MANOEL FRANCISCO DE SÁ FILHO

Importância da ocorrência de estro e do diâmetro folicular no momento da inseminação em protocolos de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em fêmeas zebuínas de corte

São Paulo
2012

MANOEL FRANCISCO DE SÁ FILHO

Importância da ocorrência de estro e do diâmetro folicular no momento da inseminação em protocolos de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em fêmeas zebuínas de corte

VERSÃO CORRIGIDA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

De acordo:_____

Orientador

São Paulo
2012

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2653
FMVZ

Sá Filho, Manoel Francisco de
Importância da ocorrência de estro e do diâmetro folicular no momento da inseminação em protocolos de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em fêmeas zebuínas de corte / Manoel Francisco de Sá Filho. -- 2012.
124 f., il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. Reprodução. Bovino. Vacas lactantes. Ovário. Concepção. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Fatores associados à ocorrência de estro e taxa de prenhez após protocolos de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em fêmeas Bos indicus", protocolado sob o nº 2426/2011, utilizando 2200 (dois mil e duzentos) bovinos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 23/11/2011.

We certify that the Research "Factors associated with the occurrence of estrus and pregnancy per artificial insemination after estrus synchronization protocols for timed artificial insemination in Bos indicus females", protocol number 2426/2011, utilizing 2200 (two thousand and two hundred) cattle, under the responsibility Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/23/2011.

São Paulo, 24 de novembro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

Fone: + 55 11 3091-7671/767
Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-775

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SÁ FILHO, Manoel Francisco de

Título: Importância da ocorrência de estro e do diâmetro folicular no momento da inseminação em protocolos de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em fêmeas zebuínas de corte

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICO

À Deus e todos os espíritos de luz por todo o suporte para meu desenvolvimento mental e espiritual mais essa etapa de minha vida.

À minha esposa Larissa por todo o incentivo e dedicação. Espírito iluminado sempre presente para me alegrar, motivar, dando o verdadeiro sentido para os diferentes caminhos da vida.

Aos meus pais Ana Maria e Manoel Francisco de Sá, por me proporcionarem a base para meu desenvolvimento.

Aos meus avós Anésia e Manoel (*in memorian*) e minha Tia Verá Lúcia, pelo enorme incentivo aos ensinamentos e aos estudos.

OFEREÇO

Ao meu filho Pedro, por ter aceitado nosso lar como morada de sua vida. Também, por ter me ensinado o verdadeiro sentido do amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me proporcionar a vida e pelo amparo que me conduz a evolução mental e espiritual.

Ao professor Pietro Sampaio Baruselli, por todos os ensinamentos e modelos de conduta ética e profissional. Também agradeço pela confiança depositada em meu trabalho e principalmente por não ter desistido de mim. Agradeço pelo convívio desses anos e pelos exemplos de perseverança, dedicação, honestidade e simplicidade. Muito obrigado por ser meu líder.

À toda a minha família que sempre foi a base para tudo e, principalmente, pela formação de meu caráter. Gostaria de agradecer em especial minha esposa Larissa e meu filho Pedro. Vocês são o verdadeiro sentido para minha vida. Agradeço pelos sorrisos e carinhos que, com certeza, são a verdadeira origem de toda a motivação e incentivo para minha carreira profissional.

A todos os professores do Departamento de Reprodução Animal que sempre me respeitaram e disponibilizaram de seu tempo para me ouvir, aconselhar, ensinar e orientar. À Profa. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção, obrigado pelo apoio durante todo meu período no VRA. Ao Prof Rubens Paes Arruda, obrigado pelas discussões sobre sêmen sexado. Em especial gostaria de agradecer aos professores, Mario Binelli e Prof Ed Hoffman Madureira. O Prof Mario foi o responsável por plantar a semente que determinou meu retorno à faculdade após o período do mestrado, muito obrigado Marião. Obrigado Prof Ed, pelas proveitosas e agradáveis conversas sobre a reprodução animal e principalmente sobre a vida.

Aos amigos do VRA gostaria de agradecer por todo o auxílio, convivência e principalmente pela paciência. "Eu sei que não sou fácil", mesmo assim muito obrigado por terem me suportado. Em especial, gostaria de agradecer aos alunos do Prof Pietro: Márcio Mendanha (grande amigo e conselheiro), Laís Vieira (muito dedicada - "essa menina tem um futuro brilhante"), Rodrigo Sala (nunca vi ninguém tão motivado), Bruno Monteiro (mudanças dão sempre um novo sentido para nossas vidas), Roberta Ferreira (pequena na estatura, mas gigante em exemplos profissionais), Júlia Soares (ela tinha medo de mim...ahaha..), Gustavo Macedo (famoso "Krispectina"; manda bala Dr.), José Nelio Sales (grande profissional e exemplo na forma de trabalho em equipe), Henderson Ayres (me impressiono com sua dedicação e força de vontade). Enfim, gostaria de agradecer pelo

convívio na “salinha”, nos experimentos, e em todas as etapas de meu doutorado. Em especial gostaria também de agradecer aos verdadeiros amigos que sempre se preocuparam comigo, pelas conversas, orientações e principalmente pela verdadeira amizade. Muito obrigado.

Também gostaria de agradecer aos amigos da “velha guarda” do VRA: Lindsay U. Gimenes, Nelcio Carvalho, Torres Júnior, Everton Reis, Ana Paula Mantovani, Alessandra Teixeira, Gabriel Crepaldi, Claudiney Martins, Márcio Leão Ferraz, Alexandre Souza, Márcio Marques, Luiz Nasser, Marcílio Nichi, Rodolfo Berber, Claudio Coutinho e Del Rei. Gostaria de registrar meu carinho e admiração por todos vocês.

Às secretárias Harumi Shiraishi e Thais Soto agradeço pelas orientações e todo o apoio durantes o período de VRA. Em especial, gostaria de agradecer a Harumi, pelos agradáveis momentos de conversas na secretaria da Pós. “Para variar, a Harumi sempre comendo. Não sei como é magra daquele jeito”. Além delas, agradeço aos outros funcionários, Miguel, Sandra, Roberta, pelos inúmeros auxílios e pela prontidão em ajudar. Em especial gostaria também de agradecer a querida Dona Sílvia que sempre me tratou com carinho e me recebe com aquele sorriso incondicional.

Gostaria de agradecer aos amigos e parceiros Luciano Penteado e Renato Girotto sempre disposto a ajudar e colaborar em todos os experimentos. Agradeço pelos ensinamentos, exemplos e pelas inúmeras conversas. Eu aprendi e evoluí muito com vocês. Da mesma forma gostaria de agradecer todas as fazendas que permitiram a realização dos estudos, pela disponibilidade de animais, alojamento, deslocamento.

À todas as empresas parceira e principalmente aos funcionários de cada uma delas, por todos os incentivos à pesquisa e pela disponibilidade. Em especial, gostaria de agradecer o Evanil Pires Campos Filho (Nil), da Sexing Technologies, por todo o apoio financeiro realizado durante o período do doutorado. Agradeço também ao Nil pela confiança depositada em minha pessoa e pela amizade que pudemos conquistar.

Gostaria de agradecer a Universidade de São Paulo por proporcionar mais essa etapa de vida. Também pela CAPES pelo incentivo financeiro concedido.

Enfim, gostaria de agradecer todos àqueles que de uma forma ou outra pude conviver durante essa etapa de minha vida, vocês foram e sempre serão muito importantes para mim.

OBRIGADO A TODOS!

RESUMO

SÁ FILHO, M. F. de. **Importância da ocorrência de estro e do diâmetro folicular no momento da inseminação em protocolos de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em fêmeas zebuínas de corte.** [Importance of occurrence of estrus and the ovarian follicle diameter at insemination in synchronization of ovulation protocols for timed artificial insemination in zebu beef cows]. 2012. 124 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as associações entre a ocorrência de estro após os protocolos de sincronização da ovulação e diâmetro folicular no momento da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) nas respostas ovarianas e na taxa de concepção após IATF em fêmeas zebuínas de corte. Assim, avaliaram-se as possíveis implicações práticas do uso dessas informações para a melhoria dos programas de IATF em fêmeas zebuínas lactantes. Essa tese é dividida em três capítulos. No primeiro capítulo, estudou-se a associação entre o diâmetro folicular no momento da IATF com as respostas das fêmeas após sincronização da ovulação e IATF. Observou-se que o aumento do diâmetro folicular no momento da IATF aumenta tanto a taxa de ovulação, quanto a taxa de concepção após IATF. O segundo capítulo relata a realização de quatro estudos onde foram avaliadas as associações da ocorrência de estro no intervalo entre o final do protocolo de sincronização e o momento da IATF na resposta ovariana e a taxa de concepção após a IATF. Foi observado que a ocorrência de estro após o protocolo de sincronização está associada à melhores respostas ovarianas, melhor função luteínica no ciclo subsequente e melhor taxa de concepção após IATF. Por fim, o terceiro capítulo trata da utilização das informações supracitadas para a seleção de fêmeas com maior probabilidade de gestação após IATF para receberem sêmen sexado. Os resultados são indicativos de que é possível obter maiores taxas de concepção após uso de sêmen sexado ou convencional nas fêmeas selecionadas pela ocorrência de estro ou pela presença de folículo de maior diâmetro no momento da IATF. Portanto, estratégias para melhorar a ocorrência de estro e o diâmetro folicular no momento da IATF são importantes para o sucesso dos programas de sincronização da ovulação para IATF de fêmeas zebuínas, e tais critérios podem ser utilizados na seleção de fêmeas de melhor resposta para receberem sêmen sexado.

Palavras-chave: Reprodução. Bovino. Vacas lactantes. Ovário. Concepção.

ABSTRACT

SÁ FILHO, M. F. de. **Importance of occurrence of estrus and the ovarian follicle diameter at insemination in synchronization of ovulation protocols for timed artificial insemination in zebu beef cows.** [Importância da ocorrência de estro e do diâmetro folicular no momento da inseminação em protocolos de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em fêmeas zebuínas de corte]. 2012. 124 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The objective of the present thesis was to evaluate the associations between the occurrence of estrus after synchronization of ovulation protocols and ovarian follicle diameter at the timed artificial insemination (TAI) on ovarian responses and conception rates after TAI in Zebu beef females. Finally, there were evaluated some practical tools using established information to select cows to receive great value semen during TAI program. This thesis was divided into three chapters. In the first chapter, it was evaluated the association between ovarian follicle diameter at the TAI moment on ovarian responses and pregnancy per TAI. It was observed that the increase in the ovarian follicle diameter at TAI increases both the ovulation and conception rates following the TAI synchronization protocol. In the second chapter, there were four studies in which was analyzed the effect of occurrence of estrus between the end of the synchronization protocol and the IATF. It was observed that the occurrence of estrus after synchronization protocol is associated with higher ovarian responses, greater luteal function on subsequent estrous cycle and higher pregnancy per TAI. Finally, the third chapter, the established information were used to select females with greater odds of pregnancy to receive sex-sorted sperm. It was possible to obtain higher conception rates following the selection of females through the occurrence of estrus or the presence of larger ovarian follicle at the time of TAI after the use either sex-sorted or non sex-sorted sperm. Therefore strategies to improve the occurrence of estrus and the ovarian follicle diameter at TAI moment are important to improve the reproductive outcomes following synchronization of ovulation protocols for TAI in lactating zebu cows. Besides, such selection criteria can be used to select females with greater odds of pregnancy to receive sex-sorted sperm.

Keywords: Reproduction. Bovine. Suckled cows. Ovarian. Pregnancy.

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO** 14

2 **REVISÃO DE LITERATURA** 16

2.1 CONTROLE DA DINÂMICA FOLICULAR E DA OVULAÇÃO EM FÊMEAS BOVINAS. 16

2.1.1 **Sincronização da emergência da nova onda de crescimento folicular.** 16

2.1.2 **Controle da fase luteínica/progesterônica** 18

2.1.2.1 Estrógenos 18

2.1.2.2 Prostaglandina F2α 18

2.1.2.3 Progesterona/progestágenos 19

2.1.3 **Indução sincronizada da ovulação** 19

2.2 PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO 20

2.2.1 **Protocolos de sincronização à base de GnRH e prostaglandina** 21

2.2.2 **Protocolos de sincronização a base de estradiol e progesterona** 22

2.2.3 **Uso do tratamento com eCG (gonadotrofina coriônica equina) ou do desmame temporário em programas de sincronização da ovulação para IATF** 24

2.3 IMPORTÂNCIA DO ESTRADIOL NA REPRODUÇÃO DA FÊMEA BOVINA 26

2.3.1 **Papel do estradiol na secreção pulsátil de GnRH/LH** 26

2.3.2 **Papel do estradiol na fisiologia do estro** 28

2.3.3 **Papel do estradiol no pico préovulatório de GnRH** 29

2.3.4 **Papel do estradiol no ambiente uterino** 31

2.3.5 **Importância do proestro sobre a fertilidade da fêmea** 32

2.4 USO DE SÊMEN SEXADO EM PROGRAMAS REPRODUTIVOS 33

2.4.1 **Histórico e metodologia para sexagem do sêmen** 34

2.4.2 **Principais limitações para o uso do sêmen sexado** 35

2.4.3 **Uso de sêmen sexado em programas de IATF** 36

3 **CAPÍTULO I - INFLUÊNCIA DO DIÂMETRO FOLICULAR NO MOMENTO DA IATF SOBRE A RESPOSTA OVARIANA E A TAXA DE CONCEPÇÃO APÓS PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO EM FÊMEAS ZEBUÍNAS** 38

3.1 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE 38

3.2 OBJETIVO GERAL 38

3.2.1 **Objetivos específicos** 39

3.3 RESPOSTA OVARIANA E TAXA DE CONCEPÇÃO DE ACORDO COM O DIÂMETRO FOLICULAR NO MOMENTO DA IATF DE VACAS ZEBUÍNAS SUBMETIDAS A DIFERENTES PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO À BASE DE ESTRADIOL E PROGESTERONA/PROGESTÁGENO. 40

3.3.1 **Material e métodos** ... 40
3.3.1.1 Animais e local do experimento ... 40
3.3.1.2 Manejo reprodutivo e tratamentos de sincronização ... 41
3.3.1.3 Ultrassonografia ovariana e categorização dos folículos ... 41
3.3.1.4 Diagnóstico de gestação ... 43
3.3.1.5 Análise estatística ... 43
3.3.2 **Resultados** ... 44
3.4 DISCUSSÃO ... 51
4 **CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE ESTRO APÓS OS PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO** ... 55
4.1 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE ... 55
4.2 OBJETIVO GERAL ... 55
4.2.1 **Objetivos específicos** ... 56
4.3 EXPERIMENTO 1 – INFLUÊNCIA DA OCORRÊNCIA DE ESTRO NO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR, A TAXA DE OVULAÇÃO E A FORMAÇÃO DO CORPO LÚTEO NO DIESTRO SUBSEQUENTE DE FÊMEAS ZEBUÍNAS LACTANTES SUBMETIDAS A PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO. ... 57
4.3.1.1 Animais e local do experimento ... 57
4.3.1.2 Manejo reprodutivo e tratamento ... 57
4.3.1.3 Detecção do estro ... 58
4.3.1.4 Exames ultrassonográficos ... 59
4.3.1.5 Colheita de sangue e análise de progesterona ... 59
4.3.1.6 Análise estatística ... 60
4.3.2 **Resultados** ... 60
4.4 EXPERIMENTO 2 – ASSOCIAÇÃO ENTRE A OCORRÊNCIA DE ESTRO E A TAXA DE CONCEPÇÃO APÓS IATF DE VACAS ZEBUÍNAS LACTANTES SUBMETIDAS A PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA IATF. ... 62
4.4.1 **Material e métodos** ... 62
4.4.1.1 Animais e local do experimento ... 62
4.4.1.2 Manejo reprodutivo e tratamento ... 62
4.4.1.3 Detecção do estro ... 63
4.4.1.4 Exame ultrassonográfico e categorização folicular ... 64
4.4.1.5 Diagnóstico de gestação ... 64
4.4.1.6 Análise estatística ... 64
4.4.2 **Resultados** ... 65

4.5 EXPERIMENTO 3- USO DO GNRH NO MOMENTO DA IATF COMO TRATAMENTO ADICIONAL PARA VACAS ZEBUÍNAS LACTANTES QUE NÃO APRESENTAM ESTRO ENTRE A RETIRADA DO DISPOSITIVO E A IATF..... 69
4.5.1 **Material e métodos**..... 69
4.5.1.1 Animais e local do experimento..... 69
4.5.1.2 Manejo reprodutivo e tratamento..... 69
4.5.1.3 Detecção do estro..... 71
4.5.1.4 Diagnóstico de gestação..... 71
4.5.1.5 Análise estatística..... 71
4.5.2 **Resultados**..... 72
4.6 EXPERIMENTO 4 – USO DE DIFERENTES ÉSTERES DE ESTRADIOL PARA INDUÇÃO DA OVULAÇÃO EM PROTOCOLOS DE IATF SOBRE AS TAXAS DE OCORRÊNCIA DE ESTRO E DE CONCEPÇÃO EM FÊMEAS ZEBUÍNAS. 73
4.6.1 **Material e métodos**..... 73
4.6.1.1 Animais e local do experimento..... 73
4.6.1.2 Tratamento 73
4.6.1.3 Detecção do estro..... 74
4.6.1.4 Diagnóstico de gestação..... 75
4.6.1.5 Análise estatística..... 75
4.6.2 **Resultados**..... 75
4.7 DISCUSSÃO 77
5 **CAPÍTULO III - SELEÇÃO DE FÊMEAS A PARTIR DA OCORRÊNCIA DE ESTRO E DO DIÂMETRO FOLICULAR PARA RECEBEREM SÊMEN CONVENCIONAL OU SEXADO EM PROGRAMAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO** 79
5.1 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE 79
5.2 OBJETIVO GERAL 79
5.2.1 **Objetivos específicos** 79
5.3 EXPERIMENTO 1- SELEÇÃO DE FÊMEAS ZEBUÍNAS LACTANTES A PARTIR DO DIÂMETRO FOLICULAR NO MOMENTO DA IATF PARA O USO DE SÊMEN SEXADO OU CONVENCIONAL. 81
5.3.1 **Material e métodos**..... 81

5.3.1.1 Animais e local do experimento 81
5.3.1.2 Manejo reprodutivo e tratamento 81
5.3.1.3 Delineamento experimental 82
5.3.1.4 Exames ultrassonográficos 84
5.3.1.5 Descrição do procedimento de sexagem 84
5.3.1.6 Diagnóstico de gestação 85
5.3.1.7 Análise estatística 85
5.4 RESULTADOS 86
5.5 EXPERIMENTO 2 – SELEÇÃO DE FÊMEAS ZEBUÍNAS LACTANTES A PARTIR DA OCORRÊNCIA DE ESTRO ENTRE A RETIRADA DO DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE P4 E A IATF PARA USO DE SÊMEN CONVENCIONAL OU SEXADO. 88
5.5.1 **Material e métodos** 88
5.5.1.1 Animais e local do experimento 88
5.5.1.2 Manejo reprodutivo e tratamento 88
5.5.1.3 Detecção do estro 89
5.5.1.4 Delineamento experimental 89
5.5.1.5 Descrição do procedimento de sexagem 90
5.5.1.6 Diagnóstico de gestação 91
5.5.1.7 Análise estatística 91
5.5.2 **Resultados** 92
5.6 DISCUSSÃO 97
6 **CONCLUSÕES** 100
7 **IMPLICAÇÕES** 100
REFERÊNCIAS 102

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um dos maiores produtores e exportadores mundiais de carne apresentando um contínuo crescimento na agroindústria (FAO, 2011). Nesse contexto, o melhoramento genético e a eficiência reprodutiva dos rebanhos têm sido metas que norteiam o sistema produtivo de fazendas produtoras de bovinos de corte.

Dentre as estratégias de manejo reprodutivo, a inseminação artificial (IA) se apresenta como uma das ferramentas de maior impacto no melhoramento genético, no aumento da produtividade e da rentabilidade dos rebanhos bovinos (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2012; SÁ FILHO et al., 2012). Programas de sincronização da ovulação para IA em tempo fixo (IATF) aumentam o uso da IA, bem como da eficiência reprodutiva de rebanhos de corte (BÓ; BARUSELLI; MARTINEZ, 2003; BARUSELLI et al., 2004; MENEGHETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2009a).

Diversos fatores podem influenciar o sucesso dos programas de sincronização da ovulação para IATF em fêmeas bovinas de corte ou leite (PERRY et al., 2006; GALVÃO; SANTOS, 2008; MENEGHETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2009a; BARUSELLI et al., 2012). Dentre eles, a condição corporal das fêmeas no primeiro dia do protocolo de sincronização, a categoria animal (nulípara, primípara ou plurípara), a fazenda, o inseminador, a partida do sêmen e o touro utilizado para a IATF apresentam grande influência na taxa de concepção após a IATF (SÁ FILHO et al., 2009a). Fatores como o tamanho do folículo ovulatório, a duração do proestro e a ocorrência de estro após o protocolo de sincronização também tem sido relacionados à resposta positiva aos protocolos em fêmeas taurinas. (PERRY et al., 2005a; MUSSARD et al., 2006, 2007; PERRY et al., 2007; GALVÃO; SANTOS, 2008; BRIDGES et al., 2010).

Entretanto, informações sobre a ocorrência de estro ou do diâmetro folicular no momento da inseminação de fêmeas submetidas a protocolos de sincronização da ovulação para IATF no Brasil são escassas. Além disso, a maior parte das fêmeas bovinas criadas no país apresenta sangue zebuíno, o que lhes confere algumas diferenças referentes ao comportamento reprodutivo e a resposta aos programas de sincronização em relação às fêmeas taurinas (BÓ; BARUSELLI; MARTINEZ, 2003; BARUSELLI et al., 2004). Nesse sentido, é de grande importância identificar os fatores que podem influenciar a resposta aos

programas de sincronização da ovulação em fêmeas zebuínas. Assim estabelecendo associações é possível o desenvolvimento de estratégias específicas para melhoria dos protocolos de sincronização da ovulação e o desempenho reprodutivo nesse grupo genético.

O presente estudo tem como principal objetivo estudar a importância da ocorrência de estro e do diâmetro folicular no momento da inseminação na resposta de fêmeas zebuínas lactantes de corte submetidas a protocolo de sincronização da ovulação e IATF. Visa também, estabelecer estratégias práticas na utilização dessas informações para melhorar a resposta ao uso do sêmen sexado em programas de IATF.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONTROLE DA DINÂMICA FOLICULAR E DA OVULAÇÃO EM FÊMEAS BOVINAS

Na manipulação hormonal da dinâmica folicular, manipulação luteínica e manipulação da ovulação em programas de sincronização da ovulação, são utilizados três princípios básicos: **1)** Sincronização da emergência de uma nova onda de crescimento folicular pela indução de ovulação do folículo dominante presente no momento do tratamento (GnRH, LH ou hCG), ou por indução de atresia folicular (associação entre P4 e E2); **2)** Controle da duração da fase progestacional, ou pelo uso de agentes luteolíticos (prostaglandina F2α e estrógenos) ou administração exógena de P4 por meio de dispositivos/implantes de liberação lenta; **3)** Indução da ovulação sincronizada do folículo dominante ao final do tratamento com GnRH, LH, hCG ou estrógenos (benzoato ou cipionato de E2).

2.1.1 Sincronização da emergência da nova onda de crescimento folicular

A sincronização da emergência de uma nova onda de crescimento folicular pode ser realizada pela indução da ovulação do folículo dominante presente no momento do tratamento (GnRH, LH ou hCG) ou por indução de atresia folicular (associação entre P4 e E2).

Diversos métodos foram propostos para a indução da emergência sincronizada de uma nova onda, dentre esses, podem-se citar a sincronização por métodos mecânicos (ablação folicular) ou métodos farmacológicos.

No caso de métodos mecânicos, a ablação do folículo dominante guiada por ultrassonografia, leva a uma descarga de FSH induzindo a emergência de uma nova onda de crescimento folicular em aproximadamente 1,5 dias (BERGFELT; LIGHTFOOT; ADAMS, 1994). No entanto, apesar de sua satisfatória eficiência, estes métodos apresentam alto grau de dificuldade de aplicação em larga escala (BÓ et al., 2002).

Na sincronização por métodos farmacológicos, os estrógenos quando administrados na presença de P4 endógena (produzido pelo CL) ou exógena (liberado pelos dispositivos/implantes de P4), causam a diminuição dos níveis circulantes de FSH e LH, provocando regressão dos folículos dependentes de gonadotrofinas (BÓ et al., 1993; MACKEY et al., 2000; BÓ et al., 2002) e após a metabolização e a diminuição das concentrações plasmáticas do E2, verificam-se aumento subsequente das concentrações de FSH endógeno e emergência de uma nova onda de crescimento folicular (MARTÍNEZ et al., 2005).

