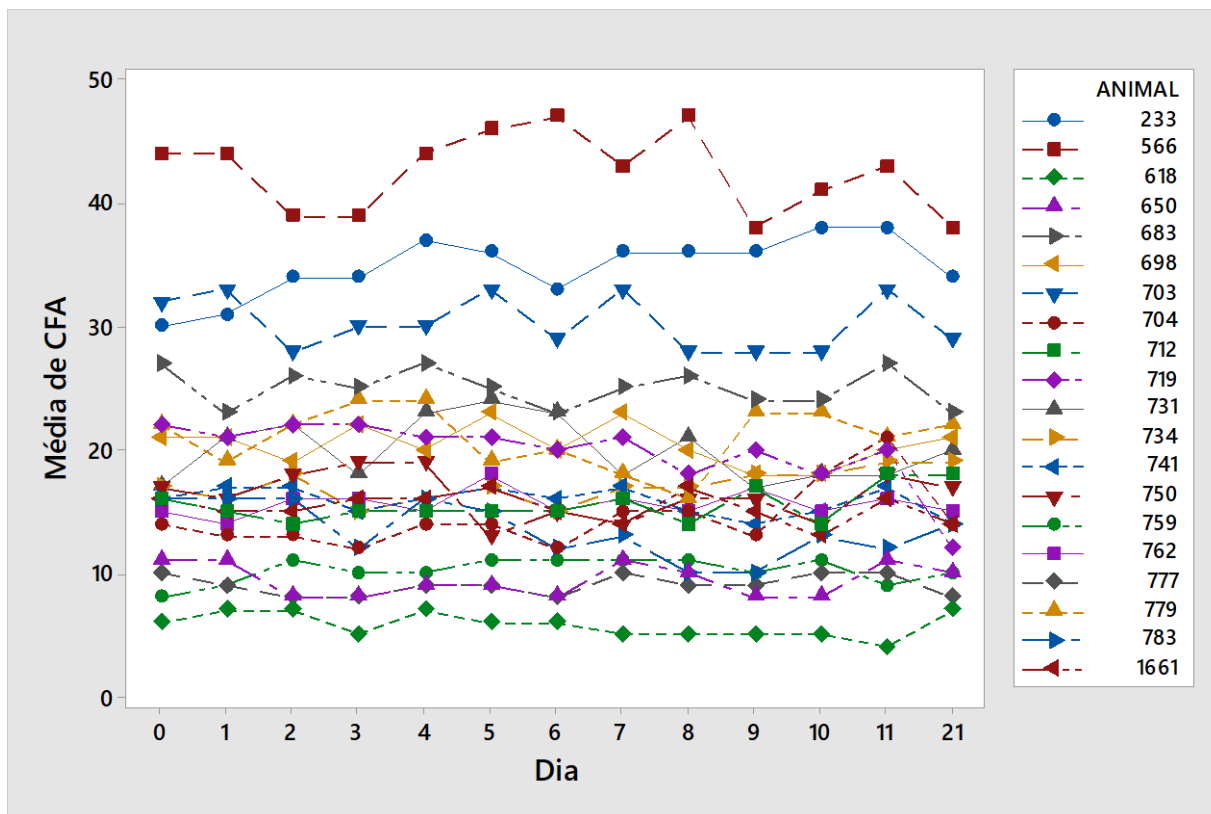


Figura 6. Contagem de folículos antrais (CFA) de cada vaca ao longo dos dias de avaliação.

Comparando a média de CFA ao longo dos dias, o número de folículos antrais variou em função do animal ($P < 0.0001$), mas não ao longo das avaliações ($P > 0.1$). Desta forma, a média da CFA na população de animais estudada se manteve igual, independente do dia de avaliação, como apresentado na **Figura 7**.