Existem três diferentes tipos ésteres de E2: o benzoato (BE), o valerato (VE) e o cipionato (CE). O valerato de E2 (VE) (BÓ et al., 1993) e o cipionato de E2 (CE) (COLAZO; KASTELIC; MAPLETOFT, 2003) na presença de P4, causam a regressão dos folículos antrais (BÓ et al., 2002). Porém, estes ésteres de E2 apresentam um tempo de meia vida longo, o que leva a atrasos e dispersão no momento da emergência da nova onda de crescimento folicular. Já BE (SÁ FILHO et al., 2011a) e o próprio E2-17β (CACCIA; BÓ, 2008) apresentam um tempo de meia vida curto, induzindo eficazmente a emergência da nova onda de crescimento folicular, de 3 a 4 dias após o tratamento, tanto em fêmeas *Bos taurus* quanto em fêmeas *Bos indicus* (BÓ et al., 1996; BÓ et al., 2002; SÁ FILHO et al., 2011a).

A ovulação do folículo dominante e a emergência de uma nova onda de crescimento folicular estão estreitamente relacionadas (THATCHER et al., 1989; WOLFENSON et al., 1994; TWAGIRAMUNGU; GUILBAULT; DUFOUR, 1995). Assim, outra possibilidade para a sincronização da emergência é por meio da indução da ovulação. Esta indução da ovulação pode ser feita diretamente pela administração de fármacos que se ligam aos receptores de LH do folículo dominante (LH e hCG) ou pela indução do pico do hormônio luteinizante pela administração de GnRH e/ou seus análogos. Durante o processo de indução da ovulação, verificam-se reduções nas concentrações circulantes de E2 e inibina, responsáveis pelo bloqueio da secreção de FSH na hipófise. Como consequência, ocorre uma subsequente descarga de FSH (ADAMS et al., 1992, 2008), responsável pela emergência e desenvolvimento de uma nova onda de crescimento folicular entre 1 e 2 dias após o tratamento. É importante ressaltar que a efetiva indução de uma nova onda de crescimento folicular somente irá ocorrer caso ocorra a ovulação (MARTINEZ et al., 1999). Além disso, o uso do GnRH para a indução de ovulação com finalidade de sincronizar a emergência de uma nova onda de crescimento folicular, apresenta baixa eficiência em fêmeas *Bos indicus*,

principalmente àquelas em anestro pós-parto (BARROS et al., 2000; BARUSELLI et al., 2000, 2004).

2.1.2 Controle da fase luteínica/progesterônica

2.1.2.1 Estrógenos

Os estrógenos, principalmente os que possuem longa duração na corrente circulatória (VE), são capazes de induzir a luteólise pela sua capacidade de estimular a secreção endógena de $PGF_{2\propto}$ (PETERSON; HUHN; KESLER, 2000). No entanto, no estudo realizado por Martinez et al (2004), demonstrou-se 27,6% de luteólise, com consequente manifestação de cio e ovulação em novilhas de corte que receberam 2 mg de BE durante o início do diestro com intuito de sincronizar a emergência folicular (MARTÍNEZ; KASTELIC; MAPLETOFT, 2004). Contudo, esse efeito luteolítico é superior quando o E2 de meia vida longa é incorporado no início dos protocolos de sincronização da ovulação para IATF, com o objetivo de induzir a emergência de uma nova onda de crescimento folicular e de eliminar a administração de $PGF_{2\alpha}$ (PETERSON; HUHN; KESLER, 2000).

2.1.2.2 Prostaglandina $F_{2\alpha}$

É preconizada a aplicação de $PGF_{2\alpha}$, juntamente com os tratamentos à base de P4/progestágenos, para indução da luteólise e queda abrupta dos níveis endógenos de P4, simulando as condições fisiológicas encontradas no final do diestro. Recomenda-se a administração de prostaglandina no momento da retirada dos dispositivos de P4, garantindo que a concentração de P4 não permaneça elevada (provinda de CL) e bloqueie a ovulação (BÓ et al., 2002).

2.1.2.3 Progesterona/progestágenos

O tratamento com P4 exógena modula a frequência pulsátil de LH (STOCK; FORTUNE, 1993; KINDER et al., 1996), evitando a maturação folicular final, estro e a ovulação do folículo dominante, consequentemente. A P4 e os progestágenos são substâncias que podem ser administradas por via oral, por implantes subcutâneos ou por dispositivos intravaginais, embora também existam formulações comerciais injetáveis. Esses compostos quando associado ao tratamento com E2 para sincronização da nova onda de crescimento folicular e à $PGF_{2\alpha}$ como agente luteolítico proporcionam adequadas taxas de sincronização do cio (80 a90 % dos estros ocorrendo entre 24 a 28 horas após a remoção do dispositivo de P4).

2.1.3 Indução sincronizada da ovulação

Os fármacos utilizados para a indução da ovulação agem por retroalimentação positiva na liberação pulsátil de LH (estrógenos e GnRH) ou agem diretamente no folículo (hCG e LH) (RAY, 1965; BUTTREY; BURNS; STEVENSON, 2010). Cada um dos fármacos apresenta um intervalo específico entre sua administração e a ocorrência das ovulações. O GnRH, quando administrado intramuscularmente, induz a uma onda de LH semelhante a pré-ovulatória em 2 horas e ovulação entre 26 a 30 horas, respectivamente (THATCHER et al., 1989; TWAGIRAMUNGU; GUILBAULT; DUFOUR, 1995; SCHMITT et al., 1996). Já a administração de BE induz a ocorrência de pico de LH entre 16 a 24 horas e a ovulação sincronizada entre 44 a 45 horas após o tratamento (HANLON et al., 1997; SALES et al., 2012). O CE, quando administrado no momento da retirada do dispositivo intravaginal, induz o pico de LH entre 45 a 49 horas (SALES et al., 2012) e a ovulação entre 67 a 70 horas após o tratamento (SALES et al., 2012). Dessa forma, o intervalo entre a retirada da fonte de P4 e a

ovulação é semelhante entre o protocolo que administra CE no momento ou BE 24 horas após a retirada do dispositivo de P4 (SALES et al., 2012).

2.2 PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

A incorporação de programas de manejo reprodutivo na rotina de fazendas é uma estratégia eficiente para melhorar os resultados reprodutivos e econômicos de fazendas de cria. A IA promove ganhos genéticos e econômicos pela utilização de touros de mérito genético superior. Apesar dos avanços tecnológicos dos programas de IA, a implantação desses programas de forma tradicional é dificultada principalmente pelo anestro pós-parto e pelas falhas na detecção de estro (SENGER, 1994; BÓ et al., 2007). Essas dificuldades são agravadas quando se trabalha com raças zebuínas que apresentam elevada incidência de estros noturnos e de curta duração (FIGUEIREDO et al., 1997; PINHEIRO et al., 1998; BÓ; BARUSELLI; MARTINEZ, 2003).

Para evitar tais problemas associados aos programas de IA baseados na detecção de estro, diversos grupos de pesquisa têm desenvolvido diferentes estratégias para inseminar fêmeas bovinas em tempo pré-determinado, eliminando a necessidade de detecção de estro. No meio da década de 90 foi desenvolvido o protocolo "Ovsynch" (GnRH 7 dias antes; $PGF_{2\alpha}$; GnRH 48h; IATF 16 h) (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995). A partir disso, vários protocolos foram desenvolvidos para controlar tanto a função luteínica, quanto a função folicular permitindo satisfatórias taxas de concepção à IATF (semelhante àquelas obtidas após IA baseado na detecção de estro). Atualmente, os programas de IATF são aplicados rotineiramente tanto em rebanhos de leite como em rebanhos de corte (MACMILLAN; SEGWAGWE; PINO, 2003; STEVENSON et al., 2003; BARUSELLI et al., 2004; CHEBEL et al., 2004; LUCY; MCDOUGALL; NATION, 2004; SANTOS et al., 2004; THATCHER et al., 2006; BÓ et al., 2007; GALVÃO; SANTOS, 2008; MENEGHETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2009a; BISINOTTO; SANTOS, 2012; WILTBANK et al., 2012).

Diversos protocolos foram desenvolvidos com o objetivo de estabelecer tratamentos específicos para as diferentes categorias de animais e minimizar o manejo com as fêmeas, eliminando a necessidade de detecção de cio.

2.2.1 Protocolos de sincronização à base de GnRH e prostaglandina

A administração de GnRH induz o aparecimento de uma nova onda folicular após a indução da ovulação (MACMILLAN; THATCHER, 1991; TWAGIRAMUNGU et al., 1992a; WOLFENSON et al., 1994; TWAGIRAMUNGU; GUILBAULT; DUFOUR, 1995; SCHMITT et al., 1996). Posteriormente, estudos demonstraram que o uso de um tratamento com $PGF_{2\alpha}$ é realizado sete dias após o tratamento com GnRH, o que não reduz a fertilidade do estro induzido (THATCHER et al., 1989; TWAGIRAMUNGU et al., 1992b). Tal informação se tornou a base para o desenvolvimento do protocolo Ovsynch (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995). Após esse primeiro relato, inúmeros protocolos têm sido propostos e aplicados rotineiramente principalmente em vacas leiteiras de alta produção (WILTBANK et al., 2011).

A resposta ovariana e a taxa de concepção após o uso do protocolo Ovsynch é afetada de acordo com a fase do ciclo estral (MARTINEZ et al., 1999; VASCONCELOS et al., 1999; MOREIRA et al., 2000) ou a ciclicidade da fêmea (BISINOTTO; CHEBEL; SANTOS, 2010) no momento do primeiro GnRH do protocolo. Estudos demonstraram que a melhor fase do ciclo estral para se iniciar o protocolo Ovsynch é entre os dias 5 a 12 do ciclo estral (VASCONCELOS et al., 1999; MOREIRA et al., 2000). Para aumentar a proporção de vacas nessa fase do ciclo estral para a adminstração do primeiro GnRH do protocolo Ovsynch, diversos estudos desenvolveram diferentes estratégias de pré-sincronização (MOREIRA et al., 2000; GALVÃO; SÁ FILHO; SANTOS, 2007; SOUZA et al., 2008; KASIMANICKAM et al., 2009; CHEBEL; SANTOS, 2010). Tais protocolos de pré-sincronização melhoram a resposta ovariana e a fertilidade das fêmeas submetidas aos protocolos a base de GnRH e $PGF_{2\alpha}$.

O uso de protocolos a base de GnRH e PGF2α tem sido associado com inconsistentes resultados quando aplicados em bovinos de corte. Tais variações nos resultados são decorrentes principalmente em falhas na indução da nova onda de crescimento folicular após administração de GnRH (GEARY et al., 1998; MARTINEZ et al., 1999; BARUSELLI et al., 2000; COLAZO et al., 2009). Em vacas zebuínas lactantes, os protocolos à base de GnRH e

PGF2α já foram avaliados (BARROS et al., 2000; FERNANDES et al., 2001; BARUSELLI et al., 2002; WILLIAMS et al., 2002; SÁ FILHO et al., 2009b), sendo os resultados satisfatórios somente quando as fêmeas estão ciclando no início do protocolo (FERNANDES et al., 2001) ou quando são submetidas a sucessivos períodos de desmame temporário (SÁ FILHO et al., 2009b). Entretanto, os resultados ainda são inferiores aos alcançados após tratamentos a base de P4 e E2 (BARUSELLI et al., 2002). Portanto, coletivamente, as pesquisas demonstram que o protocolo Ovsynch apresenta baixa eficiência quando aplicados em fêmeas zebuínas amamentando mantidas em condições de pastejo em gramíneas tropicais, que são frequentemente associadas à elevada incidência de anestro pós-parto (BARROS et al., 2000; FERNANDES et al., 2001; BARUSELLI et al., 2002).

2.2.2 Protocolos de sincronização a base de estradiol e progesterona

A suplementação exógena com P4 reduz a liberação de LH, altera a função ovariana, inibe a ocorrência do estro e evita a ocorrência de ovulação durante o tratamento em bovinos (ADAMS et al., 1992; SAVIO et al., 1993; LOOPER et al., 2003; FIKE et al., 2004; COLAZO et al., 2008). Os primeiros estudos nos quais foram utilizadas fontes exógenas de P4 ou progestános para o controle do ciclo estral de bovinos, empregaram tais hormônios por via oral, tal como o acetato de melengestrol (PATTERSON et al., 1989; HIERS et al., 2003; PERRY et al., 2005b). Posteriormente foram desenvolvidos diversos tipos de dispositivos tanto intravaginais ou implantes auriculares com a finalidade de controlar o desenvolvimento folicular e o ciclo estral de bovinos (ODDE, 1990; MARTINEZ et al., 2000; BÓ et al., 2002; CAVALIERI et al., 2006).

Inicialmente a suplementação exógena com P4 foi realizada durante longos períodos, simulando a duração da fase progesterônica durante o ciclo estral. Esses longos períodos de tratamentos, foram associados com satisfatório grau de sincronização dos estros após o término da suplementação, no entanto, a fertilidade desse estro induzido era reduzida (SAVIO et al., 1993; KINDER et al., 1996; REVAH; BUTLER, 1996). Para contornar tais efeitos negativos, foram incorporados aos tratamentos de sincronização os indutores de emergência da nova onda de crescimento folicular no início do tratamento de sincronização. Além disso, o

período de permanência da suplementação exógena foi reduzida, e hoje, é normalmente de 7, 8 ou 9 dias (BÓ et al., 2002; BARUSELLI et al., 2004; MENEGHETTI et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2009). Devido à ocorrência de nova emergência da onda de crescimento folicular durante o protocolo e a menor duração do tratamento com P4, a incidência de folículos persistentes (folículos que contem oócitos envelhecidos com baixa competência de desenvolvimento embrionário) é baixa e a fertilidade após IATF é próxima àquela obtida após IA pós-detecção de estro (BÓ et al., 2002; SANTOS; RUTIGLIANO; SÁ FILHO, 2009).

Semelhantemente ao descrito para tratamento com GnRH, a associação de P4 e E2 foi introduzida aos protocolos de sincronização para controlar a dinâmica folicular tanto em fêmeas taurinas (BÓ; PIERSON; MAPLETOFT, 1991; MARTINEZ et al., 2000; COLAZO; KASTELIC; MAPLETOFT, 2003) quanto em fêmeas zebuínas (BARUSELLI et al., 2006; CARVALHO et al., 2008; SÁ FILHO et al., 2011a). A combinação entre E2 e P4 tem sido muito utilizada em países da América Central e América do Sul (BÓ et al., 2002; SÁ FILHO et al., 2009a, 2011a), permitindo a obtenção de taxas de concepção semelhantes àquelas obtidas após IA depois da detecção de estro em bovinos (MARTINEZ et al., 2000; BÓ et al., 2002; MACMILLAN; SEGWAGWE; PINO, 2003; BARUSELLI et al., 2004; SÁ FILHO et al., 2009a; SOUZA et al., 2009).

O mecanismo responsável por tal supressão do crescimento parece envolver a redução dos níveis circulantes de FSH (BÓ; PIERSON; MAPLETOFT, 1991; BÓ et al., 1993, 2002 O'ROURKE et al., 2000) e LH (BURKE; MACMILLAN; BOLAND, 1996). A administração de 5 ou 2,5 mg de 17β-E2 (BÓ et al., 2002) ou 2,5 mg de BE (CACCIA; BÓ, 2008) em fêmeas durante fases aleatórias do ciclo estral promove a emergência da uma nova onda de crescimento folicular cerca de 4 dias após. Além disso, o efeito do BE sobre a indução de nova onda folicular ocorre independentemente da raça (zebuínas, taurinas ou cruzadas) ou aptidão produtiva para carne ou leite (CARVALHO et al., 2008).

O VE, outro éster de E2, tem uma meia-vida de circulação longa, o que promove um efeito de supressão prolongada sobre FSH e consequentemente no desenvolvimento folicular quando comparado ao tratamento com 17β-E2 ou BE (BÓ et al., 1993; MARTÍNEZ et al., 2005; SÁ FILHO et al., 2011a). Em fêmeas zebuínas, a administração de diferentes doses de VE (2,5 ou 5,0 mg) associado a inserção de implante auricular contendo norgestomet atrasou o dia da emergência da nova onda de crescimento folicular em comparação com o tratamento

com 2,0 mg de BE (SÁ FILHO et al., 2011a). Além disso, esse intervalo foi maior e apresentou maior dispersão quando o tratamento foi realizado em novilhas ciclando do que em vacas lactantes. Dessa forma, o tratamento com VE em novilhas zebuínas ciclando não é recomendado (SÁ FILHO et al., 2011a).

Apesar de tais diferenças farmacológicas entre os ésteres de E2, tanto o VE quanto o BE têm sido aplicados com sucesso durante os protocolos de sincronização da emergência da nova onda de crescimento folicular em fêmeas taurinas (ODDE, 1990; GEARY et al., 1998) e zebuínas (MENEGHETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2009a, 2010c, 2011a; SALES et al., 2012).

Após a luteólise, os protocolos de sincronização para IATF devem utilizar indutores de ovulação para induzir uma ovulação sincronizada. Em protocolos que utilizam a associação entre P4 e E2, uma dose baixa dose de E2 é normalmente administrada entre zero e 24 horas após a retirada da fonte exógena de P4 para induzir o pico de LH sincronizado. Apesar das diferenças farmacológicas, tanto o BE quanto o CE são eficazes para induzir o pico de LH, gerando taxas de concepção semelhantes em vacas zebuínas lactantes após IATF (BE=57,5%; 277/482 vs. CE=61,8%; 291/471) (SALES et al., 2012). Além disso, como o CE é administrado no momento da remoção do dispositivo de P4, isso reduz o número de manejos necessários para a realização do protocolo de IATF, sem reduzir a fertilidade.

2.2.3 Uso do tratamento com eCG (gonadotrofina coriônica equina) ou do desmame temporário em programas de sincronização da ovulação para IATF

A gonadotrofina sérica de éguas prenhes (eCG) é um hormônio glicoprotéico que é secretado pelos cálices endometriais de fêmeas equinas gestantes. A eCG é composta por duas subunidades (α – composta por 96 aminoácidos; e β – composta por 149 aminoácidos) e tem ação de LH e FSH na mesma molécula (MURPHY; MARTINUK, 1991). Uma característica importante da molécula de eCG é a existência de grande quantidade de carboidratos (aproximadamente 45% de sua massa celular) principalmente N-acetil neuramina (ácido siálico), primordialmente presente na subunidade β da molécula, o que proporciona uma grande meia vida a esse composto químico (MURPHY; MARTINUK, 1991).

Vacas em anestro pós-parto apresentam comprometimento da secreção pulsátil de LH, determinando insuficientes níveis dessa gonadotrofina para apoiar o desenvolvimento folicular e a ovulação (YAVAS; WALTON, 2000; WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002). Essa condição anovulatória limita a eficácia de protocolos de sincronização da ovulação para IATF (BARUSELLI et al., 2004). O tratamento com eCG aumenta o desenvolvimento final do folículo dominante e a taxa de concepção após IATF, principalmente em fêmeas em anestro ou com baixo escore de condição corporal, tanto de corte (BARUSELLI et al., 2004; BÓ et al., 2007; SALES et al., 2011a) quanto de leite (SOUZA et al., 2009; GARCIA-ISPIERTO et al., 2012). Portanto, em vacas apresentando insuficientes padrões de liberação pulsátil de LH para apoiar o crescimento do folículo dominante, o tratamento com eCG pode melhorar a resposta ovulatória e a taxa de concepção após os protocolos de sincronização da ovulação seguido de IATF.

Um importante aspecto pode estar relacionado à reação imunológica contra a molécula da eCG, uma vez que tal glicoproteína heteróloga é produzida pelos cálices endometriais da égua prenhe (MURPHY; MARTINUK, 1991; DRION et al., 2001). Em um trabalho recente, a autora avaliou os possíveis efeitos adversos do uso sucessivo da eCG em fêmeas bovinas (MANTOVANI, 2010). Os resultados comprovam que a produção de anticorpos contra eCG não é afetada pelo número de tratamentos sucessivos com a glicoproteína. Elevada produção de anticorpos foi observada somente quando as fêmeas receberam doses bem acima daquelas utilizadas em programas de IATF (2000 UI de eCG). Além disso, foi observado nesse estudo que a memória imunológica humoral das novilhas não foi alterada após tratamento tanto com 400 quanto 2000 UI de eCG, independentemente do número de tratamentos anteriores. Dessa forma, sugere-se que a utilização da eCG nos protocolos de sincronização da ovulação para IATF apresenta baixo risco de causar efeitos adversos nos tratamentos posteriores (MANTOVANI, 2010).

Uma alternativa para melhorar a secreção endógena de gonadotrofinas e a resposta ovarianas das fêmeas em anestro pós-parto aos programas de sincronização da ovulação para IATF é a utilização de períodos de desmame temporário. O desmame temporário aumenta a frequência de pulsos de LH, estimulando a ovulação de vacas com mais de 30 dias pós-parto (MACKEY et al., 2000; YAVAS; WALTON, 2000). Neste sentido, diversos estudos têm demonstrado que o manejo de desmame temporário em protocolos de sincronização da ovulação para IATF, baseados tanto na utilização de GnRH e $PGF_{2\alpha}$ (GEARY et al., 2001;

WILLIAMS et al., 2002; SÁ FILHO et al., 2009b) quanto no uso da associação entre E2 mais P4 (BARREIROS et al., 2003; PENTEADO et al., 2004) melhoram a taxa de concepção de vacas lactantes após IATF. Os resultados demonstram que o uso de eCG ou do desmame temporário apresentam efeito semelhante sobre a taxa de concepção após IATF de vacas zebuínas lactantes, não havendo efeito adicional do uso de ambas as estratégias (PENTEADO et al., 2004).

2.3 IMPORTÂNCIA DO ESTRADIOL NA REPRODUÇÃO DA FÊMEA BOVINA

O E2 modula, em uma sequencia fisiológica, a pulsatilidade de GnRH e consequentemente LH, expressão do comportamento de estro e onda pré-ovulatória de LH, exercendo assim um papel fundamental na ciclicidade e fertilidade da fêmea.

2.3.1 Papel do estradiol na secreção pulsátil de GnRH/LH

Em bovinos e ovinos, as elevadas concentrações de E2 durante o final do ciclo estral, estimulam, principalmente de forma indireta, os neurônios da área pré-óptica (POA) hipotalâmica a liberar GnRH. Entretanto, em outras fases do ciclo estral, o E2 exerce efeito supressor sobre a secreção de gonadotrofinas. Assim, existem distintos mecanismos pelos quais o E2 pode modular de maneira positiva (*feedback* positivo) ou negativa (*feedback* negativo) a secreção de GnRH.

O primeiro possível mecanismo que o E2 poderia realizar a modulação da secreção pulsátil de GnRH poderia ser por via direta clássica transcricional pela ativação do receptor beta de E2 (ER-β; roedores) ou a via não genômica (HERBISON, 2006). De forma indireta, o estrógeno pode agir na modulação das células da Glia, promovendo modificações nos neurônios produtores de GnRH. Uma segunda possibilidade e mais aceita para ruminantes, seria através de uma modulação indireta, via receptor alfa de E2 (ER-α). Dessa forma o E2 estimula neurônios aferentes aos neurônios produtores de GnRH. Por último, pode ser citada a

modulação via endotélio vascular, no qual o E2 poderia atuar de maneira parácrina, regulando a função terminal dos neurônios produtores de GnRH (HERBISON, 1998).

Um possível modelo de ação direta do E2 na liberação de GnRH é justificável pela presença de ER-β nos neurônios produtores de GnRH (roedor) (HERBISON, 2006). Tal ação poderia ocorrer de maneira não clássica, diretamente no neurônio de GnRH via fosforilação do AMP cíclico (KWAKOWSKY; HERBISON; ÁBRAHÁM, 2012). Entretanto, ainda não é bem estabelecido em ruminantes a natureza funcional do ER-β na despolarização do neurônio de GnRH.(HERBISON, 2006).