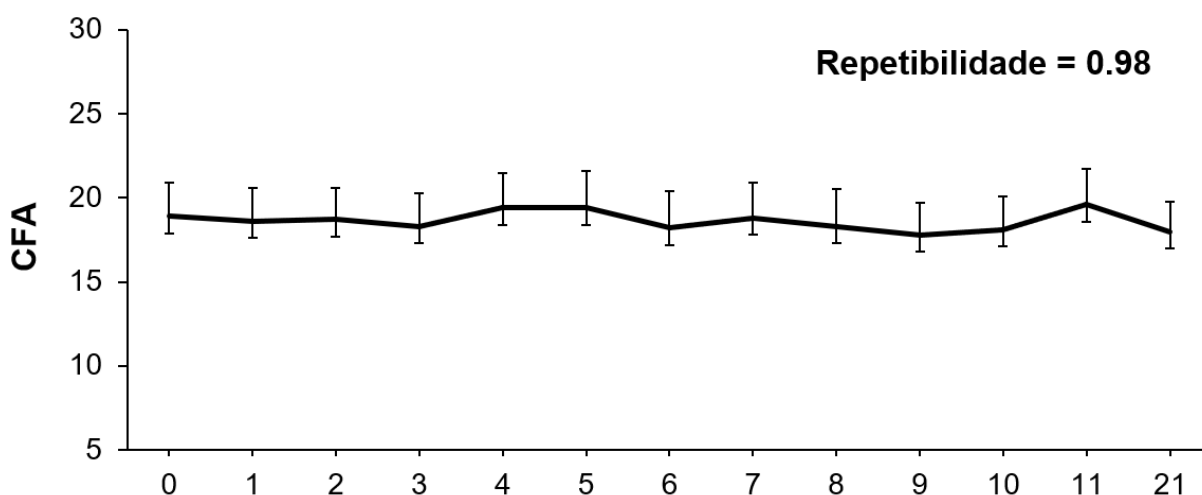


Figura 7. Média da contagem dos folículos antrais (CFA) nos diferentes dias do protocolo de sincronização da ovulação e no décimo dia após a ovulação.

Os resultados da comparação entre os animais de baixa e alta CFA, que tiveram a dinâmica ovariana avaliada por ultrassonografia nos modos B e Doppler,

estão apresentados na **Tabela 1**. A média na quantidade de folículos dos animais de baixa CFA foi de 11,22 e nos animais de alta de 30,22 ($P = 0.0001$). Os animais do grupo de baixa, em comparação com os animais de alta CFA, apresentaram maiores médias do diâmetro do folículo pré-ovulatório (16,09 x 15,00 mm; $P = 0.059$), da vascularização ao redor do folículo pré-ovulatório (17,36 x 8,16 mm²; $P = 0.005$), da área do CL (579,10 x 405,80 mm²; $P = 0.0001$) e da área de vascularização do CL (97,16 x 68,30 mm²; $P = 0.021$). A porcentagem de área vascularizado do CL foi semelhante em ambos os grupos avaliados (16,86% nos animais de baixa e 16,98% nos animais de alta CFA; $P = 0.956$).

A média e o respectivo erro padrão do tamanho do folículo dominante, conforme a dinâmica ovariana se aproximava da ovulação, está demonstrado na **Figura 8**, em que é possível identificar desde do D4 do protocolo até o D9 não houve diferença no tamanho do folículo dominante ($P > 0.1$), ocorrendo apenas a diferença no momento pré-ovulatório ($P = 0,059$). As vacas de ambos os grupos ovularam entre 54 e 66 horas após a remoção do dispositivo de progesterona.

Tabela 1 – Comparação dos parâmetros ovarianos das vacas de baixa e alta CFA

Variáveis	Baixa CFA		Alta CFA		Valor de P
	Média	SE	Média	SE	
CFA	11,22	0,99	30,22	1,78	0.0001
Diâmetro do FO (mm)	16,09	0,35	15,00	0,40	0.059
Vascularização do FO (mm²)	17,36	2,33	8,16	3,20	0.005
Área do CL (mm²)	579,10	16,90	405,80	21,20	0.0001
Vascularização do CL (mm²)	97,16	9,47	68,3	5,24	0.021
% de vascularização do CL	16,86	1,62	16,98	1,28	0.956

Legenda: SE - Erro padrão, CFA - Contagem de Folículos Antrais, FO - Folículo pré-ovulatório e CL - Corpo Lúteo.

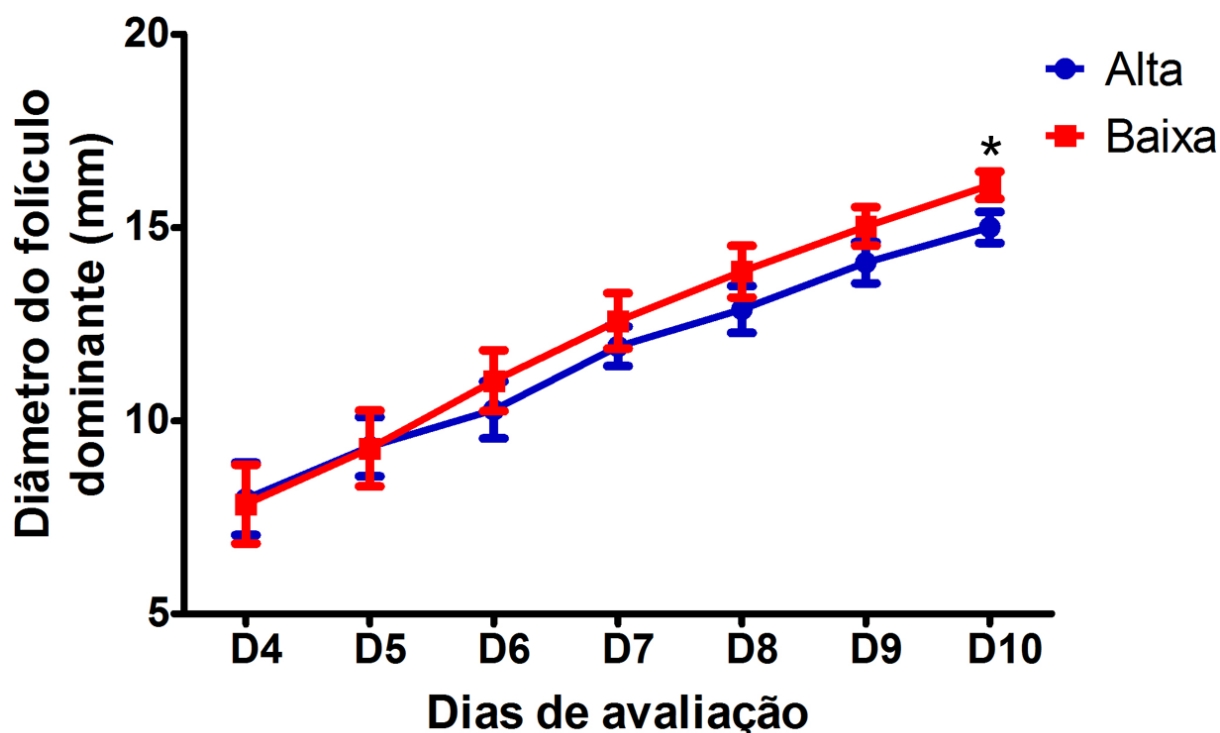


Figura 8. Diâmetro médio e erro padrão do diâmetro do folículo dominante nos dias que antecederam a ovulação (* - $P = 0.059$).

4. Discussão

Nos animais que tiveram a dinâmica ovariana avaliada por ultrassonografia, nos modos B e Doppler, comparando vacas de baixa e alta CFA, os animais de baixa CFA demonstraram maior diâmetro do folículo pré-ovulatório e CLs maiores e com maior área de vascularização. Com relação ao experimento que acompanhou a CFA durante os dias do protocolo de indução e no décimo primeiro dia após a ovulação, foi identificado uma alta repetibilidade. A população dos animais que tiveram a CFA contada diariamente, foi bem heterogênea, pois incluiu animais com quantidade de folículos menor que 10 e maior que 40, compreendendo então animais de baixa, média e alta CFA de acordo com Jimenez-Krassel et al. [14], que classificaram vacas da raça Holandesa como baixa CFA com até 15, média com 16 até 24 e alta acima de 25 folículos.

A média de CFA do total de avaliações realizadas no experimento I foi de 18,6 folículos sendo constante durante todos os dias de avaliação. O valor de repetibilidade encontrado foi de 0.98, superior aos valores demonstrado por Burns et al. [1] e Morotti et al. [12], que obtiveram respectivamente 0.95 e 0.93, ao avaliar diferentes ciclos

estrais e em dias aleatório em cada ciclo, ou seja, sem fazer protocolo de sincronização nas vacas. Os dados do presente estudo complementam os encontrados por Burns et al. [1], que relataram alta repetibilidade da CFA individual em diferentes ciclos estrais e os achados deste trabalho demonstram que a CFA individual possui alta repetibilidade em diferentes dias do protocolo em animais sincronizados.

Adams et al. [24] e Cummins et al. [25] descrevem que durante o protocolo de indução de ovulação em tempo-fixado ocorre a atresia de uma onda folicular e a emergência de uma nova onda, o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório, a ovulação e, após alguns dias, a presença de um CL desenvolvido. Mesmo ocorrendo tantos eventos ovarianos durante o protocolo de sincronização da ovulação, o presente trabalho demonstra que a CFA permanece inalterada.