Como citado anteriormente, a ação do E2 pode ocorrer de maneira indireta, via estímulos de neurônios aferentes presentes no hipotálamo. Diversos neurotransmissores tem capacidade de regular (estimular ou inibir) a exocitose de GnRH na eminência média. Dentre eles, pode-se citar o glutamato, ácido gama-aminobutírico, noroepinefrina, neuropeptídeo Y (NPY), opiódies e kispeptina (KP) (HERBISON, 1998; SMITH; JENNES, 2001; CLARKSON et al., 2008; CLARKSON; HERBISON, 2009). Os neurônios contendo essas substâncias, expressam ERα, desta forma mediando retroalimentação positiva e/ou negativa do E2 na liberação pulsátil de GnRH. Um exemplo clássico são os neurônios de NPY que inibem a liberação de GnRH em presença de E2 e baixa condição corporal. Embora estudos neuroendocrinológicos ainda não expliquem o papel de cada substância mediando à informação estrogênica ao hipotálamo, estudos recentes demonstram que as retroalimentações positiva e negativa ao E2 são predominantemente sinalizadas pelos neurônios que contem KP. O positivo, por aqueles neurônios de KP localizados na POA e na parte caudal do núcleo arqueado (ARC), enquanto o feedback negativo é mediado por neurônios KP localizados no ARC anterior e médio (ESTRADA et al., 2006; CLARKE, 2011).

Além dos mecanismos citados anteriormente, existem evidencias de que a ação do E2 na liberação de GnRH possa ser modulada pelas células da Glia (HERBISON, 2006). As células da Glia fornecem aos neurônios suporte físico, metabólico, sintetizam diversos fatores de crescimento e estimulam o estabelecimento de diferentes sinapses axosomáticas em neurônios específicos (GALBIATI; SAREDI; MELCANGI, 2003). Os astrócitos expressão receptores de E2 tanto para a ação na via clássica e não-clássica (GALBIATI; MARTINI; MELCANGI, 2003; GARCIA-SEGURA; MCCARTHY, 2004). Dessa forma o E2 pode atuar nas células da Glia alterando a íntima relação dessas células com os neurônios de GnRH ou mesmo alterando a secreção de outros fatores de crescimento, como por exemplo, os dos

sistemas IGF ou TGF, que podem modular a secreção de GnRH (GALBIATI; MARTINI; MELCANGI, 2003; GARCIA-SEGURA; LORENZ; DONCARLOS, 2008).

Por fim as células endoteliais podem atuar na modulação dos receptores de GnRH. Em ratos, o óxido nítrico das células epiteliais localizadas na eminência média promovem significativa modulação nos neurônios de GnRH. Tais células também expressão receptores de E2, podendo atuar na modulação do E2 sobre os neurônios de GnRH (HERBISON, 2006).

2.3.2 Papel do estradiol na fisiologia do estro

A palavra estro é derivada de relatos antigos de pessoas que trabalhavam com rebanhos bovinos, no entanto, não está precisamente relacionada ao acasalamento ou aceitação de monta. Ela vem da palavra grega "oistros", mosca ("gadfly") da família Oestridae, cujo zumbido durante os meses do verão causa hiperatividade nas vacas (ROELOFS et al., 2010).

O E2 não tem apenas efeito local sobre o desenvolvimento folicular, mas também tem papel sistêmico por estímulos positivos no hipotálamo e na hipófise (FORDE et al., 2011). Após o processo de luteólise, a P4 circulante alcança níveis basais, possibilitando um aumento da pulsatilidade de LH, com consequente aumento do crescimento folicular e da produção de E2. Quando o E2 circulante atinge uma determinada concentração ("*a threshold*") são desencadeadas duas principais vias de sinalização em áreas específicas do cérebro da fêmea. Na primeira, o E2 estimula centros comportamentais específicos no cérebro bovino, provocando a resposta comportamental, ou seja, o estro (MOENTER; CARATY; KARSCH, 1990). Já na segunda, o E2 estimula o desencadeamento do pico pré-ovulatório de GnRH/LH. O pico de LH (ou onda pré-ovulatória) é resultado do aumento da amplitude e da frequência de liberação dessa gonadotrofina, suficiente para estimular a maturação final do folículo dominante e a ovulação (FORDE et al., 2011). O intervalo entre o início do estro e a ovulação é de aproximadamente 28 horas (WALKER; NEBEL; MCGILLIARD, 1996).

Como comentado anteriormente, o E2 é o sinal primário para o cérebro induzir a expressão do estro. Tal comportamento tem duração variável, e sua intensidade e duração esta relacionada à concentração circulante de E2 e P4 (ALLRICH, 1994; LYIMO et al., 2000). Em

vacas leiteiras, a duração média do estro é de 8,1 a 14 h (FORDE et al., 2011), no entanto, esta duração pode ser severamente reduzida conforme o aumento da produção de leite (14,7 e 2,8 h em vacas produzindo 25 ou 55 kg de leite, respectivamente) (LOPEZ; SATTER; WILTBANK, 2004). Em fêmeas zebuínas, a duração do estro é menor do que a observada em fêmeas taurinas (BÓ; BARUSELLI; MARTINEZ, 2003). A duração média do estro em fêmeas zebuínas é de cerca de 10 horas (PINHEIRO et al., 1998). Em um estudo utilizando o sistema computadorizado de radiotelemetria para detectar o estro (Heat-Watch) a média ± desvio padrão da duração do estro foi de 10,4 ± 5,7 h (MEMBRIVE, 2000). Além disso, fêmeas zebuínas tendem a apresentar sinais de comportamento de estro durante a noite (PINHEIRO et al., 1998), sendo que grande parte das fêmeas zebuínas começou e terminou o estro durante o mesmo período à noite.

2.3.3 Papel do estradiol no pico préovulatório de GnRH

Para que ocorra a ovulação é necessário o aumento das concentrações circulantes de E2 durante a fase de desenvolvimento final do folículo dominante. A partir disso, é desencadeada uma cascata de eventos neuroendócrinos similar ao estímulo pulsátil (item 2.3.1) (GOODMAN, 1993). Na hipófise, o E2 age em diferentes gonadotrofos, induzindo a síntese de receptores de GnRH (GREGG; NETT, 1989), enquanto no hipotálamo, a ação do E2 está relacionada ao estímulo e liberação de GnRH (HAMERNIK et al., 1995). Em ovelhas, o efeito estimulatório do E2 na liberação de GnRH e LH são potencializados após a exposição prévia a P4 (CARATY; SKINNER, 1999).

Em um modelo de ovelhas ovariectomizadas simulando a fase folicular e luteal o tratamento com E2 promove uma rápida diminuição inicial na pulsatilidade de GnRH, seguido de pico entre 15 a 20 horas após (EVANS et al., 1995a, 1995b). Em roedores, a região área anteroventralperiventricular (AVPV) é a região relacionada à ação do E2 na indução do pico de GnRH (HERBISON, 1998). Nessa região existe grande quantidade de ER-α e ER-β, sugerindo a modulação neuronal local sobre os neurônios de GnRH (HERBISON, 2006). Além disso, outros neurônios da AVPV (que não os que produzem GnRH) apresentam ER-α, influenciando a secreção de GnRH. Dentre eles, podem-se citar os neurônios produtores de

glutamato, GABA, dinorfina, neurokinina B, KP e neurotensina (SMITH; JENNES, 2001; HERBISON, 2006; KRSMANOVIC et al., 2009). Nesse sentido, um estímulo nos neurônios liberadores de glutamato é necessário para indução do pico de GnRH. A redução da inibição GABAégica é necessária para a secreção do pico de GnRH. Por fim, a neurotensina aumenta a amplitude dos picos de GnRH, sendo que os neurônios secretores de neurotensina são estimulados pelo E2 via ER-α (HERBISON, 2006),

Em ovelhas, as regiões em que o estrógeno atua para a indução do pico pré ovulatório de GnRH são a ventromedial, POA e ARC (HERBISON, 2006). No entanto, independentemente da região estimulada pelo E2, a ação estimulatória do estrógeno sobre secreção de GnRH apresenta um padrão de estímulo transsináptico (HERBISON, 2006). Dessa forma, o estímulo do E2 para o pico pré-ovulatório de GnRH ocorre pela regulação gênica da expressão de ER-α nos neurônios, localizados na região ventromedial do hipotálamo, que projetam seus neurônios até os neurônios de GnRH. Portanto, de maneira transsináptica, os neurônios de GnRH são estimulados, aumentando sua atividade secretória tanto da forma de produção pulsátil quanto na forma de liberação contínua. Esses padrões de produção e liberação alterado promovem a indução do pico pré-ovulatório de GnRH (HERBISON, 2006).

Por fim, o neurônios secretores de GnRH recebem estímulo nos dendritos e corpos celulares localizados na POA. Este GnRH é ventrocaudalmente transportado por seu axônio neuronal e liberado nos capilares do plexo primário do sistema porta da eminência média. Posteriormente, este decapeptídeo é transportado até o plexo secundário do sistema porta na adeno-hipófise. Neste ponto o GnRH é liberado no meio extracelular ligando-se a seus receptores de membrana nos gonadotrofos hipofisários, estimulando a síntese/liberação de gonadotrofinas.. Importante salientar, os gonadotrofos liberam LH e FSH de forma basal, independente do estímulo de GnRH; porém, a liberação pulsátil de LH é dependente dos pulsos de GnRH (PAWSON; MCNEILLY, 2005). O E2 influencia a síntese de RNAm responsável pela produção tanto de FSH quanto de LH. Em células da hipófise de ratas, o E2 estimula a transcrição do gene para LHβ e a síntese e o acúmulo de LH. Nas células da hipófise de ovelhas, o E2 pode suprimir a taxa de transcrição e a atividade do gene promotor da atividade do FSH (HERBISON, 2006). Além disso, em culturas de células da hipófise, o E2 aumenta o número de receptores de GnRH (LAWS; WEBSTER; MILLER, 1990).

2.3.4 Papel do estradiol no ambiente uterino

O início do estro é associado ao aumento das concentrações circulantes de E2 (ALLRICH, 1994). As concentrações de E2 no momento da inseminação podem influenciar a taxa de fertilização devido a mudanças no ambiente uterino (HAWK, 1983, 1987). Após o início do estro, o ambiente uterino é alterado de forma a facilitar e aumentar a motilidade e a longevidade dos espermatozoides (ACOTT; CARR, 1984; HAWK, 1987; JONES; BAVISTER, 2000).

O estrógeno também apresenta receptores no endométrio. Como citado anteriormente, há dois subtipos de receptores de E2 (α e β) no endométrio (ROSENFELD; ROBERTS; LUBAHN, 2001). Assim como para as atividades hipotalâmico-hipofisárias, o subtipo α é o mais importante na regulação das atividades uterinas (MURAMATSU; INOUE, 2000). A expressão dos receptores de E2 no útero apresenta alterações temporais e espaciais ao longo do ciclo estral (ROBINSON et al., 2001). A expressão de tais receptores no útero é diretamente proporcional às concentrações circulantes de E2 e inversamente proporcional às concentrações circulantes de P4, estando, portanto, mais expressos durante o pró-estro e estro do que durante a fase luteínica (ROBINSON et al., 2001; MARTIN et al., 2008). Além disso, elevadas concentrações de E2 durante o pró-estro, resultam na redução da concentração endometrial dos receptores de ocitocina e da secreção de $PGF_{2\alpha}$ após desafio com ocitocina (LAMMING; MANN, 1995; MANN; LAMMING, 1995).

Elevadas concentrações pré-ovulatórias de E2 causam aumento no peso uterino e na síntese proteica no útero de ovelhas (JOHNSON; REDMER; REYNOLDS, 1997a, b). O E2 inicialmente induz hiperplasia e, em seguida, hipertrofia do epitélio glandular, assim como aumento das organelas citoplasmáticas sintetizadoras de proteínas, aumento do complexo de Golgi, aumento do retículo endoplasmático rugoso e dispersão da cromatina no núcleo das células, indicativos de elevação da síntese proteica (JOHNSON; REDMER; REYNOLDS, 1997a, b; BAZER et al., 2009).

Em vacas de corte durante o período pós-parto, concentrações elevadas de E2 durante o proestro, induzem mudanças durante o ciclo estral subsequente na expressão de RNA mensageiro para receptores de E2 e P4 no útero (ERS1 e PGR, respectivamente), além de

receptores de ocitocina, e de diversas proteínas tais como ciclooxigenase-2 subunidade beta A inibina e SERPINA 14. Tais mudanças são reduzidas quando as fêmeas apresentam menores concentrações de E2 durante o proestro (MOORE, 1985; POHLER et al., 2012). Além disso, novilhas de corte expostas a um maior tempo ao E2 durante o pró-estro apresentam diferenças significativas no padrão de expressão de receptores e outras proteínas associadas a receptividade uterina à gestação do que novilhas expostas a um reduzido período ao E2 (BRIDGES et al., 2012). Dessa forma, o E2 parece regular a expressão de diversos genes envolvidos com a remodelação da matrix extracelular, a secreção de glicoproteinas e a diferenciação temporal da biologia uterina (BAUERSACHS et al., 2005; SHIMIZU et al., 2010). Portanto, o ambiente endócrino pré-ovulatório podem regular a expressão gênica do endométrio, e consequentemente, a receptividade do micro-ambiente uterino ao concepto durante o período de gestação inicial, alterando a sobrevivência embrionária.

2.3.5 Importância do proestro sobre a fertilidade da fêmea

A duração do proestro (intervalo entre a queda da P4 e pico de LH) pode alterar o tamanho do folículo ovulatório (quantidade de estrógeno durante o proestro), a função luteínica subsequente, e as taxas de gestação em vacas lactantes (VASCONCELOS et al., 2001; PETERS; PURSLEY, 2003). Além disso, vacas com proestro reduzido podem aumentar a ocorrência de ciclos curtos devido a menor exposição ao E2 antes da ovulação (PERRY et al., 2005a, 2007; MUSSARD et al., 2007). Perry et al. (2005), obtiveram menor taxa de concepção quando as fêmeas apresentavam folículos menores que 11mm no momento da indução da ovulação com GnRH. Mussard et al. (2007) demonstraram que a redução do folículo ovulatório também reduz a função luteínica e a fertilidade do ciclo subsequente. Folículos maiores apresentam maior capacidade de produção de esteroides, sendo que a produção de E2 durante o proestro tem efeito positivo sobre a fase luteínica subsequente e sobre a sobrevivência embrionária (MANN; LAMMING, 2000; SANTOS et al., 2004). Portanto, além do aumento na taxa de ovulação, outros fatores como a produção de E2 endógeno, a competência de oócitos, o diâmetro do CL e da concentração de P4 no ciclo

estral subsequente também determinam os benefícios na fertilidade de fêmeas que ovulam folículos de tamanhos maiores.

Outro ponto interessante é que fêmeas que ovulam folículos menores apresentam menor taxa de expressão de estro após o tratamento, podendo apresentar inadequada produção de estrógeno durante o proestro. Essa menor exposição ao E2 durante o proestro resulta em aumento da resposta do endométrio à ocitocina e maior liberação de $PGF_{2\alpha}$ no ciclo subsequente (LAMMING; MANN, 1995; MANN; LAMMING, 2000). Em fêmeas *Bos taurus*, a ocorrência do estro após tratamentos de sincronização é associada a maior taxa de ovulação, maior concentração de P4 no ciclo subsequente e maior taxa de concepção após IA (CERRI et al., 2004; HILLEGASS et al., 2008; PERRY; PERRY, 2008; FIELDS et al., 2012; POHLER et al.). Portanto, aumentar a taxa de expressão de estro em programas reprodutivos, pode melhorar a sobrevivência embrionária e a fertilidade das fêmeas, devido à maior exposição ao E2 durante o proestro, melhor preparo do útero para a fase luteínica subsequente e para reduzir a ocorrência de luteólise prematura (KIEBORZ-LOOS et al., 2003; CERRI et al., 2011).

2.4 USO DE SÊMEN SEXADO EM PROGRAMAS REPRODUTIVOS

Durante anos, os pesquisadores vêm buscando manipular o sexo da prole antes da concepção (GARNER; SEIDEL JR, 2008). Essa determinação do sexo em bovinocultura de corte e de leite pode ser um dos fatores determinantes para melhorar o desempenho produtivo e econômico da atividade. A definição do sexo anteriormente à concepção permite que a indústria pecuária produza melhor proporção entre machos e fêmeas, para obter vantagens sobre a influência do sexo na produção de carne e de leite, proporcionando práticas economicamente flexíveis de manejo ao produtor (DE VRIES et al., 2008; GARNER; SEIDEL JR, 2008; CHEBEL et al., 2010).

O sexagem do sêmen é uma biotecnologia já disponível comercialmente no Brasil e no mundo. A separação dos espermatozoides que carregam o cromossomo Y dos espermatozoides que carregam o cromossomo X é possível devido às diferenças no conteúdo do DNA dessas células espermáticas, sendo realizada por citometria de fluxo. Atualmente,

este é o método mais eficiente de separação dos espermatozoides X e Y em larga escala (GARNER; SEIDEL JR, 2008). Dessa forma o sêmen sexado tem sido aplicado em diversas biotecnologias, tais como, IA com detecção de estro, IATF ou produção *in vivo* e *in vitro* de embriões.

2.4.1 Histórico e metodologia para sexagem do sêmen

Na primeira metade do século XX, numerosas descobertas, incluindo a identificação dos cromossomos sexuais formam realizadas. Os gametas contêm metade dos cromossomos das células somáticas. Assim, dos 60 cromossomos presentes na célula somática de bovinos, o espermatozoide (haplóide) possui 29 cromossomos autossômicos, mais os cromossomo sexuais X nas fêmeas ou Y nos machos (GARNER; SEIDEL JR, 2008).

O conteúdo de DNA do espermatozoide pode ser determinado pelo uso de sondas fluorescentes, sendo o corante Hoechst 33342 o mais utilizado por apresentar menor toxicidade entre os corantes de DNA com potencial de penetração na membrana plasmática de células vivas (JOHNSON, 2000). Sua ação é ligar-se, seletivamente, a regiões ricas em DNA, permitindo a detecção de pequenas diferenças em seu conteúdo. Assim, o espermatozoide com cromossomo X recebe cerca de 4% mais corante vinculado ao seu DNA, do que o espermatozoide com cromossomo Y. Tal corante fluoresce quando exposto ao raio laser de comprimento de onda específico. A fluorescência é detectada e analisada pelo aparelho, fornecendo medida da quantidade de DNA da célula analisada (JOHNSON, 2000; GARNER; SEIDEL JR, 2008).

A eficácia da sexagem dos espermatozoides não depende somente das relativas diferenças na quantidade de DNA, mas também da capacidade de orientação precisa desses gametas pelo citômetro de fluxo (GARNER; SEIDEL JR, 2008). Para tanto, o processo de sexagem se inicia com a separação do fluxo em gotas, por um cristal piezoelétrico que vibra, formando cerca de 70.000 a 80.000 gotas por segundo. Cerca de um terço dessas gotículas contêm um espermatozoide, cerca de dois terços estão vazias e algumas gotas contêm dois ou mais espermatozoides. A gotícula que contém o espermatozoide com o cromossomo X recebe uma carga elétrica positiva. A gotícula que contém o espermatozoide com o cromossomo Y

recebe uma carga negativa. Se a gota não contém nenhum espermatozoide, espermatozoides danificados, ou espermatozoides indistinguíveis em relação ao conteúdo de DNA, nenhuma carga é acrescentada (SEIDEL JR, 2007).

As gotículas passam pelo aparelho a uma velocidade de cerca de 80 km por hora, e são submetidas a campos elétricos com direcionamento positivo e negativo. Dessa forma, as gotículas positivamente carregadas e contendo o espermatozoide com cromossomo X, avançam em direção ao campo negativo e as gotículas com os espermatozoides com cromossomo Y, negativamente carregados, avançam em direção ao campo positivo. Aquelas com nenhuma carga seguem em uma terceira direção. Deste modo, três fluxos de gotículas são produzidos e direcionados para diferentes tubos. Ao final do processamento, em média, obtém-se 20% de espermatozoides com cromossomo X, 20% de espermatozoides com cromossomo Y e 60% danificados ou não sexados por alguma razão (SEIDEL JR, 2007).

2.4.2 Principais limitações para o uso do sêmen sexado

O método de sexagem pelo citômetro de fluxo apresenta limitações, pois os espermatozoides são sexados um de cada vez, tornando o processo lento (GARNER; SEIDEL JR, 2008). Atualmente, a produção de uma palheta de sêmen sexado bovino demora cerca de 9 minutos, que se traduz em aproximadamente sete palhetas por hora na concentração de 2 x 10^6 espermatozoides por dose (JOHNSON, 2000; GARNER; SEIDEL JR, 2008). A velocidade de separação dos espermatozoides X e Y é relativamente lenta (aproximadamente 300.000 a 400.000 células por minuto para cada sexo). Desta forma, o número de células espermáticas comercialmente utilizadas é de 2,1 x 10^6 células/dose de sêmen sexado. Nesse sentido, muitos estudos foram realizados para estabelecer a melhor concentração por palheta considerando os aspectos comerciais. Recentemente, os efeitos das doses de 2,1 vs. 10 milhões de espermatozóides por palheta, tanto no sêmen convencional quanto sexado sobre as taxas de concepção de novilhas Holandesas (n = 9.172) foram avaliadas (DEJARNETTE et al., 2011). Os autores observaram que houve aumento da taxa de concepção conforme aumento na concentração de espermatozoides por dose, no entanto o sêmen sexado promoveu menor taxa de concepção do que o sêmen convencional, independente da dose utilizada.

Além da reduzida concentração, a longevidade dos espermatozóides (MOCÉ; GRAHAM; SCHENK, 2006) e sua criotolerância podem ser alteradas pelo processo de sexagem (HOLLINSHEAD et al., 2003). Esses danos ao sêmen ocorrem devido ao estresse químico e físico aos quais os espermatozoides são expostos durante a sexagem (SEIDEL JR, 2007). A avaliação da viabilidade espermática revelou que alguns danos mecânicos provocados nos espermatozoides levam a menor capacidade de fecundação após a IA (*in vivo*) ou fecundação *in vitro* (GARNER; SEIDEL JR, 2008), com menores taxas de desenvolvimento embrionário (SCHENK; SUH; SEIDEL, 2006; SOARES et al., 2011). Além disso, este processo pode levar à redução da vida útil do sêmen sexado comparado ao convencional (MAXWELL et al., 2004), podendo causar mudanças na membrana do espermatozoide, pré-capacitação e um número reduzido de espermatozoides viáveis na IA (VAZQUEZ et al., 2003; SCHENK et al., 2009).

2.4.3 Uso de sêmen sexado em programas de IATF

Avanços no processo de sexagem de espermatozóides por citometria de fluxo permitiram sua incorporação no manejo reprodutivo de fazendas comerciais. No entanto, apesar do aumento do uso de sêmen sexado, a concepção ainda é menor do que quando se utiliza sêmen convencional (DEJARNETTE; NEBEL; MARSHALL, 2009).

Como descrito anteriormente, o sêmen sexado apresenta menor período de viabilidade intra-uterina do que o sêmen não sexado (MAXWELL et al., 2004; GOSÁLVEZ et al., 2011). Dessa forma uma possível estratégia para aumentar as taxas de concepção pós IA poderia ser o atraso do momento da IA em relação ao início do estro (ou seja, próximo à ovulação). Estudos demonstram que o atraso na IA (mais de 12h após o início do estro) tende a resultar em melhores taxas de fecundação, porém diminui a qualidade embrionária quando comparada com inseminações realizadas próximas ao início do estro (DALTON et al., 2001; SAACKE, 2008). Portanto, a identificação do melhor momento para a realização da IATF utilizando sêmen sexado pode representar aumento da fertilidade (SÁ FILHO et al., 2010b).

Atualmente, são raras as publicações que tentam relacionar taxas de concepção após o uso de sêmen sexado em vacas de corte e de leite inseminadas em tempo fixo. Dessa forma,

uma das possibilidades de diminuir a variação do momento da ovulação é o emprego de técnicas de sincronização, o que poderia colaborar na eficiência de programas de inseminação artificial com sêmen sexado.

Em programas de IATF que empregam a associação entre estradiol e P4, utilizando benzoato de estradiol como indutor de ovulação, as mesmas ocorrem em médias 72 horas após a retirada do dispositivo de P4 (SALES et al., 2012). Nesse sentido, diversos experimentos foram realizados e demonstraram que o atraso de 6 horas no momento da realização da IATF (54 h vs. 60 h) em relação à retirada da fonte de P4 melhora os resultados de IATF utilizando sêmen sexado (SALES et al., 2011b) tanto em novilhas de leite como em vacas de corte.

3 CAPÍTULO I - INFLUÊNCIA DO DIÂMETRO FOLICULAR NO MOMENTO DA IATF SOBRE A RESPOSTA OVARIANA E A TAXA DE CONCEPÇÃO APÓS PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO EM FÊMEAS ZEBUÍNAS

3.1 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

O tamanho do folículo ovulatório esta diretamente relacionado à sua capacidade ovulátoria. Além disso, existe variação do diâmetro folicular entre as fêmeas submetidas a diferentes protocolos de sincronização da ovulação para IATF. Dessa forma, é justificável a associação positiva entre o diâmetro folicular ao final do protocolo de sincronização da ovulação e a resposta individual das fêmeas. Para tanto, esse estudo testou a hipótese de que fêmeas zebuínas de corte que apresentam folículo de maior diâmetro no momento da inseminação têm maiores taxas de ovulação e de concepção após serem submetidas à diferentes protocolos de sincronização da ovulação para IATF.