Uma dúvida que havia com relação à CFA nos dias do protocolo, era saber se no momento da emergência da nova onda folicular, iria alterar a quantidade de folículos contados [18,19]. Contudo, como descrito por Adams et al. [24], a onda que está emergindo se cruza com a onda que está em atresia e, mesmo tendo alguns folículos da nova onda com tamanho inferior a 2 mm, ainda é possível identificar folículos que estão em processo de atresia, indicando provavelmente o motivo pelo qual a CFA se mantenha constante nesse momento.

No segundo experimento, as vacas com baixa CFA apresentaram maiores diâmetros de folículos pré-ovulatórios, que de acordo com Pfeifer et al. [26], folículos com maiores diâmetros antes da ovulação estão relacionados com melhor desempenho reprodutivo em fêmeas bovinas. Esses resultados estão de acordo aos encontrados por Morotti et al. [12], que ao avaliarem fêmeas zebuínas, também identificaram nas vacas de baixa CFA maiores folículos pré-ovulatórios. Contudo, as vacas avaliadas por Morotti et al. [12] apresentaram o folículo dominante com maior diâmetro desde o sétimo dia que antecedeu a ovulação. No presente estudo essa diferença no diâmetro do folículo ocorreu apenas no último dia que antecedeu a ovulação, demonstrando que a dinâmica do folículo dominante de acordo com a CFA é um pouco diferente em fêmeas taurinas e zebuínas.

A área de vascularização ao redor do folículo pré-ovulatório também foi maior nas vacas de baixa CFA e, de acordo com Satheskumar [27], um folículo com maior aporte sanguíneo tem maior possibilidade de responder ao LH e ovular. A presença de maior vascularização não interferiu no momento da ovulação das vacas do

presente estudo, pois todas ovularam na mesma janela de 12h entre as avaliações ultrassonográficas. Porém, Satheshkumar [27] cita que, além de melhorar a taxa de ovulação, um fluxo sanguíneo maior possibilita melhor fornecimento de hormônios, nutrientes e oxigênio durante o desenvolvimento do folículo e isso pode estar associado com uma melhor qualidade do oócito ovulado.

Com relação ao CL, proporcionalmente os CLs das vacas de alta e baixa CFA tem a mesma porcentagem de área de vascularização. Contudo, como as vacas de baixa CFA apresentaram CLs maiores, a área de vascularização foi proporcionalmente maior. De acordo com Gómez-Seco et al. [28] e Vrisman et al. [22], maiores CL e com maiores áreas de vascularização estão associados a maiores concentrações séricas de progesterona.

De acordo com Ledoux et al. [29] e Adriaens et al. [30], maiores concentrações séricas de progesterona estão associadas a menores taxas de perdas gestacionais precoces e melhor desempenho reprodutivo geral. No entanto, o presente trabalho não avaliou a taxa de prenhez e desenvolvimento gestacional, algo necessário para melhor compreensão da relação entre o tamanho do CL com o desempenho reprodutivo. Contudo, os trabalhos realizados por Moraes et al. [11] e Morotti et al. [12] avaliaram a relação entre a CFA e a taxa de prenhez, identificando que vacas de baixa CFA apresentam uma taxa de prenhez de 10 a 12 pontos percentuais maiores que vacas de alta CFA, porém os trabalhos de Moraes et al. [11] e Morotti et al. [12] foram realizados com fêmeas zebuínas.

Os resultados obtidos no presente estudo, em que as vacas de baixa CFA demonstraram melhores parâmetros de tamanho e hemodinâmica de folículos pré-ovulatórios e CLs, auxiliam na explicação dos resultados obtidos por Jimenez-Krassel et al. [14], que identificaram que as vacas da raça Holandesa de baixa CFA possuem maior longevidade produtiva e possuem melhor desempenho reprodutivo. Tendo em vista que, Jimenez-Krassel et al. [14] identificaram que vacas com até 15 folículos antrais levam menos tempo para emprenhar após o parto, possivelmente por apresentarem, como encontrado no presente trabalho, parâmetros de dinâmica e hemodinâmica mais favoráveis a fertilidade.

Conclusão

Vacas da raça Holandesa, submetidas à sincronização de ovulação em tempo-

fixo, tem alta repetibilidade da CFA nos diferentes dias do protocolo, inclusive após a ovulação e um CL desenvolvido no ovário. Vacas de baixa CFA possuem maior diâmetro do folículo pré-ovulatório, maior área de vascularização do folículo pré-ovulatório, maior área de CL e maior área de perfusão sanguínea do CL, quando comparadas com vacas de alta CFA.