3.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar as associações entre o diâmetro folicular ao final do protocolo de sincronização, ou seja, no momento da retirada da fonte de progesterona e no momento da inseminação, e a resposta ovariana e a taxa de concepção de vacas zebuínas lactantes após serem submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação para IATF.

3.2.1 Objetivos específicos

- Verificar a taxa de ovulação de acordo com o diâmetro folicular no momento da IATF em vacas zebuínas lactantes submetidas a diferentes protocolos de sincronização de ovulação;
- Verificar a taxa de concepção de vacas zebuínas lactantes, de acordo com o diâmetro folicular no momento da inseminação;
- Verificar a taxa de concepção das vacas zebuínas lactantes, de acordo com o diâmetro folicular no momento da inseminação, considerando somente aquelas vacas que ovularam após o protocolo de sincronização da ovulação.

3.3 RESPOSTA OVARIANA E TAXA DE CONCEPÇÃO DE ACORDO COM O DIÂMETRO FOLICULAR NO MOMENTO DA IATF DE VACAS ZEBUÍNAS SUBMETIDAS A DIFERENTES PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO À BASE DE ESTRADIOL E PROGESTERONA/PROGESTÁGENO.

3.3.1 Material e métodos

3.3.1.1 Animais e local do experimento

Neste estudo, foram utilizadas 2388 vacas zebuínas lactantes [Nelore (*Bos indicus*; n = 1869) e cruzadas (*Bos taurus x indicus*; n = 519)] oriundas de 10 fazendas comerciais dos estados do Mato Grosso do Sul e Paraná. As vacas foram mantidas sob pastejo em pastagem de *Brachiaria brizantha* ou de *Brachiaria decumbens*, tendo livre acesso à água e suplementação mineral.

Os dados foram coletados nas estações reprodutivas dos anos de 2006/2007 e de 2007/2008 entre os meses de Outubro e Fevereiro, e informações como raça da vaca e do touro, ordem de partos, escore de condição corporal (ECC), mês de parição, mês no qual as fêmeas foram inseminadas e o protocolo de sincronização utilizado foram colhidas de cada fêmea individualmente.

O ECC de cada fêmea foi determinado no primeiro dia do protocolo de sincronização da ovulação usando a escala de 1 a 5, onde 1 corresponde a um animal caquético e 5 corresponde a um animal obeso (AYRES et al., 2009). Para a análise das associações entre o ECC, as respostas ovarianas e a taxa de concepção, foi utilizada a seguinte classificação: baixo ECC (≤ 2, 50), moderado ECC (entre 2,75 e 3,25), e bom ECC (≥ 3,50).

3.3.1.2 Manejo reprodutivo e tratamentos de sincronização

Após o parto, as vacas lactantes foram distribuídas em lotes de acordo com o mês de parição. As vacas tiveram a ovulação sincronizada após o uso de protocolos de sincronização da ovulação à base de estradiol (E2) e progesterona (P4).

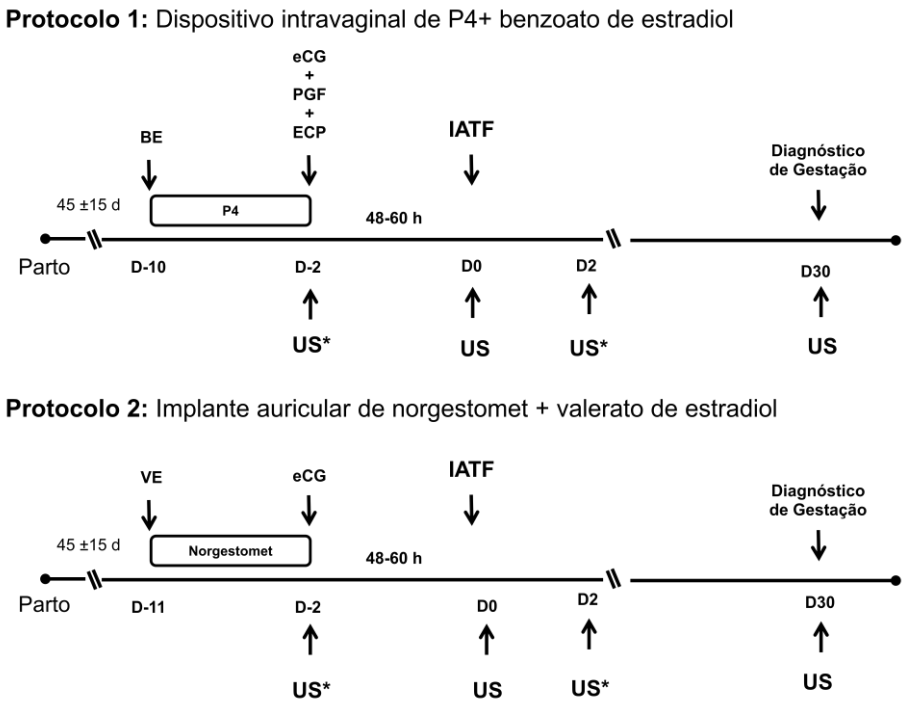
No início do protocolo as vacas apresentavam entre 30 e 60 dias pós-parto. As fêmeas receberam um de dois protocolos de sincronização da ovulação. O primeiro protocolo de sincronização, consistiu na inserção de um implante auricular contendo 3 mg de norgestomet mais a administração intramuscular de 5,0 mg de valerato de estradiol (VE) associado a 3,0 mg de norgestomet injetável (Crestar®, Intervet-Schering Plough, Boxmeer, Países Baixos). O segundo protocolo, consistiu na inserção de um dispositivo intravaginal de P4 (CIDR®, Pfizer Saúde Animal, São Paulo, Brasil) novos e reutilizados e mais a administração de 2,0 mg intramuscular de benzoato de estradiol (BE; Estrogin®, Farmavet, São Paulo, Brasil) no início do tratamento. Em ambos os protocolos de sincronização, as vacas receberam a administração intramuscular de 300 UI de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG, Folligon®, Intervet-Schering Plough, Boxmeer) na retirada do dispositivo intravaginal/implante auricular. As vacas tratadas com CIDR mais BE do primeiro protocolo receberam tratamento adicional com 0,6 mg de CE (ECP®, Pfizer Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e 25 mg de dinoprost (Lutalyse®, Pfizer Saúde Animal, São Paulo, Brasil) via intramuscular, no momento da retirada do dispositivo intravaginal de P4. O período de permanência do dispositivo intravaginal ou do implante auricular foi de 8 ou 9 dias, respectivamente.

As vacas foram inseminadas entre 48 e 60 horas após a remoção do dispositivo intravaginal/implante auricular. As informações sobre o protocolo empregado em cada fêmea foram individualmente registradas (Figura 2).

3.3.1.3 Ultrassonografia ovariana e categorização dos folículos

Os ovários foram examinados com auxílio de um aparelho de ultrassom munido de sonda transretal de 5 MHz (Aloka-SSD 500, Tokyo, Japan). Foram realizados exames no momento da retirada do dispositivo intravaginal/implante auricular (n = 813), no momento da IATF (n = 2.388) e 48 horas após a IATF (n = 813). O diâmetro do maior folículo (FD) presente em cada momento descrito anteriormente foi identificado, mensurado e categorizado em < 7,5 mm, 7,5 a 11,0 mm, 11,1 a 14,4 mm, ou > 14,4 mm (média ± um ou dois desvios padrões acima e abaixo) no momento da IATF. A diferença entre o diâmetro do FD na IATF e o FD no momento da retirada do dispositivo intravaginal/implante auricular foi calculada, sendo que os folículos foram posteriormente classificados como: folículo em desenvolvimento (diferença > 0) ou folículo em regressão (diferença < 0). A ovulação foi definida como a ausência de um FD (≥ 8,0 mm), previamente detectado em dois exames ultrassonográficos consecutivos. A ovulação foi considerada como ocorrida antes da IATF (entre a retirada do dispositivo /implante auricular e a IATF), depois da IATF (48 horas após a IATF) ou ausente (presença do mesmo FD nos três exames consecutivos).

Figura 2 - Diagrama esquemático dos protocolos utilizados para sincronização da ovulação e IATF em vacas zebuínas lactantes no experimento



BE = 2 mg benzoato de estradiol
VE = 5 mg de valerato de estradiol mais 3 mg de norgestomet injetável

eCG= 300 UI gonadotrofina coriônica equina
ECP = 0,6 mg de cipionato de estradiol
P4 = dispositivo intravaginal de P4 (1,9 g de P4)
Norgestomet = implante auricular contendo Norgestomet
IATF = inseminação artificial em tempo fixo
US = ultrassonografia transretal
US* = somente em uma parcela das fêmeas (avaliação da taxa de ovulação)

3.3.1.4 Diagnóstico de gestação

Todas as vacas foram examinadas por ultrassonografica transretal 30 dias após a IATF. As fêmeas que apresentavam embrião vivo foram consideradas como gestantes. A taxa de concepção foi calculada pela proporção de fêmeas gestantes 30 dias após a IATF dividida pelo total de vacas inseminadas.

3.3.1.5 Análise estatística

Informações individuais das fêmeas de cada uma das fazendas foram dispostas em uma única planilha para a análise estatística. Os dados foram analisados por regressão logística multivariada usando o procedimento LOGISTIC do SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Para as análises, foi utilizado o modelo "*backward stepwise regression*", e as variáveis explanatórias foram sequencialmente removidas do modelo estatístico seguindo o critério de Wald se $P > 0,10$. Valores de $P < 0,05$ foram considerados como significantes.

Para a análise da taxa de concepção 30 dias após a IATF de todas as vacas (n = 2388) foi incluído no modelo inicial os efeitos de fazenda (1 to 10), raça (Nelore ou Cruzada), raça do touro (taurino ou zebuíno), ordem de partos (pluríparas ou primíparas), categoria de ECC (baixo, moderado ou alto), intervalo entre retirada da fonte exógena de P4 e a IATF (48-53 ou 54-60 horas), e o tipo do protocolo de sincronização utilizado para a sincronização da ovulação (CIDR® ou Crestar®), e a categoria do FD (< 7,5 mm, 7,5 to 11,0 mm, 11,1 to 14,4 mm, ou > 14,4 mm) na IATF. No modelo final para análise da concepção aos 30 dias foram mantidos os efeitos de fazenda, categoria do ECC, e categoria do FD.

O efeito das categorias do diâmetro do maior folículo no momento da IATF e sobre a taxa de ovulação e concepção somente nas vacas que ovularam após o protocolo se sincronização foram analisadas pelo PROC GLIMMIX do SAS. A taxa de ovulação antes da IATF foi analisada pelo teste de Qui-quadrado. Além disso, as associações entre o diâmetro do maior folículo na IATF e as taxas de ovulação, concepção e concepção somente nas fêmeas ovuladas foram determinadas, sendo que curvas de regressão logística foram obtidas utilizando os coeficientes gerados pelo artifício "interactive data analyses" do programa estatístico SAS e da fórmula $y = \exp(\alpha \times x + b) / [1 + \exp(\alpha \times x + b)]$, onde: y = probabilidade de sucesso de concepção; exp = exponencial, α = inclinação da equação logística; b = intercepto da equação logística; x = diâmetro do maior folículo no da IATF em milímetros.

Os valores relacionados ao diâmetro folicular serão descritos na forma de média observada e erro padrão da média.

3.3.2 Resultados

A média do diâmetro folicular no momento da IATF foi de 11,1 ± 0,3 mm. A distribuição das vacas de acordo com a classe de FD no dia da IATF foi de 12,4% < 7,5 mm, 29,5% entre 7,5 e 11 mm, 46,8% entre 11,1 e 14,4 mm, e 11,3% para >14,4 mm de diâmetro.

A taxa de concepção geral após a IATF foi de 51,4%. A raça da vaca, ordem de partos, raça do touro, intervalo entre a retirada do dispositivo e o tipo do protocolo não foram associados (P > 0,10) com a taxa de concepção. As vacas com maior ECC no primeiro dia do protocolo de sincronização apresentaram maior taxa de concepção após a IATF (Tabela 1). As fêmeas que apresentavam folículo de maior diâmetro no momento da IATF tiveram maior risco se tornarem gestante após IATF (Figura 3). Além disso, associação similar foi observada quando somente as vacas que ovularam após o protocolo de sincronização da ovulação foram avaliadas (Figura 4). Entretanto, o folículo ovulatório deve apresentar no mínimo 11,1 mm de diâmetro para alcançar o máximo de concepção 30 dias após a IATF (Tabela 2). Vacas categorizadas por apresentar folículo ovulatório entre 11,1 e 14,4 mm apresentaram taxa de concepção similar daquelas vacas que apresentaram folículo >14,4 mm, mas ambas as

categorias foram melhores (P = 0,004) do que aquelas fêmeas que apresentaram FD < 11,1 mm. Por fim, vacas que apresentaram FD em crescimento entre a retirada da fonte de P4 e a IATF tiveram maior taxa de concepção do que aquelas fêmeas que tiveram FD classificados como em regressão (Tabela 1).

A taxa de ovulação geral após o protocolo de sincronização foi de 84.9% (Tabela 2). O diâmetro do FD no momento da inseminação apresentou associação positiva (P < 0.001) com a taxa de ovulação. A taxa de ovulação foi maior na vacas que apresentavam folículos de maior tamanho no momento da IATF, e tal taxa de ovulação alcançou um platô após as fêmeas apresentarem folículo entre 11,5 e 12,5 mm (Figura 5). As vacas categorizadas como tendo FD < 7,5 mm no momento da IATF apresentaram maior proporção (79.4%) de ovulação antes da inseminação (Tabela 2) em relação às outras categorias.

Tabela 1- Fatores associados à taxa de concepção após IATF em vacas *Bos indicus* lactantes

Variável		Concepção, % (n/n)	Risco Ajustado (95% IC)[1]	Valor de P
Raça	Nelore	50,5 (944/1869)	Referência	0,50
	Cruzada	54,7 (284/519)	1,10 (0,84-1,43)	
Ordem de partos	Primíparas	51,1 (210/411)	Referência	0,91
	Pluríparas	51,5 (1018/1977)	1,02 (0,71 -1,48)	
Condição Corporal	< 2,75	48,9 (714/1460)[b]	Referência	0,03
	2,75 a 3,25	54,7 (353/645)[a]	1,36 (1,07 - 1,96)	
	> 3,25	56,4 (145/257)[a]	1,45 (1,11 - 1,68)	
Diâmetro folicular no momento da IATF	< 7,5 mm	27,5 (81/295)[c]	Referência	< 0,0001
	7,5 a 11 mm	46,6 (328/705)[b]	2,47 (1,79 - 3,29)	
	11,1 a 14,4 mm	57,9 (647/1118)[a]	3,94 (2,94 - 5,28)	
	> 14,4 mm	63,3 (171/270)[a]	4,90 (3,39 - 7,07)	
Mudança do foliculo[2]	Regressão	38,5 (35/91)	Referência	0,04
	Crescimento	49,7 (370/745)	1,89 (1,02 - 3,33)	

[1] IC = intervalo de confiança; [2] Mudança do diâmetro folicular entre a retirada do dispositivo de P4 e a IATF.

Figura 3 - Probabilidade de concepção após IATF em vacas *Bos indicus* (n = 2388) de acordo com o tamanho do maior folículo no momento da IATF [Probabilidade de concepção após IATF = exp (-1,3282 + 0,1256* Diâmetro folicular / 1+exp (-1,3282+0,1256* Diâmetro folicular); P < 0,0001)]

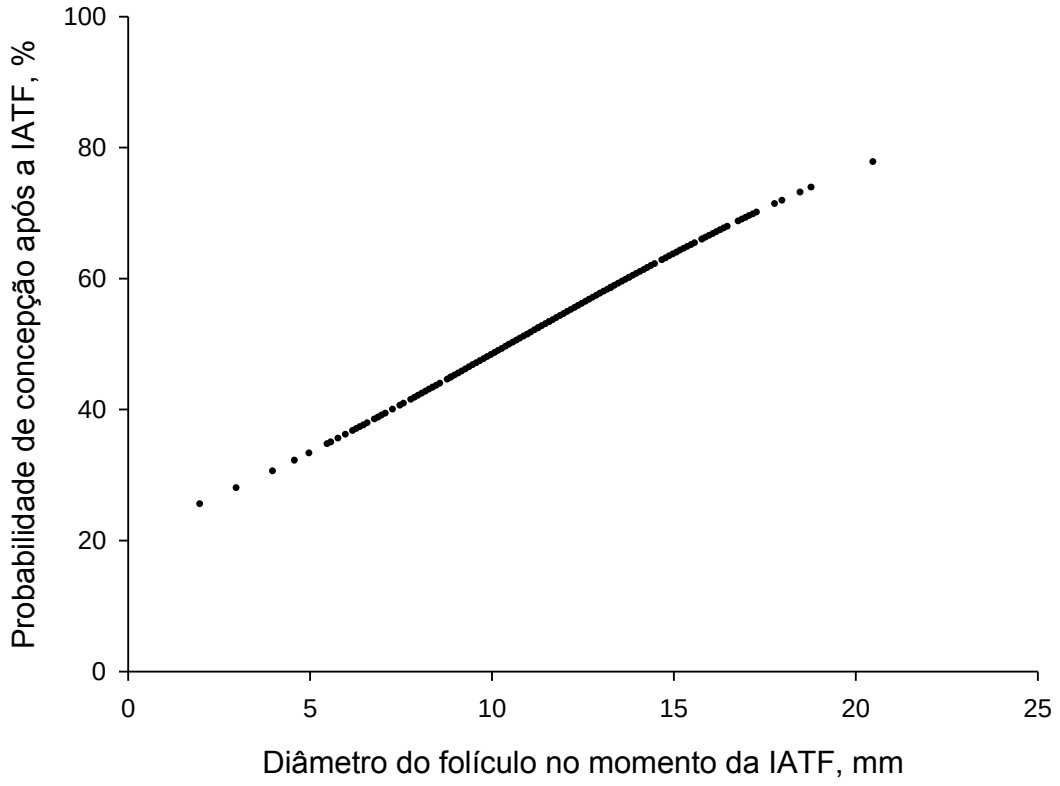


Figura 4 - Probabilidade de concepção em vacas zebuínas (n = 690) que ovularam após protocolo de sincronização da ovulação de acordo com o tamanho do maior folículo no momento da IATF [Probabilidade de concepção nas ovuladas = exp (-1,3282+0,1256*Diâmetro folicular na IATF / 1 + exp (-1,3282+0,1256*Diâmetro folicular na IATF); P < 0,0001)]

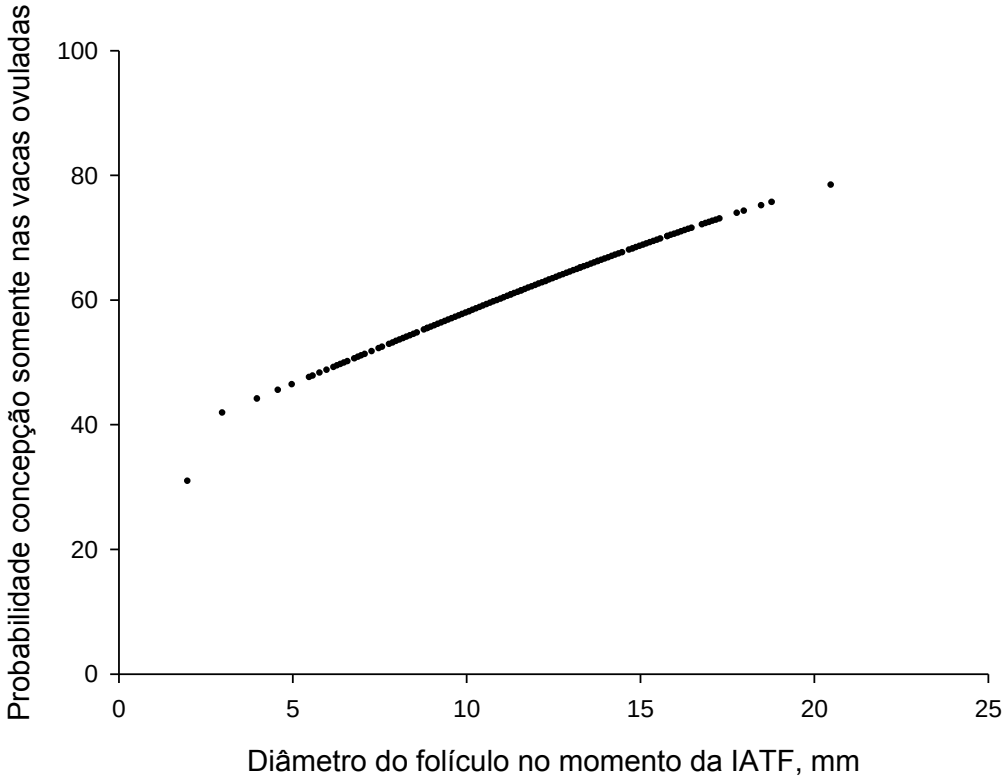


Figura 5 - Probabilidade de ovulação após o protocolo de sincronização para IATF em vacas Bos indicus (n = 813) de acordo com o tamanho do maior folículo no momento da IATF [Probabilidade de ovulação = exp (-1,5536+0,3201* Diâmetro folicular na IATF / 1 + exp (-1,5536+0,3201* Diâmetro folicular na IATF); P < 0,0001)]

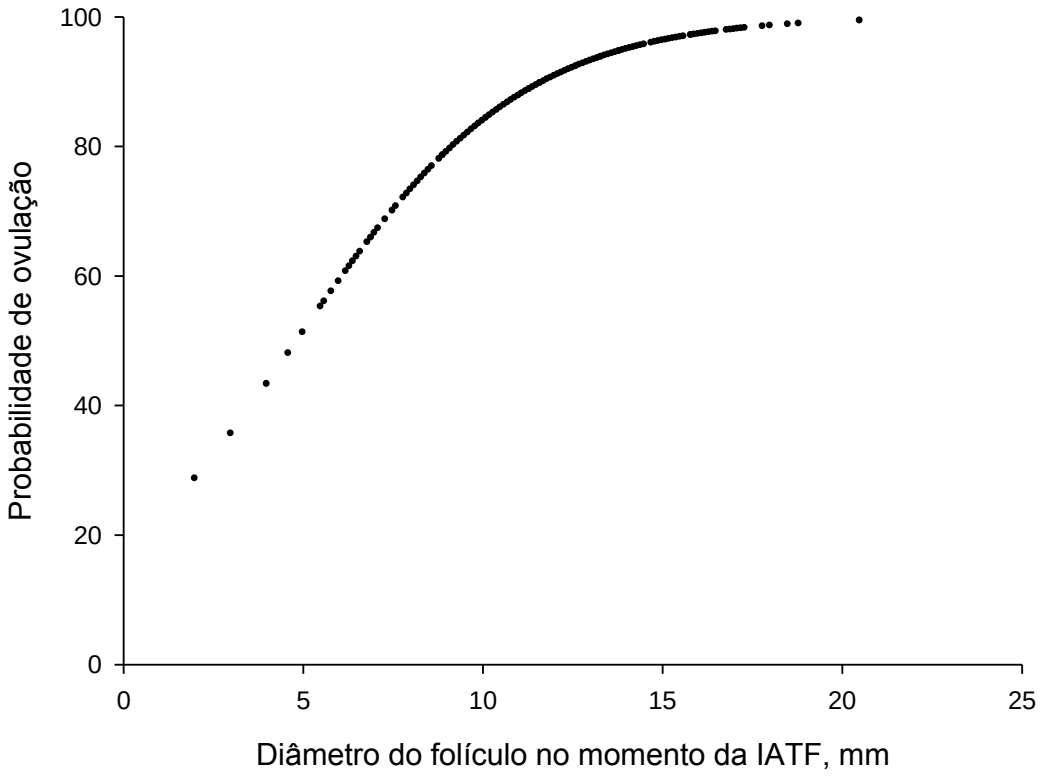


Tabela 2 - Associação entre diâmetro do maior folículo no momento da IATF e as taxas de ovulação e de concepção das vacas que ovularam após o protocolo de sincronização.

	Diâmetro do maior folículo na IATF, mm				
Variáveis	**< 7,5**	**7,5 a 11,0**	**11,1 a 14,4**	**> 14,4**	**P**
Taxa de ovulação, % (n/n)	42,5[c] (34/80)	73,9[b] (161/218)	95,8[a] (407/425)	97,8[a] (88/90)	< 0,001
Ovulação antes da IATF, % (n/n)	79,4[a] (27/34)	0,6[b] (1/161)	0,0[b] (0/407)	0,0[b] (0/88)	< 0,001
Concepção somente nas vacas ovuladas, % (n/n)	32,4[b] (11/34)	50,3[b] (81/161)	60,0[a] (244/407)	68,2[a] (60/88)	0,004

3.4 DISCUSSÃO

Os programas de IATF têm sido aplicados com sucesso em bovinos taurinos e zebuínos. Tais programas proporcionam uma abordagem organizada para aperfeiçoar o uso da IA e melhorar a eficiência reprodutiva em bovinos (BÓ et al., 2007; SÁ FILHO et al., 2012). Vários fatores têm sido associados ao sucesso de tais programas reprodutivos em fêmeas *Bos taurus* (PERRY et al., 2005a, 2007; GALVÃO; SANTOS, 2008). Dentre eles o diâmetro do folículo no momento do segundo GnRH do protocolo a base de GnRH e $PGF_{2\alpha}$ tem influenciado a resposta ovulatória e a taxa de concepção de vacas de leite (GALVÃO; SANTOS, 2008), e novilhas (PERRY et al., 2007) ou vacas de corte (PERRY et al., 2005a).

Neste estudo a taxa de concepção média foi de 51,4%, semelhante ao observado por diversos outros autores que trabalharam com vacas zebuínas de corte lactantes (BÓ et al., 2007; MENEGHETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2009a). Esse resultado foi influenciado pelo ECC no início do protocolo de sincronização. A menor condição corporal no início da sincronização tem sido associada com menores índices reprodutivos em vacas *Bos indicus* (BÓ et al., 2007; MENEGHETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2009a). Dessa forma, a redução das perdas de peso no início da lactação e o melhor suporte nutricional durante os períodos pré e pós-parto com a finalidade de melhorar o ECC no início da estação reprodutiva devem ser metas importantes a serem buscadas com o objetivo de melhorar os índices reprodutivos nos programas de IATF.

A raça das vacas e a ordem de partos não foram associadas ao risco de concepção após a IATF. Normalmente, vacas primíparas mantidas em sistema de pastejo apresentam longos períodos de anestro pós-parto (WILTBANK, 1970) e menor taxa de concepção tanto após a IATF (SÁ FILHO et al., 2009a; SÁ FILHO et al., 2012) quanto ao término da estação reprodutiva (SÁ FILHO et al., 2012), em comparação com vacas pluríparas. No entanto, essa resposta não tem sido consistente em vacas Nelore (MENEGHETTI et al., 2009). Meneghetti et al. (2009) não relataram diferença na fertilidade de vacas primíparas e pluríparas da raça Nelore submetidas a programas de IATF. Além disso, em rebanhos de leite onde o suporte nutricional é adequado, fêmeas primíparas são associadas a maior risco de se tornarem gestantes à primeira inseminação e ao final da lactação quando comparadas às fêmeas pluríparas (SANTOS; RUTIGLIANO; SÁ FILHO, 2009).

Um aspecto importante que deve ser ressaltado, é que todas as vacas do presente estudo foram tratadas com eCG concomitantemente ao início do proestro, ou seja, no momento da remoção do dispositivo de P4/implante auricular e da administração de $PGF_{2\alpha}$. O tratamento com eCG fornece o suporte de gonadotrofina para o desenvolvimento folicular final e esse efeito positivo é especialmente benéfico quando tal fármaco é administrado em vacas com baixo escore de condição corporal (SOUZA et al., 2009), em anestro (BARUSELLI et al., 2004; SÁ FILHO et al., 2010a) ou em vacas primíparas (SMALL et al., 2009).

Outro fator que pode ter melhorado a fertilidade das fêmeas primíparas neste estudo foi o período pós-parto no qual as fêmeas foram submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação. Normalmente, o pico da produção de leite de vacas de corte *Bos taurus* ou *Bos indicus* é alcançado entre 8,8 a 11,1 semanas de lactação (JENKINS; FERRELL, 1992; OLIVEIRA et al., 2007), e vacas primíparas tendem a atingir o pico mais tarde do que vacas pluríparas. É possível que, a fertilidade das vacas possa ser melhorada quando os programas de sincronização para IATF são iniciados antes do período de maior exigência nutricional, ou seja, antes do pico de produção de leite. Isso pode ser particularmente importante em vacas primíparas em condições de pastejo, não só porque elas têm que manter a produção de leite para o aleitamento, mas também por apresentarem maiores necessidades nutricionais para suporte de seu crescimento. Por conseguinte, o intervalo entre o parto e o início do protocolo de IATF combinado com o suporte gonadotrófico para o crescimento final do folículo dominante, promovido pelo tratamento com eCG, podem ter melhorado a fertilidade das vacas primíparas, reduzindo as diferenças na taxa de concepção após IATF entre as categorias.

No presente estudo, as vacas que apresentavam folículo de maior tamanho no momento da IATF foram associadas a maiores taxas de ovulação e de concepção. Esses resultados concordam com outros trabalhos já realizados em fêmeas *Bos taurus* (VASCONCELOS et al., 1999; BURKE et al., 2001; VASCONCELOS et al., 2001; MUSSARD et al., 2007) e *Bos indicus* (MENEGHETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2009a). Além disso, em fêmeas zebuínas, a capacidade ovulatória é de 33%, 80%, e 90% em folículos de 7 a 8,4 mm, 8,5 a 10 mm, e >10 mm, respectivamente (GIMENES et al., 2008). Burke et al. (2001) relatam que a indução da ovulação de folículos pequenos e "imaturos" em vacas em anestro, leva a redução da taxa de ovulação, menor diâmetro do corpo lúteo formado e a reduzida concentração de P4 no ciclo subseqüente, quando comparado a vacas que ovularam folículos maiores e maduros.

Vasconcelos et al. (2001) relataram que a redução do diâmetro do folículo ovulatório pela aspiração folicular no meio do protocolo de sincronização da ovulação de vacas Holandesas, reduziu as concentrações de E2 no momento da indução da ovulação com GnRH, diminuiu também a concentração de P4 no diestro subsequente, bem como reduziu a taxa de concepção. Mussard et al. (2007) demonstraram que a ovulação prematura de um folículo dominante induzida pelo GnRH reduz o diâmetro do folículo ovulatório, diminui a função luteínica no ciclo subsequente e a fertilidade das fêmeas. Nos programas de sincronização da ovulação à base de GnRH e $PGF_{2\alpha}$, a indução da ovulação de folículos pequenos reduz a taxa de concepção e aumenta as perdas gestacionais (LAMB et al., 2001; PERRY et al., 2005a, 2007). Portanto, em programas de sincronização da ovulação, tanto à base de GnRH e $PGF_{2\alpha}$, quanto à base de E2 e P4, a taxa de concepção após IATF é melhorada quando as fêmeas apresentam um folículo de maior tamanho no momento da inseminação.

A maneira pela qual a presença de um folículo de maior tamanho no momento da IATF aumenta a taxa de concepção em fêmeas zebuínas poderia estar associada exclusivamente a maior taxa de ovulação. No entanto, foi demonstrada a associação entre o tamanho do folículo no momento da IATF e a taxa de concepção mesmo quando foram consideradas somente as fêmeas que ovularam após o protocolo de sincronização da ovulação. Durante o crescimento e desenvolvimento dos folículos, os oócitos armazenam quantidades crescentes de RNAm e proteínas (BREVINI-GANDOLFI et al., 1999; BREVINI GANDOLFI; GANDOLFI, 2001; BREVINI et al., 2002), e a competência oocitária continua a aumentar com o aumento de diâmetro folicular em bovinos (ARLOTTO et al., 1996). Adicionalmente, a produção de E2 durante proestro tem efeito positivo sobre a fase luteínica subsequente, bem como sobre a sobrevivência embrionária (MANN; LAMMING, 2000; SANTOS et al., 2004). Portanto, além de aumentar a taxa de ovulação, outros fatores tais como a produção de E2 endógena, a competência do oócito, o diâmetro CL e a concentração de P4 no ciclo estral subsequente podem estar envolvidos com a maior fertilidade de fêmeas que apresentam um folículo de maior tamanho no momento da IATF.

A taxa de ovulação geral foi de 84,9%. A presença de folículos < 7,5 mm de diâmetro no dia da IATF resultou em reduzidas taxas de ovulação e de concepção. No entanto, quando se levou em consideração o momento da ovulação, a maioria das fêmeas que apresentavam folículos < 7,5 mm de diâmetro no momento da IATF (79,4%) tinham apresentado ovulações antecipadas, ou seja, antes do dia da IATF. Em

bovinos, a inseminação quando realizada em momentos próximos da ovulação (24 horas após o início do estro) apresentam melhores taxas de fertilização, no entanto, o embrião formado apresenta pior qualidade quando comparado àquelas inseminações realizadas no início do estro (SAACKE et al., 2000; DALTON et al., 2001; SAACKE, 2008). Além disso, as inseminações realizadas com mais de 24 horas após o início do cio resultam em severa redução na taxa de concepção quando comparadas às inseminações realizadas entre 12 e 18 horas após o início do estro (NEBEL et al., 1994; MAATJE; LOEFFLER; ENGEL, 1997; DRANSFIELD et al., 1998).

Portanto, a presença de folículo de maior diâmetro no momento da IATF é associada a maiores taxas de ovulação, concepção, bem como de concepção somente nas vacas que ovularam após o protocolo de sincronização. Portanto, programas de sincronização da ovulação para IATF em vacas zebuínas que utilizam a associação entre P4 e E2, tais como os utilizados no presente estudo, devem visar o aumento do diâmetro folicular no momento da IATF para melhorar as respostas ovarianas e a fertilidade das fêmeas submetidas ao programa de IATF.

4 CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE ESTRO APÓS OS PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

4.1 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Durante o ciclo estral, o comportamento de aceitação de monta sinaliza a presença de folículo dominante produzindo elevadas concentrações de estradiol, bem como determina o momento da coberta. Em protocolos de sincronização para IATF, apesar das fêmeas apresentarem ovulação sincronizada, nem todas aceitam monta. Dessa maneira, a ocorrência de estro pode sinalizar a eficiente resposta das fêmeas ao protocolo de sincronização da ovulação.

Portanto, foram testadas as hipóteses de que: 1) Fêmeas zebuínas lactantes que apresentam estro após o protocolo de sincronização da ovulação têm uma melhor resposta ovariana e maior taxa de concepção após IATF do que as fêmeas que não apresentam estro (Experimento 1 e 2); 2) O tratamento adicional com GnRH no momento da IATF melhora a taxa de concepção, especialmente naquelas fêmeas que não apresentam estro após o protocolo de sincronização (Experimento 3) e; 3) Não existe diferença nas taxas de ocorrência de estro e de concepção após a utilização de diferentes ésteres de estradiol (benzoato ou cipionato de estradiol) para a indução da ovulação de vacas zebuínas lactantes (Experimento 4).

4.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação entre a ocorrência de estro, e as respostas ovarianas e de taxa de concepção de vacas zebuínas lactantes submetidas a protocolos de sincronização da ovulação para IATF.

4.2.1 Objetivos específicos

- Verificar as associações entre a ocorrência de estro e o diâmetro folicular no momento da retirada do dispositivo intravaginal de P4 e no momento da IATF;
- Verificar as associações entre a ocorrência de estro, a taxa de ovulação e a formação do corpo lúteo no ciclo subsequente a IATF;
- Verificar a taxa de concepção de fêmeas zebuínas lactantes que apresentam ou não o estro entre a retirada do dispositivo intravaginal e a IATF;
- Verificar o uso do tratamento adicional com GnRH no momento da IATF sobre a taxa de concepção das fêmeas de acordo com a manifestação de estro.
- Verificar o efeito de diferentes ésteres de estradiol na ocorrência de estro e consequentemente, na taxa de concepção após a IATF.

4.3 EXPERIMENTO 1 – INFLUÊNCIA DA OCORRÊNCIA DE ESTRO NO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR, A TAXA DE OVULAÇÃO E A FORMAÇÃO DO CORPO LÚTEO NO DIESTRO SUBSEQUENTE DE FÊMEAS ZEBUÍNAS LACTANTES SUBMETIDAS A PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO.

4.3.1 Material e métodos

4.3.1.1 Animais e local do experimento

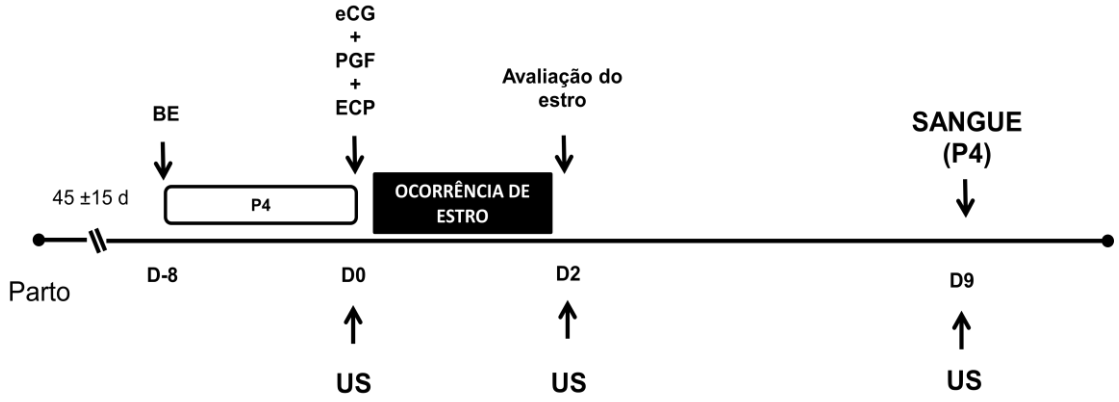
Este experimento foi realizado durante a estação de monta do ano de 2009/2010. Foram utilizadas 53 vacas Nelore (*Bos indicus*) lactantes oriundas de uma fazenda comercial localizada no município de Jacarezinho-PR. Os animais foram mantidos em regime de pastejo em *Brachiaria decumbens* com livre acesso a água e suplementação mineral. No início do protocolo de sincronização da ovulação, as fêmeas foram classificadas de acordo com sua condição corporal (escala de 1 a 5, onde 1 = caquética e 5 = obesa) (AYRES et al., 2009) e a ordem de partos (primípara ou plurípara).

4.3.1.2 Manejo reprodutivo e tratamento

Após o parto, as vacas foram agrupadas em lotes de cobertura conforme o mês de parição. Trinta dias após a ocorrência do último parto (intervalo entre 30 e 60 dias pós-parto) as fêmeas tiveram o estro e a ovulação sincronizados utilizando protocolo de sincronização à base de E2 e P4. Esse protocolo consistiu na inserção de um dispositivo intravaginal de P4 (Sincrogest®, Ouro Fino Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil) mais a administração intramuscular de 2,0 mg de BE (Sincrodiol®, Ouro Fino Saúde Animal). Oito dias após, os dispositivos foram removidos e administrados de maneira

intramuscular 0,25 mg de cloprostenol sódico (Sincrocio®, Ouro Fino Saúde Animal), 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG, Folligon®, Intervet-Shering Plough, Boxmeer, Holanda) e 0,5 mg de ECP (ECP; Pfizer Saúde Animal, São Paulo, SP). Para a análise, as vacas foram agrupadas retrospectivamente de acordo com a ocorrência ou não de estro durante as primeiras 48 horas após a retirada do dispositivo (Figura 3).

Figura 3 - Diagrama esquemático do desenho experimental utilizado no experimento 1.



BE = 2 mg benzoato de estradiol
eCG = 300 UI gonadotrofina coriônica equina
ECP = 0,5 mg de cipionato de estradiol
P4 = dispositivo intravaginal de progesterona (P4)
US = ultrassonografia transretal
Sangue (P4) = amostra de sangue para mensuração da concentração sérica de P4.

4.3.1.3 Detecção do estro

No momento da remoção do dispositivo intravaginal, as fêmeas tiveram a base da cauda pintada com bastão marcador (Raidl-Maxi, RAIDEX GmbH, Dettingen/Erms, Alemanha). O estro foi considerado quando as fêmeas não apresentavam a base marcada 48 horas após a remoção do dispositivo de P4.

4.3.1.4 Exames ultrassonográficos

As vacas tiveram seus ovários examinados com auxílio de ultrassom durante três diferentes momentos (no momento da retirada do dispositivo de P4, 48 horas após e 9 dias após a remoção do dispositivo intravaginal de P4). Para os exames foi utilizado aparelho de ultrassom munido de transdutor linear transretal de 7,5 MHz (CTS-3300V, SIUI, China). O diâmetro do maior folículo presente no momento da retirada e 48 horas após a retirada do dispositivo de P4 foi identificado e mensurado. Nove dias após a retirada do dispositivo de P4 foi identificado e mensurado o diâmetro do corpo lúteo (CL) formado. A ovulação foi considerada quando as fêmeas apresentavam um CL do lado correspondente ao folículo previamente identificado nos dois exames ultrassonográficos anteriores.

4.3.1.5 Colheita de sangue e análise de progesterona

As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia ou artéria coccígea mediana usando tubos a vácuo, nove dias após a remoção do dispositivo intravaginal de P4. As amostras foram refrigeradas entre 4 a 10 ^{o}C durante as primeiras 4 horas e posteriormente centrifugadas a 3000 RPM por 15 minutos e armazenadas a -20ºC até o momento da análise da concentração de P4. A concentração sérica de P4 foi mensurada usando kit de radioimunoensaio (Coat-A-Count®, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). O coeficiente de variação intraensaio foi de 2,6% e a sensibilidade do ensaio foi de 0.006 ng/ml.

4.3.1.6 Análise estatística

Informações sobre cada fêmea foram compiladas em uma única planilha para análise estatística. Os dados foram analisados com auxílio do procedimento GLIMMIX do SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). As variáveis explanatórias foram sequencialmente removidas pelo critério estatístico de *Wald* quando apresentavam P > 0,20.

No experimento foi incluída no modelo somente a variável independente ocorrência de estro. As variáveis resposta analisadas foram o diâmetro do maior folículo no momento da retirada do dispositivo de P4, o diâmetro do maior folículo 48 horas após a remoção do dispositivo de P4, a taxa de ovulação, o diâmetro do CL 9 dias após a remoção do dispositivo e a concentração sérica de P4 nesse último momento (foram incluídas para essa análise somente as vacas que ovularam após o protocolo de sincronização da ovulação). As variáveis foram previamente testadas de acordo com sua homegenecidade e normalidade utilizando o Guide Data Analysis do SAS. As concentrações de P4 foram transformadas utilizando a raiz quadrada da variável. Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão.

4.3.2 Resultados

A taxa de ocorrência de estro foi de 67,9% (36/53). Vacas que apresentaram estro tiveram folículo de maior diâmetro no momento da retirada do dispositivo de P4, e 48 horas após a retirada, maior taxa de ovulação, maior diâmetro do corpo lúteo, e maior concentração de P4 no ciclo subsequente ao protocolo de sincronização do que as vacas que não apresentaram estro (Tabela 1).

Tabela 1 - Ocorrência de estro após protocolo de sincronização da ovulação a base de E2 e P4 sobre a resposta folicular, taxa de ovulação e formação do corpo lúteo no ciclo subsequente de vacas zebuínas lactantes

	Sem Estro	Com Estro	P
Número de fêmeas	17	36	---
Diâmetro do maior folículo no momento da retirada do dispositivo de P4 (mm)	8,1±0,8	11,9±0,3	<0,0001
Diâmetro do maior folículo 48 horas após a retirada do dispositivo de P4 (mm)	9,5 ±1,0	13,9±0,5	<0,0001
Taxa de ovulação (%)	70,6 (12/17)	100,0 (36/36)	0,02
Diâmetro do corpo lúteo nove dias após a retirada do dispositivo de P4 (mm)	20,3±1,1	22,9±0,5	0,02
Concentração de P4 nove dias após a retirada do dispositivo de P4 (ng/mL)*	3,0±0,3	4,2±0,3	<0,0001

*Somente vacas que ovularam após o protocolo de sincronização da ovulação.

4.4 EXPERIMENTO 2 – ASSOCIAÇÃO ENTRE A OCORRÊNCIA DE ESTRO E A TAXA DE CONCEPÇÃO APÓS IATF DE VACAS ZEBUÍNAS LACTANTES SUBMETIDAS A PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA IATF.

4.4.1 Material e métodos

4.4.1.1 Animais e local do experimento

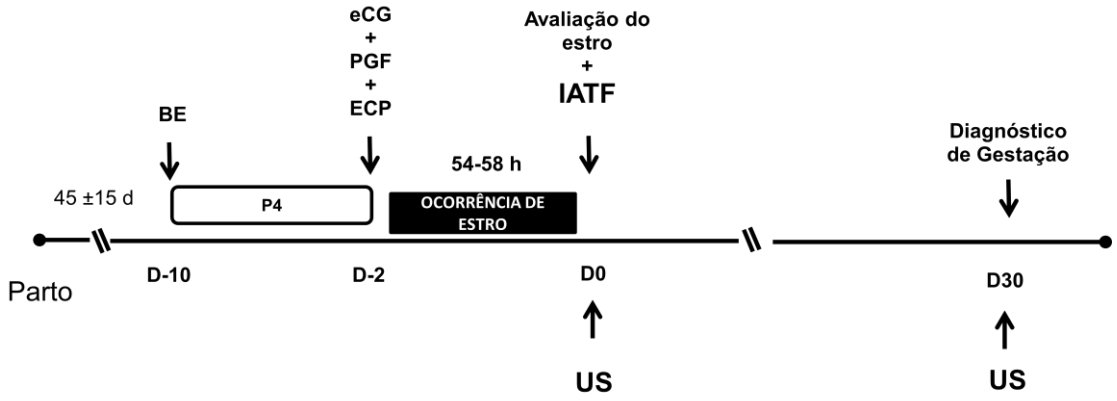
Um total de 445 vacas de corte lactantes (259 Nelore; *Bos indicus* e 186 cruzadas; *Bos taurus x Bos indicus*) oriundas de quatro fazendas comerciais localizadas nos estados do Mato Grosso do Sul (MS; 1 fazenda) e do Paraná (PR; 3 fazendas) foram utilizadas nesse estudo durante a estação reprodutiva de 2008 e 2009. As vacas foram mantidas sob pastejo em *Brachiaria decumbe*ns (Fazenda MS) ou *Cynodon ssp*. e *Panicum maximum* (Fazendas PR) com suplementação mineral e livre acesso a água.

4.4.1.2 Manejo reprodutivo e tratamento

Após o parto, as vacas foram alocadas em lotes conforme a data da parição. As fêmeas tiveram o estro e a ovulação sincronizados com protocolo de sincronização à base de E2 e P4. No primeiro dia do protocolo as fêmeas receberam um dispositivo intravaginal contendo 1,9 g de P4 (CIDR, Pfizer Saúde Animal, São Paulo, Brasil) novos ou previamente utilizados durante 8 ou 16 dias e associado à administração intramuscular de 2 mg de BE (Estrogin®, Farmavet, São Paulo, Brasil). Oito dias após, os dispositivos foram removidos e administrado de maneira intramuscular 0,6 mg de ECP (Pfizer Saúde Animal, São Paulo, Brasil), 25 mg de dinoprost (Lutalyse, Pfizer Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG,

Folligon®, Intervet-Schering Plough, Boxmeer, Holanda). As fêmeas foram inseminadas em tempo fixo entre 54-58 horas após a remoção do dispositivo intravaginal de P4 (Figura 4).

Figura 4 - Diagrama esquemático do desenho experimental utilizado no experimento 2



BE = 2 mg benzoato de estradiol
eCG = 300 UI gonadotrofina coriônica equina
ECP = 0,6 mg de cipionato de estradiol
P4 = dispositivo intravaginal de P4
IATF = inseminação artificial em tempo fixo
US = ultrassonografia transretal

4.4.1.3 Detecção do estro

O estro foi determinado pelo uso de adesivos específicos para detecção de cio (Estrotect®, IVP, Spring Valley, Wisconsin, EUA). No momento da retirada do dispositivo intravaginal as vacas receberam um adesivo que foi colado na base da cauda. A ativação (remoção da tinta cinza) do adesivo marcador foi avaliada no momento da IATF. As fêmeas que apresentavam o adesivo ativado nesse momento foram consideradas como tendo aceitado monta e, portanto, manifestado estro.