Referências

- [1] Burns DS, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Knight PG, Ireland JJ. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: Evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol Reprod* 2005;73:54–62. doi:10.1095/biolreprod.104.036277.
- [2] Mossa F, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JLH, Smith GW, Lonergan P, et al. Evidence that high variation in antral follicle count during follicular waves is linked to alterations in ovarian androgen production in cattle. *Reproduction* 2010;140:713–20. doi:10.1530/REP-10-0214.
- [3] Ireland JJ, Smith GW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JLH, et al. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Mullerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in 2011:1–14.
- [4] Evans ACO, Mossa F, Walsh SW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, et al. Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. *Reprod Domest Anim* 2012;47:31–7. doi:10.1111/j.1439-0531.2012.02052.x.
- [5] Silva-Santos KC, Santos GMG, Koetz Júnior C, Morotti F, Siloto LS, Marcantonio TN, et al. Antral follicle populations and embryo production – in vitro and in vivo – of *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages. *Reprod Domest Anim* 2014;49:228–32. doi:10.1111/rda.12255.
- [6] Silva-Santos KC, Santos GMG dos, Siloto LS, Santos JT dos, Oliveira ER de, Machado FZ, et al. The correlation between the number of antral follicles and ovarian reserves (preantral follicles) in purebred *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *Anim Reprod Sci* 2014;151:119–25. doi:10.1016/j.anireprosci.2014.10.016.
- [7] Morotti F, Zangirolamo AF, Silva NC, Bizarro-Silva C, Rosa CO, Seneda MM. Antral follicle count in cattle: advantages , challenges , and controversy. *Anim Reprod* 2017;14:514–20. doi:10.21451/1984-3143-AR994.
- [8] Morotti F, Santos GMG, Júnior CK, Silva-Santos KC, Roso VM, Seneda MM. Correlation between phenotype, genotype and antral follicle population in beef heifers. *Theriogenology* 2017;91:21–6. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.12.025.

- [9] Rosa CO, Marinho LSR, da Rosa PRA, De Cesaro MP, Lunardelli PA, Silva-Santos KC, et al. Molecular characteristics of granulosa and cumulus cells and oocyte competence in Nelore cows with low and high numbers of antral follicles. *Reprod Domest Anim* 2018;53:921–9. doi:10.1111/rda.13189.
- [10] Santos GMG dos, Silva-Santos KC, Barreiros TRR, Morotti F, Sanches BV, de Moraes FLZ, et al. High numbers of antral follicles are positively associated with in vitro embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. *Anim Reprod Sci* 2016;165:17–21. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.11.024.
- [11] Moraes FLZ, Morotti F, Costa CB, Lunardelli PA, Seneda MM. Relationships between antral follicle count, body condition, and pregnancy rates after timed-AI in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 2019;136:10–4. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.06.024.
- [12] Morotti F, Moretti R, dos Santos GMG, Silva-Santos KC, Ramos Cerqueira PH, Seneda MM. Ovarian follicular dynamics and conception rate in *Bos indicus* cows with different antral follicle counts subjected to timed artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 2018;188:170–7. doi:10.1016/j.anireprosci.2017.12.001.
- [13] Mossa F, Walsh SW, Butler ST, Berry DP, Carter F, Lonergan P, et al. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *J Dairy Sci* 2012;95:2355–61. doi:10.3168/jds.2011-4325.
- [14] Jimenez-Krassel F, Scheetz DM, Neuder LM, Pursley JR, Ireland JJ. A single ultrasound determination of ≥ 25 follicles ≥ 3 mm in diameter in dairy heifers is predictive of a reduced productive herd life. *J Dairy Sci* 2017;100:5019–27. doi:10.3168/jds.2016-12277.
- [15] Ireland JJ, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Smith GW, Lonergan P, et al. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum Reprod* 2007;22:1687–95.
- [16] Ireland JLH, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Themmen APN, Ward F, Lonergan P, et al. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol Reprod* 2008;79:1219–25. doi:10.1095/biolreprod.108.071670.
- [17] Gobikrushanth M, Dutra PA, Bruinjé TC, Colazo MG, Butler ST, Ambrose DJ. Repeatability of antral follicle counts and anti-Müllerian hormone and their associations determined at an unknown stage of follicular growth and an expected day of follicular wave emergence in dairy cows. *Theriogenology* 2017;92:90–4. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.01.018.
- [18] Rodrigues AS, de Oliveira SN, Loiola MVG, Andrade BH de A, Ferraz PA, Ayres MCC, et al. Fertilidade de fêmeas nelore após inseminação artificial em tempo fixo conforme a contagem de folículos antrais. *Pesqui Agropecu Bras* 2013;48:801–4. doi:10.1590/S0100-204X2013000700014.
- [19] Rodrigues AS, Oliveira SN, Loiola MVG, Loiola MVG, Chalhoub M, Bittencourt RF, et al. Antral follicle count in Nelore females subjected to fixed-time artificial insemination. *Ciência Rural* 2015;4:711–7. doi:10.1590/0103-8478cr20140666.