4.4.1.4 Exame ultrassonográfico e categorização folicular

No momento da IATF os ovários foram examinados com auxílio do ultrassom munido com transdutor linear transretal de 5 MHz (Aloka-SSD 500, Tokio, Japão). O diâmetro do maior folículo presente em ambos os ovários foi identificado, mesurado e, posteriormente, categorizado de acordo com a média e o desvio padrão da amostra [1) < 7,5 mm; 2) 7,5 a 11,0 mm; 3) 11,1 a 14,4 mm; ou 4) > 14.4 mm], conforme metodologia descrita no Capítulo 1.

4.4.1.5 Diagnóstico de gestação

Todas as vacas foram examinadas por ultrassonografia transretal 30 dias após a IATF. As fêmeas que apresentavam embrião vivo foram consideradas como gestantes. A taxa de concepção foi calculada pela proporção de fêmeas gestantes 30 dias após a IATF dividida pelo total de vacas inseminadas.

4.4.1.6 Análise estatística

Informações sobre cada fêmea de cada fazenda foram compiladas em uma única planilha para análise estatística. Os dados foram analisados por regressão logística utilizando o procedimento LOGISTIC do SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). O modelo de "*backward stepwise regression*" foi utilizado, no qual as variáveis explanatórias foram sequencialmente removidas pelo critério estatístico de *Wald* quando apresentavam P > 0,10. Diferenças com P < 0,05 foram consideradas como significativas.

Para a análise da ocorrência de estro, as variáveis inicialmente incluídas no modelo estatístico foram fazenda (1 a 4), ordem de partos (primíparas e plurípara), raça

da vaca (Nelore ou cruzada), escore de condição corporal e a categoria do maior folículo (FD) no momento da IATF. No modelo final ficaram retidas somente as variáveis ocorrência de estro e a categoria do FD. A razão de risco ajustado (RRA) e o intervalo de confiança a 95% (IC) foram gerados durante a regressão logística, sendo os resultados apresentados em proporção e RRA.

A associação entre o diâmetro folicular e a probabilidade da ocorrência de estro foi determinada. A curva de regressão logística foi criada utilizando os coeficientes gerados pelo recurso "*interactive data analysis*" do SAS e a fórmula y = EXP (α * x + b)/ [1 + EXP (α * x + b)], onde: y= probabilidade de ocorrência de estro; exp=exponencial; α = inclinação ("slope") da curva de regressão logística; b= intercept da equação logística; x = diâmetro do maior folículo no momento da IATF (mm).

4.4.2 Resultados

A taxa de ocorrência de estro foi de 57,8% (257/445). Vacas que apresentaram estro tiveram 3,3 vezes mais chance de se tornarem gestantes (RRA = 3,33 e IC = 2,16 a 5,14; $P < 0,001$) 30 dias após a IATF do que fêmeas que não se tornaram gestantes (Figura 5). Além disso, o diâmetro folicular foi associado a maior taxa de ocorrência de estro (Figura 6), entretanto, houve interação entre o diâmetro folicular e a ocorrência de estro sobre a taxa de concepção após a IATF (P = 0,05; Figura 7).

Figura 5 - Taxa de concepção de acordo com a ocorrência de estro após protocolo de sincronização da ovulação à base de E2 e P4 sobre taxa de concepção de vacas zebuínas lactantes

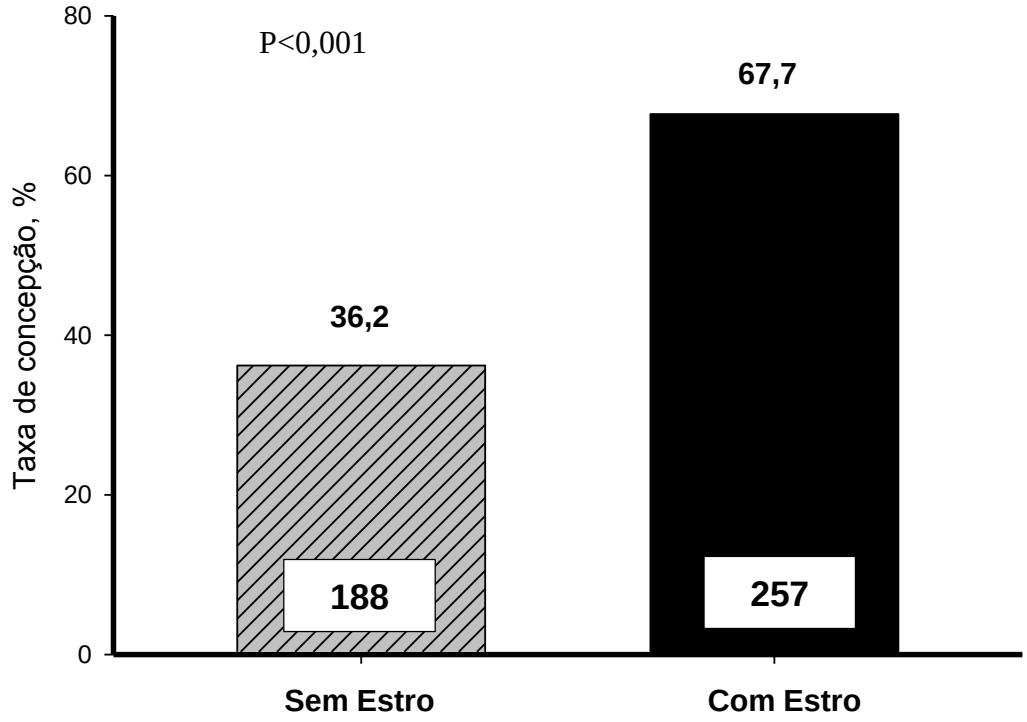


Figura 6 - Probabilidade de ocorrência de estro entre a retirada do dispositivo intravaginal de P4 e a IATF de vacas zebuínas lactantes (n = 445) de acordo com o diâmetro do maior folículo (FD) no momento da IATF [Probabilidade da ocorrência de estro = exp (- 0,6097 + 0,0924*FD na IATF / 1 + exp (- 0,6097 + 0,0924*FD na IATF); *P* = 0,0002)]

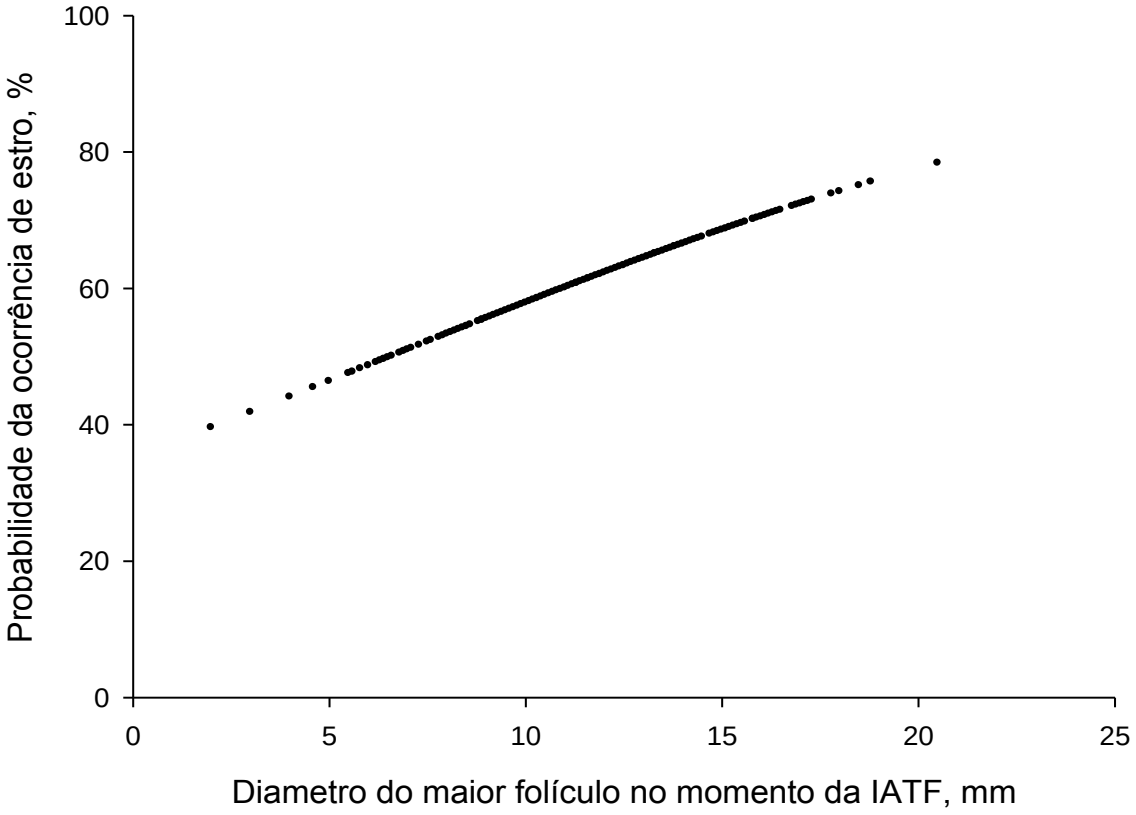
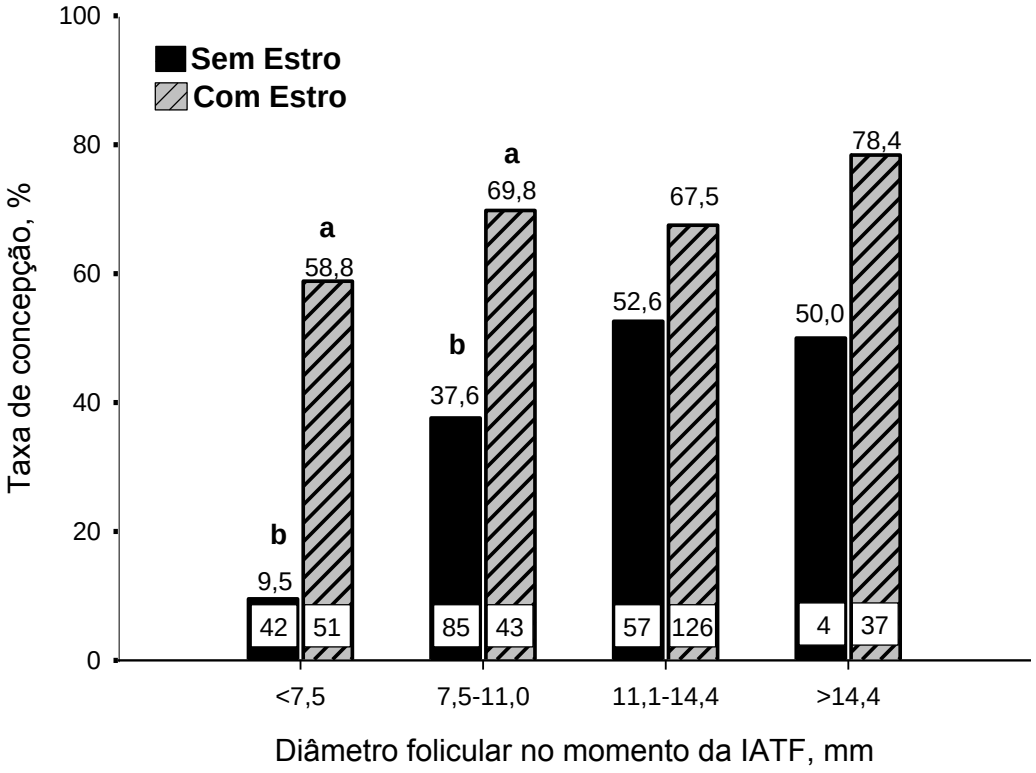


Figura 7 – Taxa de concepção de acordo com a ocorrência do estro após o protocolo de sincronização da ovulação e o diâmetro folicular no momento da IATF. Houve efeito significativo do diâmetro folicular no momento da IATF (P < 0,0001), da ocorrência de estro (P < 0,0001) e também da interação entre diâmetro folicular e ocorrência de estro (P = 0,05)



4.5 EXPERIMENTO 3- USO DO GNRH NO MOMENTO DA IATF COMO TRATAMENTO ADICIONAL PARA VACAS ZEBUÍNAS LACTANTES QUE NÃO APRESENTAM ESTRO ENTRE A RETIRADA DO DISPOSITIVO E A IATF.

4.5.1 Material e métodos

4.5.1.1 Animais e local do experimento

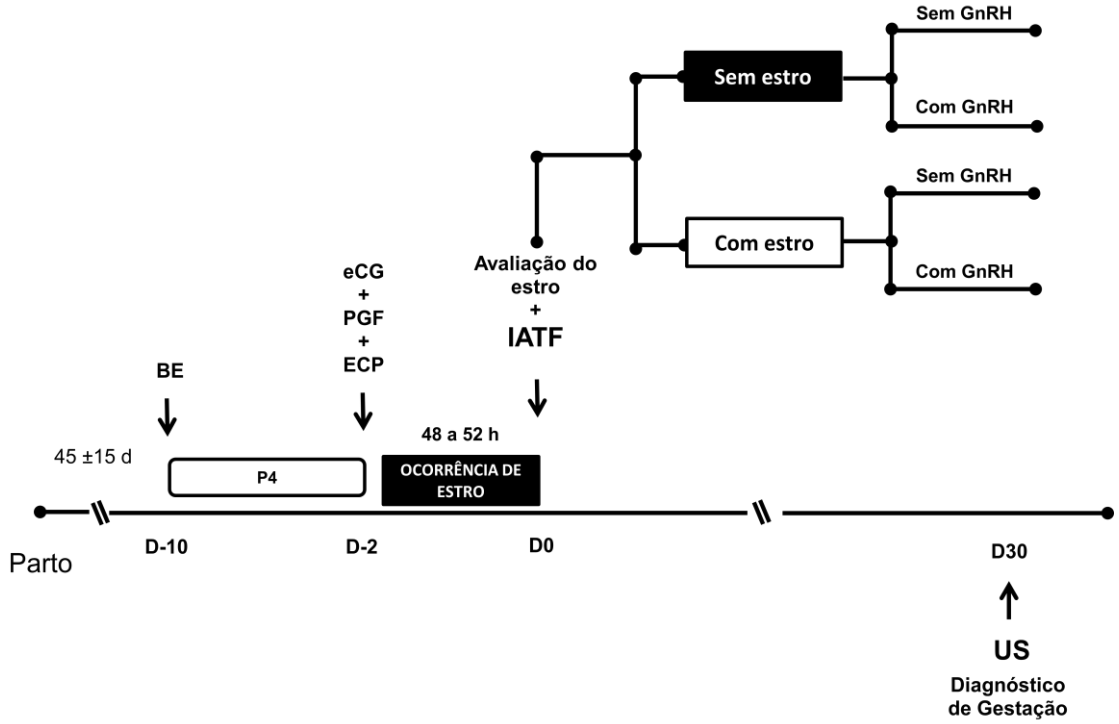
Um total de 726 vacas zebuínas lactantes [495 Nelore (*Bos indicus*) and 231 cruzadas (*Bos indicus x Bos taurus*)] oriundas de quatro fazendas comerciais (272, 161, 106, e 187 para as fazendas de 1 a 4, respectivamente) localizadas no estado do Paraná, Brasil, foram utilizadas neste estudo. Todas as vacas foram mantidas em pastagem de *Brachiaria brizantha* e tiveram livre acesso à água e suplementação mineral. O experimento foi conduzido durante a estação reprodutiva de 2008/2009. Informações de cada vaca tais como raça, categoria de ECC no início do protocolo de sincronização, a ordem de partos (primíparas vs. pluríparas) foram colhidas.

4.5.1.2 Manejo reprodutivo e tratamento

Após o parto, as vacas foram alocadas em lotes conforme a data da parição. As fêmeas tiveram o estro e a ovulação sincronizados após protocolo de sincronização à base de E2 e P4. No primeiro dia do protocolo as fêmeas receberam um dispositivo intravaginal contendo 1,9 g de P4 (CIDR, Pfizer Saúde Animal, São Paulo, Brasil) associado à administração de 2 mg de BE (Estrogin®, Farmavet, São Paulo, Brasil). Oito dias após, os dispositivos foram removidos e administrado de maneira intramuscular 0,6 mg de CE (ECP, Pfizer Saúde Animal, São Paulo, Brasil), 25 mg de

dinoprost (Lutalyse, Pfizer Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG, Folligon®, Intervet-Schering Plough, Boxmeer, Holanda). As fêmeas foram inseminadas em tempo fixo entre 48-52 horas após a remoção do dispositivo intravaginal de P4. No momento da IATF as vacas foram distribuídas homogeneamente de acordo com a ocorrência de estro e a adminstração de GnRH (10 µg de buserelina, Sincroforte®, Ouro Fino Saúde Animal, São Paulo, Brasil) (Fatorial 2 x 2: sem estro – sem GnRH, sem estro – com GnRH, com estro – sem GnRH, e Com estro – com GnRH; Figura 8).

Figura 8 - Diagrama esquemático do experimento



BE = 2 mg benzoato de estradiol
eCG = 300 UI gonadotrofina coriônica equina
CE = 0,6 mg de cipionato de estradiol
P4 = dispositivo intravaginal de P4
IATF = inseminação artificial em tempo fixo
US = ultrassonografia transretal
GnRH = 10µg de buserelina

4.5.1.3 Detecção do estro

No momento da remoção do dispositivo intravaginal as fêmeas tiveram a base da cauda pintada com bastão marcador (Raidl-Maxi, RAIDEX GmbH, Dettingen/Erms, Alemanha). O estro foi considerado quando as fêmeas não apresentavam a base da cauda marcada no momento da IATF.

4.5.1.4 Diagnóstico de gestação

Todas as vacas foram examinadas por ultrassonografia transretal (Aloka-SSD 500, Tokyo, Japan) 30 dias após a IATF. As fêmeas que apresentavam embrião vivo foram consideradas como gestantes. A taxa de concepção foi calculada pela proporção de fêmeas gestantes 30 dias após a IATF dividida pelo total de vacas inseminadas.

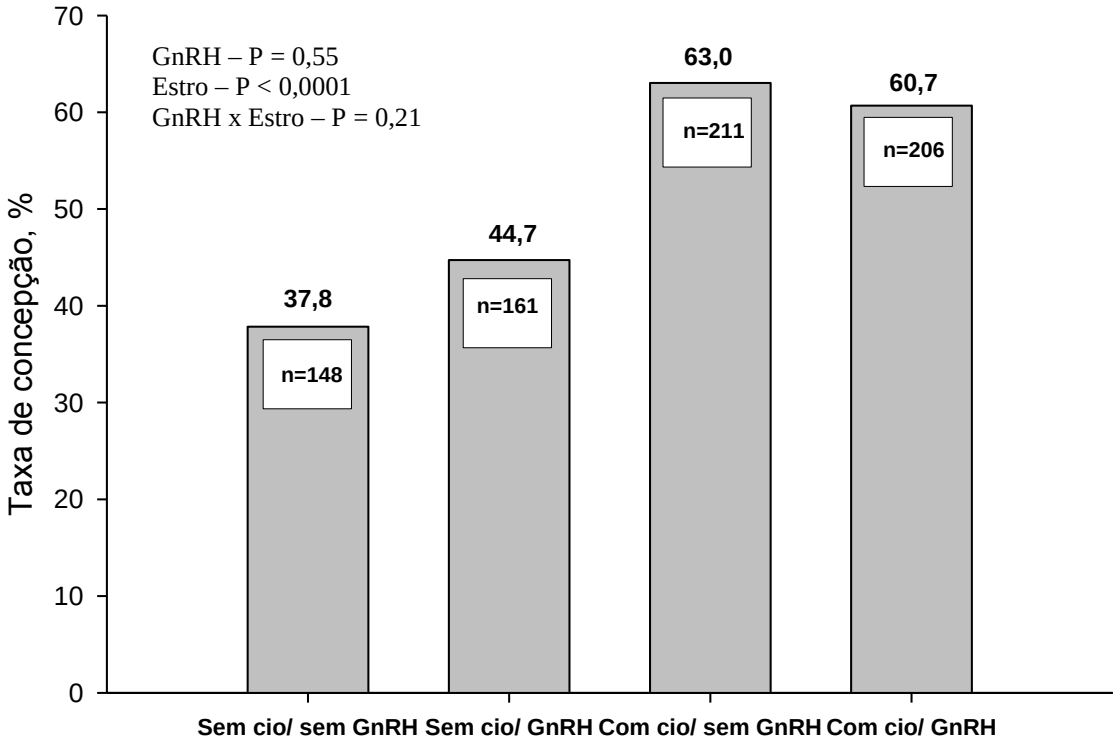
4.5.1.5 Análise estatística

As variáveis respostas binomiais foram assumidas como variáveis categóricas. A ocorrência de estro e a taxa de concepção foram analisadas utilizando o procedimento GLIMMIX de SAS, sendo as fêmeas consideradas como efeito aleatório. As variáveis inicialmente incluídas no modelo estatístico foram fazenda (1 a 4), raça [Nelore (*Bos indicus*) e mestiças (*Bos indicus* x *Bos taurus*)], a ordem de partos (primíparas ou pluríparas), ECC no primeiro dia do protocolo de sincronização, o tratamento com GnRH, a ocorrência de estro, e suas interações. Variáveis que permaneceram no modelo final para a análise da taxa de concepção foram: a ocorrência de estro, tratamento com GnRH, e a interação entre a ocorrência de estro e o tratamento com GnRH.

4.5.2 Resultados

A taxa de ocorrência de estro média foi de 57,4% (417/726). Não houve interação entre a ocorrência de estro e o tratamento com GnRH no momento da IATF sobre a taxa de concepção (P=0,21). Também não foi obervado efeito de fazenda sobre a taxa de concepção (P=0,19). A taxa de concepção foi maior (P<0,0001) nas fêmeas que apresentaram estro (61,9%; 258/417) entre a retirada do dispositivo intravaginal de P4 e a IATF, quando comparadas àquelas que não apresentaram estro (41,4%; 128/309). Entretanto, a taxa de concepção não foi alterada após o tratamento adicional com GnRH (P=0,55; Figura 9).

Figura 9 - Taxa de concepção de vacas zebuínas lactantes de acordo com a ocorrência de estro e o tratamento com GnRH no momento da IATF



4.6 EXPERIMENTO 4 – USO DE DIFERENTES ÉSTERES DE ESTRADIOL PARA INDUÇÃO DA OVULAÇÃO EM PROTOCOLOS DE IATF SOBRE AS TAXAS DE OCORRÊNCIA DE ESTRO E DE CONCEPÇÃO EM FÊMEAS ZEBUÍNAS.

4.6.1 Material e métodos

4.6.1.1 Animais e local do experimento

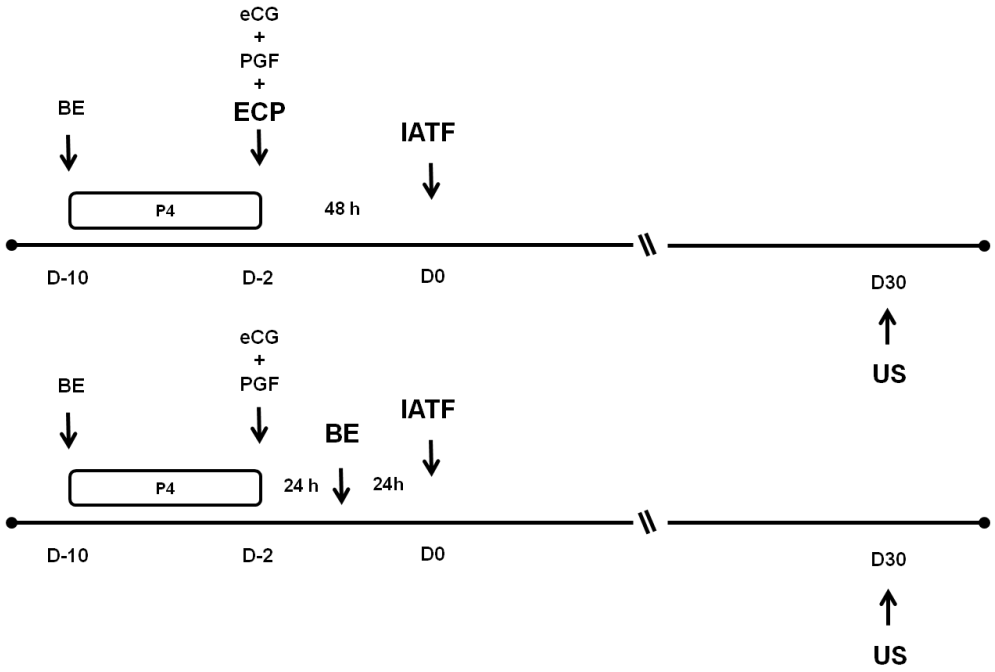
Um total de 479 fêmeas Nelore lactantes oriundas de quatro fazendas comerciais localizadas no estado do Mato Grosso e Pará, Brasil, foram utilizadas no presente estudo. Todas as vacas foram mantidas em pastagem de *Brachiaria ssp*. e tiveram livre acesso à água e suplementação mineral. O experimento foi conduzido durante a estação reprodutiva de 2011/2012. Informações de cada vaca tais como fazenda e escore de condição corporal (ECC; escala de 1 a 5, onde 1 = caquética e 5 = obesa) no início do protocolo de sincronização, foram colhidas.

4.6.1.2 Tratamento

Todas as fêmeas receberam no início da sincronização um dispositivo intravaginal de 0,6g de P4 (P4, Cronipress Monodose®, Biogenesis-Bagó) mais 2 mg de BE i.m. (Bioestrogen®; Biogênesis). Oito dias após, o dispositivo foi removido e administraram-se 0,075 mg de D-Cloprostenol (Croniben®; Biogênesis-Bagó), 300 UI de eCG i.m. (Novormon®, MSD Saúde Animal). No momento da retirada do dispositivo as fêmeas foram distribuídas homogeneamente, de acordo com a categoria animal, em dois grupos experimentais (CE ou BE). As fêmeas do grupo CE receberam 1mg de CE (ECP®, Pfizer Saúde Animal) no momento da retirada, enquanto as fêmeas

do grupo BE, receberam 1mg de BE 24 horas após a remoção do dispositivo. Todas as fêmeas foram inseminadas em tempo fixo 48 horas após a retirada dos dispositivos de P4 (Figura 10).

Figura 10 - Diagrama esquemático do experimento



BE = benzoato de estradiol (D-10 = 2mg e D-1 = 1mg)
eCG = 300 UI gonadotrofina coriônica equina
ECP = 1 mg de cipionato de estradiol
P4 = dispositivo intravaginal de P4 (contendo 0.6 g de P4)
IATF = inseminação artificial em tempo fixo
US = ultrassonografia transretal (diagnóstico de gestação)

4.6.1.3 Detecção do estro

No momento da remoção do dispositivo intravaginal as fêmeas tiveram a base da cauda pintada com bastão marcador (Raidl-Maxi, RAIDEX GmbH, Dettingen/Erms, Alemanha). O estro foi considerado quando as fêmeas não apresentavam a base marcada no momento da IATF.

4.6.1.4 Diagnóstico de gestação

Todas as vacas foram examinadas por ultrassonografia transretal 30 dias após a IATF. As fêmeas que apresentavam embrião vivo foram consideradas como gestantes. A taxa de concepção foi calculada pela proporção de fêmeas gestantes 30 dias após a IATF dividida pelo total de vacas inseminadas.

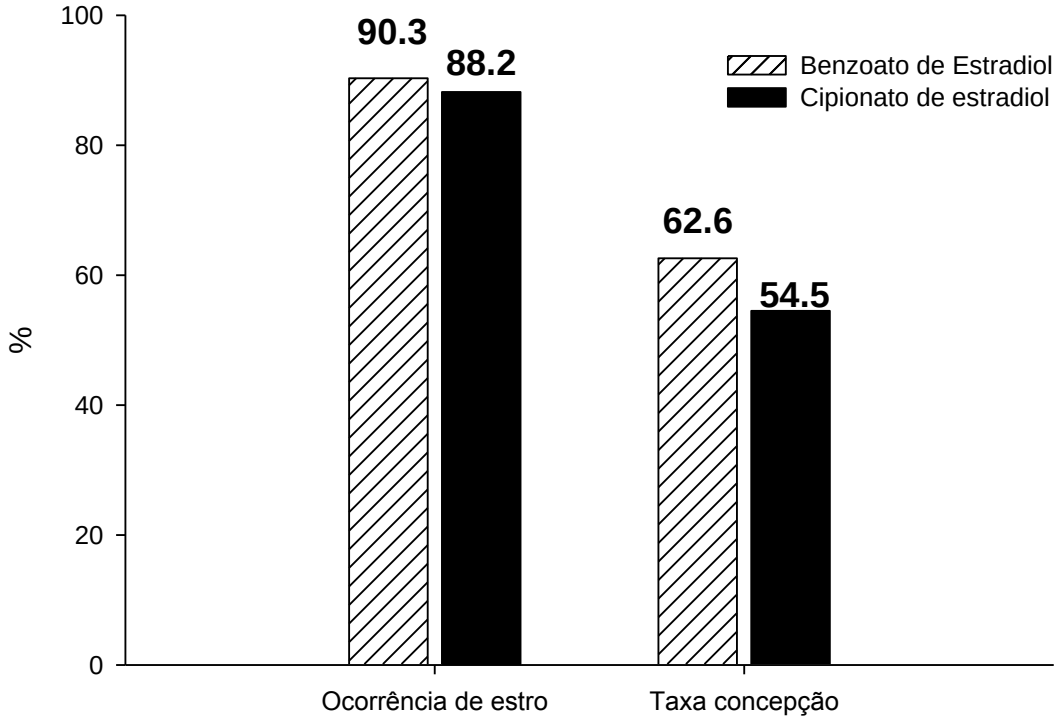
4.6.1.5 Análise estatística

As variáveis binomiais foram assumidas como variáveis categóricas. A ocorrência de estro e a taxa de concepção foram analisadas utilizando o procedimento GLIMMIX do SAS. Para a análise da taxa de ocorrência de estro e concepção aos 30 dias após IATF, as variáveis inicialmente incluídas no modelo estatístico para análise de ocorrência do estro foram: fazenda (1 a 4), ECC no primeiro dia do protocolo de sincronização, tratamento (CE ou BE), e suas interações. As variáveis que permaneceram no modelo final para a análise da taxa de concepção foram fazenda ECC e tratamento.

4.6.2 Resultados

Não foram encontradas diferenças conforme o tipo do éster de E2 utilizado como indutor de ovulação (BE vs. CE) na ocorrência de estro (P = 0,99) e na taxa de concepção após IATF (P = 0,12; Figura 11). No entanto, foi observado efeito positivo do ECC tanto na taxa de ocorrência de estro (P = 0,0004), quanto na taxa de concepção (P = 0,001).

Figura 11 - Efeito do éster de estradiol (BE=benzoato de estradiol vs. CE=cipionato de estradiol) utilizado como indutor de ovulação sobre a taxa de ocorrência de estro e a taxa de concepção após IATF de fêmeas zebuínas. Não foi observado diferença entre os tipos de ésteres de E2 na ocorrência de estro (P=0,99) e na taxa de concepção (P=0,12)



4.7 DISCUSSÃO

A ocorrência de estro foi um importante sinalizador para a melhor resposta ovariana e a fertilidade de fêmeas zebuínas lactantes submetidas a protocolos de sincronização da ovulação para IATF à base de E2 e P4. Além disso, a informação da ocorrência do estro pode ser utilizada como ferramenta para identificar fêmeas com maiores chances de se tornarem gestantes, justificando a utilização de sêmen de maior valor agregado como o sêmen sexado em programas de IATF. Vacas que apresentaram estro após o protocolo de sincronização da ovulação já apresentavam um folículo de maior diâmetro no momento da retirada do dispositivo. Além disso, fêmeas que apresentaram estro apresentaram folículo de maior tamanho no momento da IATF, maior taxa de ovulação, e maior função luteínica no ciclo subsequente à IATF. Por fim, o uso do tratamento adicional com GnRH no momento da IATF foi ineficiente em aumentar a taxa de concepção após inseminação, tanto nas vacas que apresentaram, quanto nas que não apresentaram estro, rejeitando a hipótese inicial desse estudo.

O início do estro tem sido associado com o pico das concentrações de E2 circulantes (ALLRICH, 1994), estimulando regiões específicas do centro comportamental (ROELOFS et al., 2010). As concentrações de E2 próximas ao período da inseminação podem influenciar a fertilização pelas modificações no transporte dos espermatozoides ou alterando o ambiente uterino (HAWK, 1983, 1987). A influência da ocorrência de estro após programas de sincronização para IATF tem sido descrita por outros autores, tanto em fêmeas taurinas (CERRI et al., 2004; HILLEGASS et al., 2008; PERRY; PERRY, 2008) quanto em fêmeas zebuínas (MENEGHETTI et al., 2009; PERES et al., 2009). Da mesma maneira que o observado no presente estudo, os outros autores também demonstraram que a presença de maiores folículos no final do protocolo de sincronização está associada a maior ocorrência de estro, maior taxa de ovulação e maior risco de gestação em fêmeas bovinas submetidas à IATF (MENEGHETTI et al., 2009; PERES et al., 2009).

Estudos anteriores reportam taxas de concepção médias de 49,6% após IATF em fêmeas zebuínas criadas a pasto (SÁ FILHO et al., 2009a). Essa resposta parece ser influenciada por diversos fatores como, por exemplo, fazenda, raça, categoria animal (nulíparas, primíparas ou pluríparas), e o escore de condição corporal no início do protocolo de sincronização (SÁ FILHO et al., 2009a). Além desses fatores associados

ao sucesso dos programas de IATF, o tratamento com eCG no momento da remoção da fonte de P4 ou progestágeno tem melhorado significativamente a resposta ovariana e as taxas de concepção de vacas zebuínas lactantes submetidas a protocolo de sincronização da ovulação para IATF (BARUSELLI et al., 2004; SÁ FILHO et al., 2010a, 2010d). O tratamento com eCG promove um suporte gonadotrófico de FSH e LH (MURPHY; MARTINUK, 1991), aumentando o crescimento final do folículo dominante (SÁ FILHO et al., 2009a; SÁ FILHO et al., 2010a, 2010d) e a função luteínica no ciclo subsequente (SÁ FILHO et al., 2010d). Apesar do tratamento com eCG, apenas 57,8% das fêmeas avaliadas no presente estudo apresentaram estro entre a remoção do dispositivo de P4 e a IATF (Experimento 2). Isso reforça a importância de outros fatores associados à ocorrência do estro bem como ao sucesso da gestação em fêmea zebuínas submetidas a programas de IATF.

No presente estudo, vacas zebuínas lactantes que apresentaram estro após o protocolo de sincronização tiveram maior função luteínica no ciclo subsequente, maior diâmetro do corpo lúteo formado e maiores concentrações séricas de P4. Resultados semelhantes são descritos em fêmeas leiteiras de alta produção (HILLEGASS et al., 2008). Vacas que não apresentam estro após o protocolo de sincronização devido à presença de folículos dominantes de menor diâmetro podem também apresentar concentrações menores de E2 durante o proestro (PERRY et al., 2005a, 2007; FIELDS et al., 2012), o que pode resultar em um menor pico de LH. Por conseguinte, a formação do corpo lúteo e as concentrações de P4 no ciclo subsequente podem ser reduzidos (FIELDS et al., 2012). Além disso, concentrações reduzidas de E2 podem resultar em maior risco de luteólise prematura no ciclo estral subsequente (ocorrência de ciclos de curta duração) (MANN; LAMMING, 2000), o que poderia diminuir as taxas de sobrevivência embrionária (SANTOS et al., 2004). Reforçando essa ideia, quando receptoras de embrião foram submetidas à sincronização da ovulação para transferência de embriões em tempo fixo, novilhas que apresentaram estro após a indução da luteólise tiveram maior diâmetro do corpo lúteo, maior concentração de P4 durante o diestro subsequente, bem como maior taxa de concepção após transferência de embrião (BARUSELLI et al., 2003). Portanto, a falta de ocorrência de estro antes da IATF, pode estar associada a menores concentrações de E2 durante o proestro, reduzindo a função luteínica no ciclo subsequente, alterando a incidência de ciclos de curta duração, ou diminuindo a sobrevivência embrionária após a IATF de vaca zebuínas lactantes.

5 CAPÍTULO III - SELEÇÃO DE FÊMEAS A PARTIR DA OCORRÊNCIA DE ESTRO E DO DIÂMETRO FOLICULAR PARA RECEBEREM SÊMEN CONVENCIONAL OU SEXADO EM PROGRAMAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

5.1 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Fêmeas que apresentam folículo de maior diâmetro no momento da IATF ou aquelas que apresentam estro após o protocolo de sincronização da ovulação têm maior taxa de concepção após inseminação com sêmen convencional. Dessa forma, tais critérios podem ser empregados para a seleção de fêmeas com maior probabilidade de concepção para o uso de sêmen sexado em programas de IATF. Além disso, fêmeas que apresentam estro ou aquelas que apresentam um folículo de maior diâmetro no momento da IATF apresentam melhores taxas de concepção; independentemente do tipo do sêmen utilizado na IATF.

5.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o uso da informação sobre a ocorrência de estro entre a retirada do dispositivo e a IATF e do diâmetro folicular no momento da IATF como critérios de seleção para a utilização de sêmen sexado ou convencional em programas de IATF.

5.2.1 Objetivos específicos

- Verificar o efeito do diâmetro folicular no momento da IATF sobre a taxa de concepção após IATF utilizando sêmen convencional ou sexado (Experimento 1);

- Verificar o efeito da ocorrência de estro sobre a taxa de concepção após uso de sêmen convencional ou sexado em programas de IATF (Experimento 2);
- Verificar o efeito do diâmetro folicular sobre a ocorrência de estro entre a retirada do dispositivo e o momento da IATF (Experimento 2).

5.3 EXPERIMENTO 1- SELEÇÃO DE FÊMEAS ZEBUÍNAS LACTANTES A PARTIR DO DIÂMETRO FOLICULAR NO MOMENTO DA IATF PARA O USO DE SÊMEN SEXADO OU CONVENCIONAL.

5.3.1 Material e métodos

5.3.1.1 Animais e local do experimento

Um total de 853 vacas Nelore *Bos indicus* pluríparas oriundas de duas fazendas comerciais (Fazenda 1 = Jacarezinho, PR, e Fazenda 2 = Campo Grande, MS) foram utilizadas no presente estudo. As fêmeas foram mantidas sob regime de pastejo em pastagem *Brachiaria brizantha* com livre acesso à água e suplementação mineral. Os dados foram coletados entre setembro e dezembro da estação reprodutiva de 2009. Informação do ECC cada vaca no início do protocolo de sincronização foi colhida.

5.3.1.2 Manejo reprodutivo e tratamento

As vacas após o parto foram distribuídas em lotes conforme o período de nascimento. No início do tratamento as fêmeas apresentavam entre 30 e 60 dias pós-parto. As fêmeas receberam um protocolo de sincronização da ovulação à base de E2 e P4. As fêmeas receberam um dispositivo intravaginal contendo 1,0 g de P4 (P4; DIB, Intervet-Shering Plough, Boxmeer, Holanda) mais 2,0 mg de BE intramuscularmente (BE; Gonadiol, Intervet-Shering Plough). Oito dias após, o dispositivo foi removido, e as fêmeas receberam i.m. $PGF_{2\alpha}$ (112,5 µg de D-cloprostenol, Preloban, Intervet-Shering Plough) mais 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG; Folligon, Intervet-Shering Plough). Um segundo tratamento com 1 mg de BE para induzir a ovulação foi realizado 24 horas após a remoção do dispositivo intravaginal de P4. As

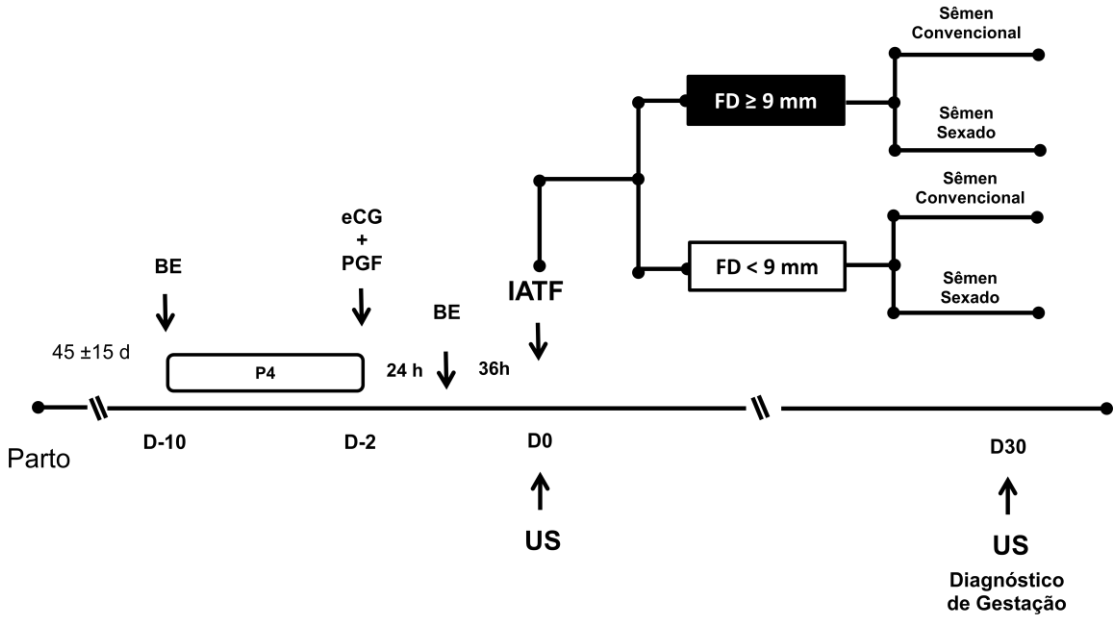
fêmeas foram inseminadas entre 60 e 64 horas após a remoção dos dispositivos intravaginais de P4, com sêmen convencional ou sexado. Foi utilizado sêmen congelado para todas as inseminações, sendo essas realizadas por um único inseminador.

As fêmeas tiveram seu escore de condição corporal (ECC) avaliado, utilizando uma escala de 1 a 5, onde 1 = caquética e 5 = obesa (AYRES et al., 2009).

5.3.1.3 Delineamento experimental

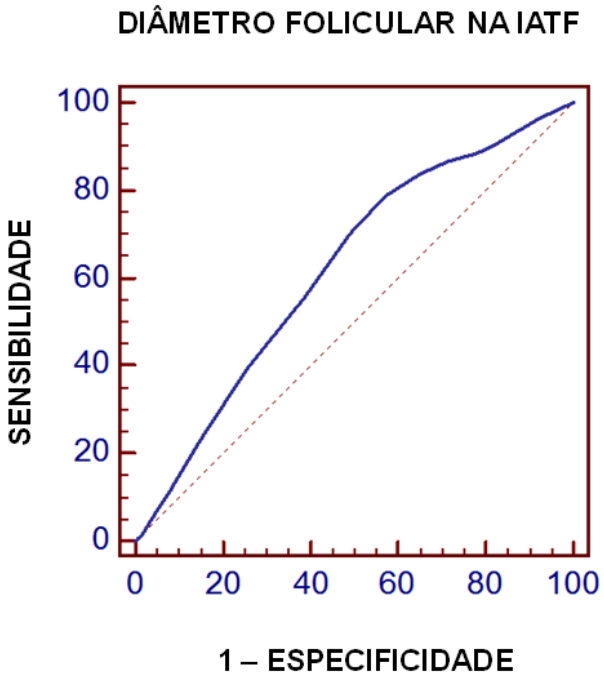
Imediatamente antes da IATF, as fêmeas tiveram o maior folículo ovariano presente identificado, mensurado e classificado em < 9 mm ou ≥ 9 mm (FD < 9 mm ou ≥ 9 mm, Figura 1). Esse diâmetro folicular (9 mm) havia sido previamente determinado utilizando a análise de "*receiver operating characteristic* (**ROC**)" que determina a precisão pela qual o tamanho folicular prevê a ocorrência de concepção após inseminação, baseado na sensibilidade e especificidade. A sensibilidade da curva contra falso positivo (100 – especificidade) encontra a melhor combinação de sensitividade e especificidade para o diâmetro folicular e a taxa de concepção. Para essa análise foram utilizadas 4656 inseminações no qual as fêmeas tiveram no momento da IATF o maior folículo identificado e mensurado. A área sob a curva foi de 0,621, com erro padrão de 0,00816 e 95% de intervalo de confiança de 0,607 a 0,635. Maior sensibilidade combinada (78,7%, intervalo de confiança de 95% = 77,0 a 80,4) e especificidade (42,7%, intervalo de confiança de 95% = 40,7 a 44,8%) foram detectadas com o folículo a partir de 9 mm (Figura 2).

Figura 1 - Diagrama esquemático do experimento 1



BE = benzoato de estradiol
eCG= 300 UI gonadotrofina coriônica equina
P4 = dispositivo intravaginal de P4
IATF = inseminação artificial em tempo fixo
US = ultrassonografia transretal

Figura 2 - Análise da curva ROC ("Receiver operating characteristic; ROC")



As vacas de cada categoria de diâmetro folicular foram distribuídas aleatoriamente para serem inseminadas utilizando sêmen sexado (mínimo de 2×10^6 células/dose inseminante) ou sêmen convencional (mínimo 20×10^6 células/dose inseminante), em fatorial 2 por 2. Vacas apresentando DF < 9 mm na IATF receberam sêmen convencional (n = 214) ou sexado (n = 189), e vacas com DF ≥ 9 mm foram inseminadas com sêmen convencional (n = 214) ou sexado (n = 236).

Para o estudo foi utilizado sêmen oriundo de dois touros que tiveram suas doses distribuídas de acordo com a fazenda e o lote de fêmeas. Ambos os touros foram selecionados por apresentarem boa fertilidade em programas de IATF tanto para sêmen convencional quanto para sêmen sexado. Os ejaculados foram coletados por vagina artificial e continham > 65% de motilidade progressiva e > 85% de espermatozoides com morfologia normal (< 15% de defeitos primários e < 15% defeitos morfológicos secundários). Os ejaculados foram proporcionalmente distribuídos para produzir a mesma quantidade de doses inseminantes de sêmen convencional e sexado.

5.3.1.4 Exames ultrassonográficos

Todos os exames ultrassonográficos foram realizados com aparelho de ultrassom munido com transdutor linear transretal de 7,5 MHz (CTS-3300V, SIUI, China). O diâmetro do maior folículo presente no momento da IATF foi identificado e mensurado.

5.3.1.5 Descrição do procedimento de sexagem

Os procedimentos de sexagem foram realizados nas instalações da Sexing Technologies do Brasil, localizadas no município de Sertãozinho, SP, Brasil. As doses de sêmen sexado utilizadas apresentavam de 85 a 90% de pureza de células carreando o cromossomo X. Foi utilizado para a seleção, aparelho de citometria de fluxo SX MoFlo (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA), operado sob pressão de 35 psi e cerca de 40.000

procedimentos por segundo, o que resultou em taxa de separação entre 5.000 a 8.000 espermatozóides por segundo. Os espermatozóides foram corados com 112,5 mM Hoechst 33342 e classificados após filtragem em filtro descartável CellTrics (# 04-0042-2317; Partec GmbH, Munster, Alemanha). Os espermatozóides foram inspecionados com luz laser de 150 mW.

O sêmen foi congelado em meio contendo 20% gema de ovo-Tris (6% de glicerol; Technologies sexagem, Navasota, TX) e envasado em palhetas de 0,25 mL de cloreto de polivinil (sêmen sexado = $2,1 \times 10^6$ e sêmen convencional = 20×10^6 espermatozóides / palheta).

5.3.1.6 Diagnóstico de gestação

Os diagnósticos de gestação foram realizados com auxílio do ultrassom entre 30 a 42 dias após a IATF. A detecção de embrião vivo foi utilizada como um indicador positivo da gestação. A taxa de concepção foi definida como o número de fêmeas gestantes após a IATF, dividido pelo número total de fêmeas inseminadas.

5.3.1.7 Análise estatística

As variáveis foram analisadas pelo procedimento Glimmix do SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). Variáveis explanatórias como animal, lote de inseminação, ECC no início do protocolo de sincronização, tratamento, touro utilizado e suas interações foram incluídos no modelo estatístico inicial. Posteriormente as variáveis foram removidas uma a uma seguindo o critério de Wald quando o $P > 0,10$.