- [20] Morotti F, Campos JT, Oliveira ER, Seneda MM. Ovarian follicular dynamics of Nelore (*Bos indicus*) cows subjected to a fixed-time artificial insemination protocol with injectable progesterone. *Semin Agrar* 2013;34:3859–66. doi:10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl2p3859.
- [21] Pugliesi G, Rezende RG, Silva JCB Da, Lopes E, Nishimura TK, Baruselli PS, et al. Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. *Rev Bras Reprodução Anim* 2017;41:140–50.
- [22] Vrisman DP, Bastos NM, Rossi GF, Rodrigues NN, Borges LPB, Taira AR, et al. Corpus luteum dynamics after ovulation induction with or without previous exposure to progesterone in prepubertal Nelore heifers. *Theriogenology* 2018;106:60–8. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.10.018.
- [23] Boni R, Roelofsen M, Pieterse M, J K, Kruij T a M. Recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology* 1997;48:277–89.
- [24] Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Malhi P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 2008;69:72–80. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.09.026.
- [25] Cummins SB, Lonergan P, Evans ACO, Butler ST. Genetic merit for fertility traits in Holstein cows: II. Ovarian follicular and corpus luteum dynamics, reproductive hormones, and estrus behavior. *J Dairy Sci* 2012;95:3698–710. doi:10.3168/jds.2011-4976.
- [26] Pfeifer LFM, Castro NA, Neves PMA, Cestaro JP, Siqueira LGB. Development and validation of an objective method for the assessment of body condition scores and selection of beef cows for timed artificial insemination. *Livest Sci* 2017;197:82–7. doi:10.1016/j.livsci.2017.01.011.
- [27] Satheshkumar S. Peri-follicular blood flow in the follicle from which ovulation occurs in cows. *Anim Reprod Sci* 2018;198:154–9. doi:10.1016/j.anireprosci.2018.09.014.
- [28] Gómez-Seco C, Alegre B, Martínez-Pastor F, Prieto JG, González-Montaña JR, Alonso ME, et al. Evolution of the corpus luteum volume determined ultrasonographically and its relation to the plasma progesterone concentration after artificial insemination in pregnant and non-pregnant dairy cows. *Vet Res Commun* 2017;41:183–8. doi:10.1007/s11259-017-9685-x.
- [29] Ledoux D, Ponsart C, Grimard B, Gatién J, Deloche MC, Fritz S, et al. Sire effect on early and late embryonic death in French Holstein cattle. *Animal* 2015;9:766–74. doi:10.1017/S1751731114003140.
- [30] Adriaens I, Saeys W, Huybrechts T, Lamberigts C, François L, Geerinckx K, et al. A novel system for on-farm fertility monitoring based on milk progesterone. *J Dairy Sci* 2018;101:8369–82.

8 CONCLUSÕES

- Primíparas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) demonstram menor taxa de expressão de estro quando submetidas a sincronização de ovulação para a inseminação artificial em tempo-fixos;
- Em programas de IATF com uma ressincronização, o uso do GnRH nas fêmeas da raça Nelore que não expressam cio no momento da inseminação artificial, possibilita que primíparas e múltiparas tenham a mesma taxa de concepção que nulíparas.
- A contagem de folículos antrais (CFA) de vacas da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*) tem alta repetibilidade durante os dias do protocolo de indução de ovulação em tempo-fixos, inclusive no décimo primeiro dia após a ovulação, em que um dos ovários apresenta um corpo lúteo desenvolvido.
- Vacas de baixa CFA demonstram maior diâmetro do folículo pré-ovulatório, maior área de vascularização do folículo pré-ovulatório, maior área de corpo lúteo e maior área de perfusão sanguínea do corpo lúteo, quando comparadas com vacas de alta CFA.