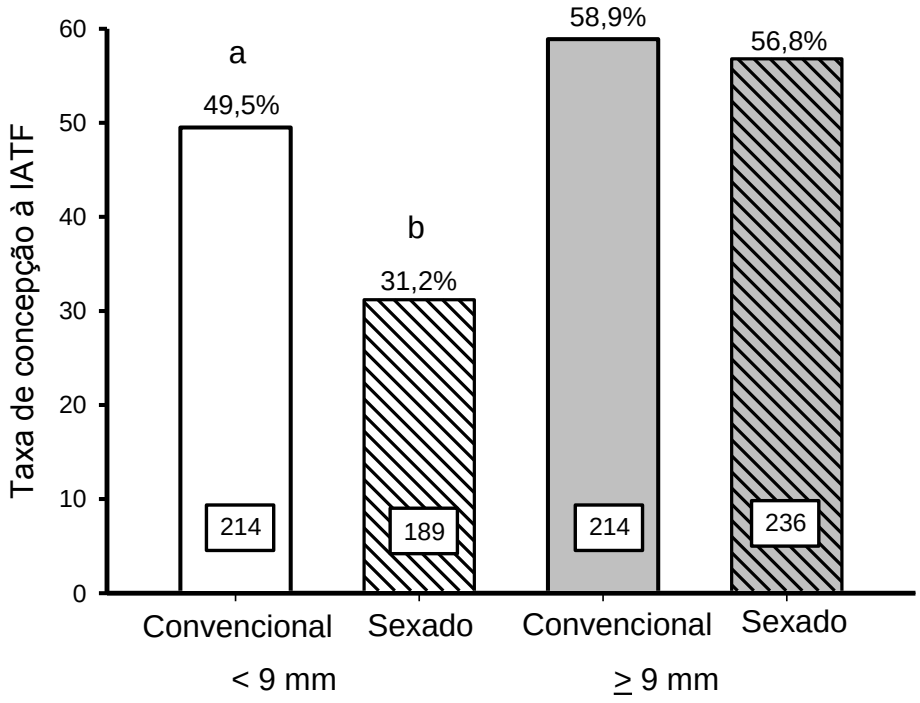
O modelo estatístico para avaliar a taxa de concepção incluiu as variáveis tipo de sêmen (sexado ou convencional), classe folicular (< 9 mm ou ≥ 9 mm), e interação entre tipo de sêmen e classe folicular.

5.4 Resultados

Não foi observado efeito ECC (P = 0,60) sobre a taxa de concepção. Também não foi observado efeito de interação entre ECC e tipo de sêmen (P = 0,59) ou classe de diâmetro folicular (P = 0,56) sobre a taxa de concepção.

Houve efeito significativo de interação (P = 0,02) entre o tipo de sêmen e a classe de diâmetro folicular (< 9 mm ou ≥ 9 mm; Figura 3) sobre a taxa de concepção. Vacas com folículos < 9 mm apresentaram maior taxa (P = 0,0002) de concepção quando inseminadas com sêmen convencional quando comparado àquelas inseminadas com sêmen sexado (49,5% vs. 31,2%, respectivamente). No entanto, não houve diferença (P = 0,65) nas fêmeas inseminadas com sêmen convencional ou sexado quando as fêmeas apresentaram folículo ≥ 9 mm no momento da IATF (58,9% e 56,8%, respectivamente).

Figura 3 - Taxa de concepção em fêmeas zebuínas lactantes de acordo com o tipo do sêmen utilizado (Convencional ou Sexado) e o diâmetro do maior folículo (DF; < 9 mm ou ≥ 9 mm) identificado e mesurado por ultrassom no momento da IATF. Foi observada interação entre o tipo de sêmen e o DF (P = 0,02). Letras a, b significam diferença (P <0,05). Os números nas caixas indicam o número de fêmeas inseminadas



5.5 EXPERIMENTO 2 – SELEÇÃO DE FÊMEAS ZEBUÍNAS LACTANTES A PARTIR DA OCORRÊNCIA DE ESTRO ENTRE A RETIRADA DO DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE P4 E A IATF PARA USO DE SÊMEN CONVENCIONAL OU SEXADO.

5.5.1 Material e métodos

5.5.1.1 Animais e local do experimento

Um total de 491 vacas Nelore pluríparas oriundas de uma fazenda comercial no município de Ananás, TO, Brasil foram utilizadas no presente estudo. Todas as fêmeas foram mantidas em pastagem de *Brachiaria brizantha*, tendo livre acesso à água e suplementação mineral. Os dados foram coletados durante os meses de novembro à março da estação reprodutiva dos anos de 2010/2011. Informação de ECC de cada vaca no início do protocolo de sincronização foi colhida.

5.5.1.2 Manejo reprodutivo e tratamento

Empregou-se tanto o manejo reprodutivo quanto o protocolo de sincronização semelhantes ao descrito no Experimento 1. No entanto, os produtos apresentaram marcas diferentes. O dispositivo intravaginal contendo 1,0 g de P4 (Sincrogest, Ouro Fino Saúde Animal, São Paulo, Brasil), o BE (Sincrodiol, Ouro Fino Saúde Animal) a $PGF_{2\alpha}$ (375.0 µg of cloprostenol sódico, Sincrocio, Ouro Fino Saúde Animal).

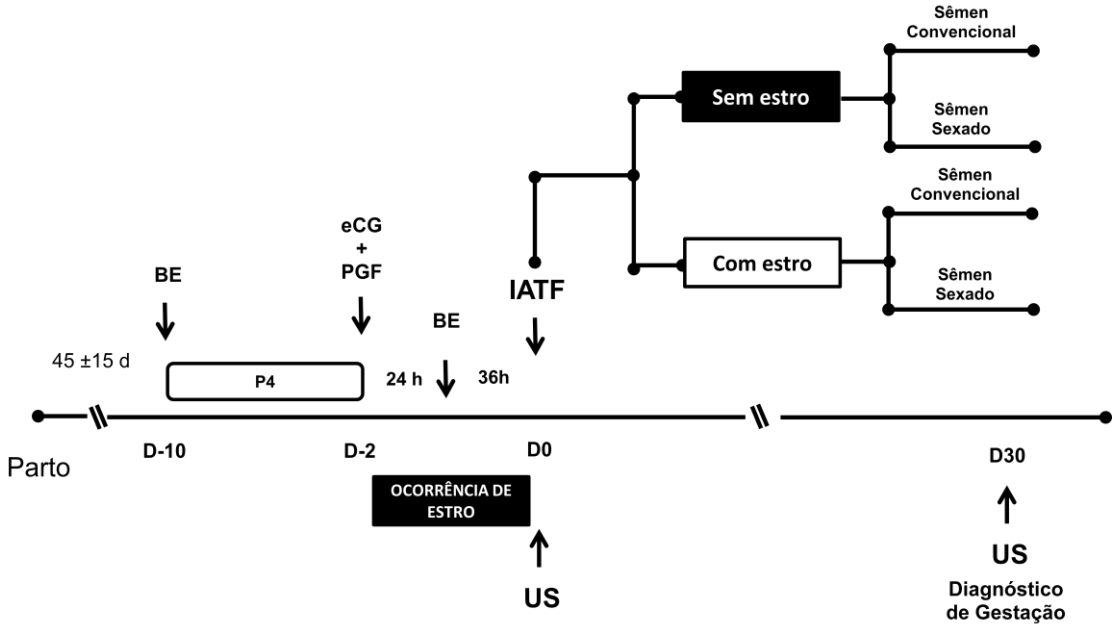
5.5.1.3 Detecção do estro

O estro foi determinado pelo uso de adesivos específicos para detecção de cio (Estrotect, IVP, Spring Valley, Wisconsin, EUA). No momento da retirada do dispositivo intravaginal as vacas receberam um adesivo que foi colado na base da cauda. A ativação do adesivo marcador foi avaliada no momento da IATF. As fêmeas que apresentavam o adesivo ativado nesse momento foram consideradas como tendo aceitado monta e, portanto, manifestado estro.

5.5.1.4 Delineamento experimental

Imediatamente antes da IATF, as vacas foram classificadas de acordo com a ocorrência ou não de estro (com ou sem estro). Após essa classificação as vacas foram aleatoriamente distribuídas para serem inseminadas utilizando sêmen sexado (mínimo de 2×10^6 células/dose inseminante) ou sêmen convencional (mínimo de 20×10^6 células /dose inseminante), em modelo experimental fatorial 2 por 2 (Figura 4). As vacas que apresentaram estro receberam sêmen convencional (n = 183) ou sêmen sexado (n = 184), e as vacas que não apresentaram estro foram inseminadas com sêmen convencional (n = 62) ou sêmen sexado (n = 62).

Figura 4 - Diagrama esquemático do experimento 2



BE = benzoato de estradiol
eCG= 300 UI gonadotrofina coriônica equina
P4 = dispositivo intravaginal de P4
IATF = inseminação artificial em tempo fixo
US = ultrassonografia transretal

Para o estudo foi utilizado sêmen oriundo de dois touros que tiveram suas doses distribuídas de acordo com a fazenda e o lote de fêmeas. Ambos os touros foram selecionados por apresentarem satisfatória fertilidade em programas de IATF tanto para sêmen convencional quanto para sêmen sexado. Os ejaculados foram coletados por vagina artificial e continha > 65% de motilidade progressiva e > 85% de espermatozoides com morfologia normal (< 15% de defeitos primários e < 15% defeitos morfológicos secundários). Os ejaculados foram proporcionalmente distribuídos para produzir a mesma quantidade de doses inseminante de sêmen convencional e sexado.

5.5.1.5 Descrição do procedimento de sexagem

Os procedimentos de sexagem foram realizados nas instalações da Sexing Technologies do Brasil, localizadas no município de Sertãozinho, SP, Brasil. As doses

de sêmen sexado utilizadas apresentavam de 85 a 90% de pureza de células carreando o cromossomo X. Foi utilizado para a seleção, aparelho de citometria de fluxo SX MoFlo (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA), operado sob pressão de 35 psi e cerca de 40.000 procedimentos por segundo, o que resultou em taxa de separação entre 5.000 a 8.000 espermatozóides por segundo. Os espermatozóides foram corados com 112,5 mM Hoechst 33342 e classificados após filtragem em filtro descartável CellTrics (# 04-0042-2317; Partec GmbH, Munster, Alemanha). Os espermatozóides foram inspecionados com luz laser de 150 mW.

O sêmen foi congelado em meio contendo 20% gema de ovo-Tris (6% de glicerol; Technologies sexagem, Navasota, TX) e envasado em palhetas de 0,25 mL de cloreto de polivinila (sêmen sexado = $2,1 \times 10^6$ e sêmen convencional = 20×10^6 espermatozóides / palheta).

5.5.1.6 Diagnóstico de gestação

Os diagnósticos de gestação foram realizados com auxílio do ultrassom entre 30 a 42 após a IATF. A detecção de embrião vivo foi utilizada como um indicador positivo da gestação. A taxa de concepção foi definida como o número de fêmeas gestantes após a IATF, dividido pelo número total de fêmeas inseminadas.

5.5.1.7 Análise estatística

As variáveis foram analisadas pelo procedimento Glimmix do SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). Variáveis explanatórias como animal, lotes de inseminação, ECC no início do protocolo de sincronização, tratamento, touro utilizado e suas interações foram incluídos no modelo estatístico inicial. Posteriormente as variáveis foram removidas uma a uma seguindo o critério de Wald quando o $P > 0,10$.

O modelo estatístico final para avaliar a taxa de concepção incluiu o tipo de sêmen (sexado ou convencional) e a ocorrência do estro. A associação entre o diâmetro

do DF no momento da IATF e a probabilidade de ocorrência de estro foi determinada. As informações individuais de cada fêmea foram agrupadas em uma única planilha para essa análise. As curvas de regressão foram obtidas utilizando os coeficientes gerados pelo artifício "interactive data analyses" do programa estatístico SAS e da fórmula y = exp (α × x + b) / [1 + exp (α × x + b)], onde: y = probabilidade de ocorrência de estro; exp = exponencial, α = inclinação da equação logística; b = intercepto da equação logística; x = diâmetro do maior folículo no da IATF em milímetros.

5.5.2 Resultados

A ocorrência de estro após o protocolo de sincronização da ovulação foi de 74,7% (367/491). As vacas que apresentaram cio tinha maior diâmetro folicular (média ± erro padrão) no momento da IATF (11,4 ± 0,19) do que as vacas que não apresentam estro (10,0 ± 0,34, P = 0,006). Além disso, o aumento do diâmetro folicular no momento da IATF foi associado a maior ocorrência de estro (P <0,001; Figura 5). Não foi observado interação (P = 0,87) entre o tipo de sêmen e a ocorrência de estro. O uso de sêmen sexado (45,9%, 113/246) resultou em menor (P = 0,05) taxa de concepção do que a utilização de sêmen convencional (54,7%; 134/245). Além disso, as vacas que apresentaram estro entre a remoção do dispositivo de P4 e a IATF apresentaram maior (P = 0,003) taxa de concepção (54,2%; 199/367) do que as fêmeas que não apresentaram estro (38,7%, 48/124), independentemente do tipo de sêmen utilizado (Figura 6). Não houve efeito do ECC no início do protocolo de sincronização da ovulação (P = 0,24) sobre a taxa de concepção. Além disso, não houve efeitos de interação entre o ECC e a ocorrência de estro (P = 0,86) ou entre o ECC e o tipo do sêmen e a ocorrência de estro (P = 0,21) sobre a taxa de concepção.

Agrupando os dados oriundos dos experimentos 1 e 2, foi possível observar uma associação positiva (P <0,001) entre o maior folículo ovariano no momento da IATF e a probabilidade de concepção, tanto quando se usa o sêmen convencional quanto após o uso de sêmen sexado (Figura 7). Além disso, a taxa de concepção após o uso de sêmen sexado (45,6%; 306/671) foi significativamente inferior (P = 0,0003) àquela obtida após uso de sêmen convencional (54,4%; 366/673), independentemente do diâmetro do FD no momento da IATF. A relação entre a taxa de concepção obtida após o uso de sêmen

sexado em relação à taxa de concepção obtida após o uso de sêmen convencional foi de 83,8%.

Figura 5 - Probabilidade de ocorrência de estro entre a remoção do dispositivo intravaginal de P4 e a IATF em vacas zebuínas lactantes (n = 491) de acordo com o diâmetro do maior folículo (DF), identificado e medido por ultrassom no momento da IATF [ocorrência de estro = exp (-2,9013 + 0,2601 × diâmetro do DF no momento da IATF / 1 + exp (-2,9013 + 0,2601 × diâmetro do DF no momento da IATF); P <0,0001)]

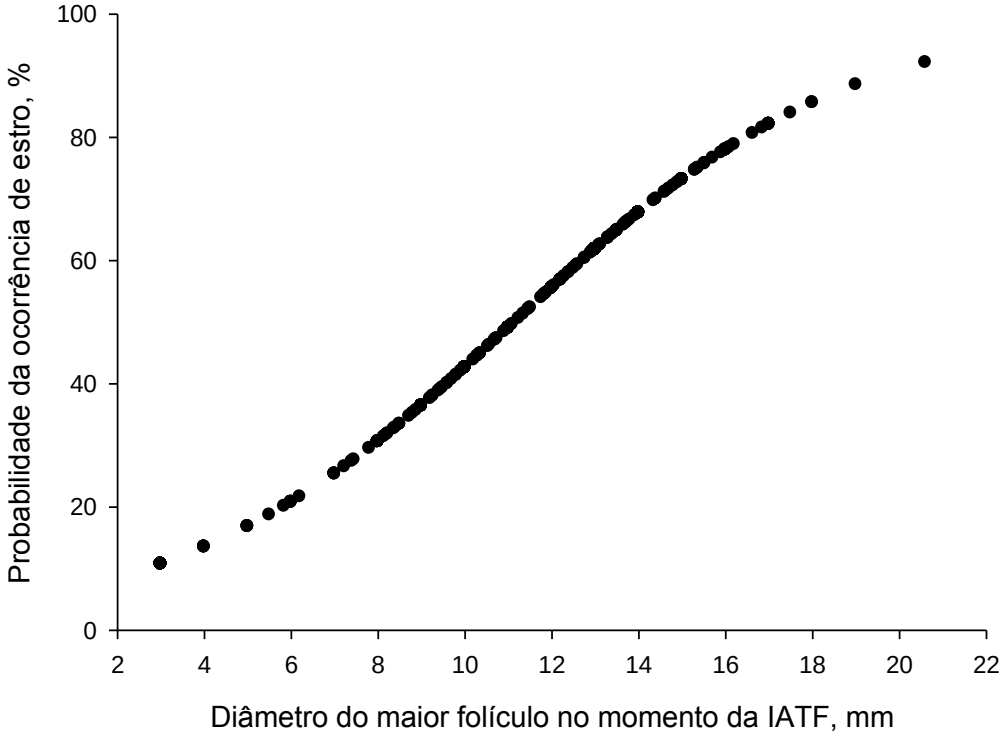


Figura 6 - Taxa de concepção de vacas zebuínas lactantes após IATF de acordo com a ocorrência de estro (com ou sem estro) entre a retirada do dispositivo de P4 e o momento da IATF, utilizando sêmen convencional ou sexado. Não houve interação entre a ocorrência de estro e o tipo do sêmen utilizado (P = 0,87). Foi observado efeito significativo da ocorrência do estro (P = 0,003) e do tipo do sêmen (P = 0,05) sobre a taxa de concepção após IATF. Os números dentro das caixas indicam o número de fêmeas inseminadas por tratamento

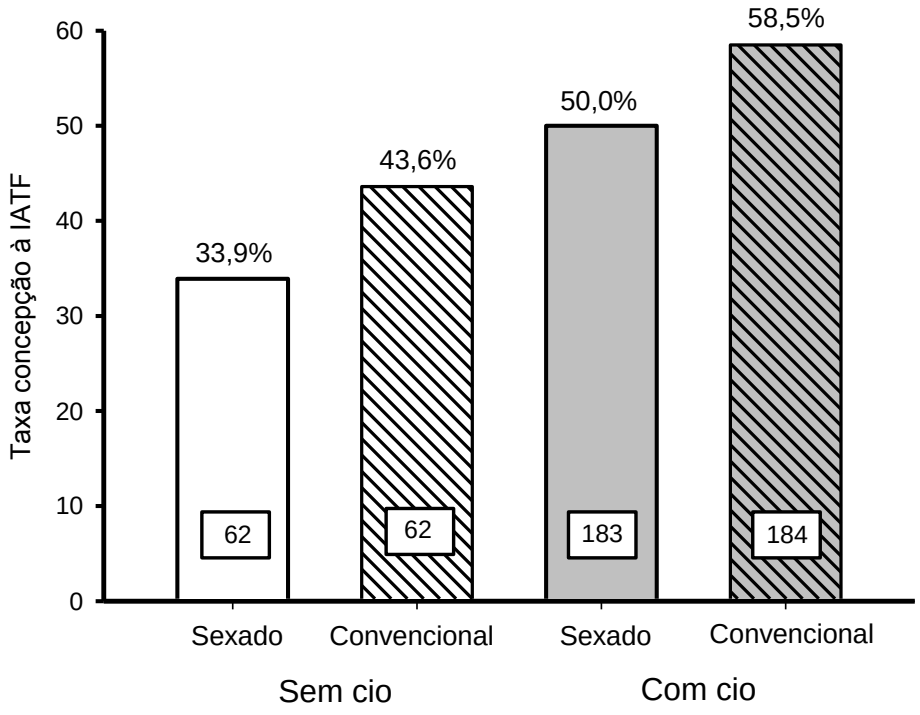
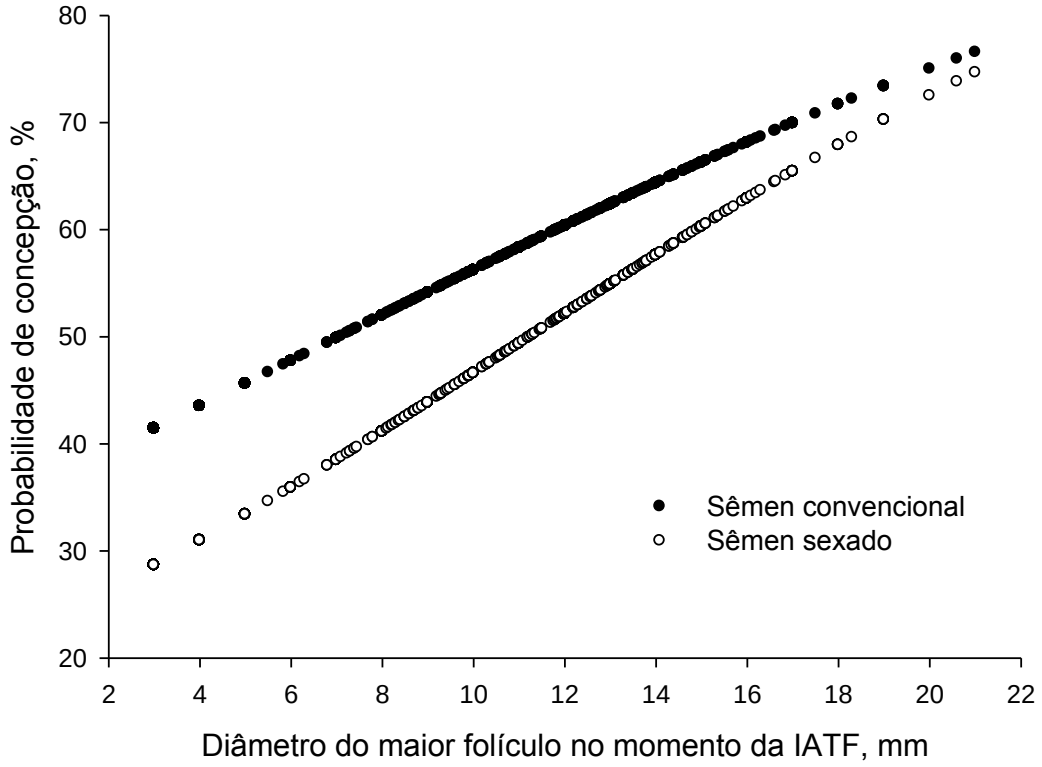


Figura 7 - Probabilidade de concepção após IATF de vacas zebuínas lactantes (n = 1344) de acordo com o tipo de sêmen utilizado [sêmen convencional (n = 673) ou sexado (n = 671) e o diâmetro do maior folículo (FD), identificado e mensurado por ultrassom no momento da IATF [Sêmen convencional=exp (-0,6018 + 0,0850*diâmetro do FD na IATF/1+exp (-0,6018 + 0,0850*diâmetro do FD na IATF); P <0,0001) ou sêmen sexado=exp (-1,2449 0,1107*diâmetro do FD na IATF / 1 + exp (-1,2449 + 0,1107*diâmetro do FD na IATF); P <0,0001)]



5.6 DISCUSSÃO

Duas estratégias práticas para melhorar o uso do sêmen sexado em programas comerciais de IATF em vacas zebuínas lactantes foram estabelecidas. No Experimento 1, maiores taxas de concepção foram obtidas quando as vacas apresentavam um folículo maior diâmetro no momento da IATF. A queda na taxa de concepção quando se emprega sêmen sexado em fêmeas com folículo de menor diâmetro no momento da IATF é superior do que quando se utiliza sêmen convencional. No Experimento 2, as fêmeas que apresentaram estro entre a retirada do dispositivo de P4 e a IATF apresentaram maiores taxas de concepção do que aquelas que não apresentaram estro, independente do tipo do sêmen utilizado (sexado ou convencional).

O diâmetro do FD no momento da IATF influencia a resposta ovariana e a taxa de concepção após protocolos de sincronização da ovulação e IATF em fêmeas taurinas e zebuínas (PERRY et al., 2005a; PERRY et al., 2007; GALVÃO; SANTOS, 2008; MENEGHETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2010c). Como demonstrado acima, fêmeas zebuínas que apresentaram um folículo ≥ 9 mm no momento da IATF apresentaram taxa de concepção semelhante após o uso de sêmen convencional ou sexado. Vacas da raça Holandesa que ovulam folículos menores, desenvolvem corpos lúteos de menor tamanho, que secreta menos P4 no diestro subsequente, quando comparadas com as vacas que ovularam folículos maiores (VASCONCELOS et al., 2001). Em outro estudo com novilhas *Bos taurus* de corte, os autores relataram que fêmeas que ovulam folículos menores do que 10,7 mm têm menor risco de manter a gestação até 60 dias, quando comparadas às novilhas que ovulam folículos maiores de 15,7 mm (PERRY et al., 2007). Em vacas zebuínas, tal efeito positivo do aumento do FD no momento da IATF sobre a taxa de ovulação e de concepção também tem sido relatada (MENEGHETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2010c).

Verificou-se que a amplitude da diferença na taxa de concepção entre as vacas inseminadas que apresentaram folículo ≥ 9 mm ou < 9 mm no momento da IATF foi maior nas fêmeas que receberam sêmen sexado, demonstrado pela interação observada entre tipo do sêmen e categoria folicular (Experimento 1). Estudos anteriores demonstraram que a taxa de concepção é melhorada quando a inseminação é realizada mais próxima do momento da ovulação (HOCKEY et al., 2010), especialmente quando touros de menor fertilidade são utilizados (MACMILLAN; WATSON, 1975). De forma

semelhante, a taxa de concepção de fêmeas inseminadas com sêmen sexado é aumentada quando a inseminação é realizada mais próxima da ocorrência da ovulação (SCHENK et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2010b; SALES et al., 2011b). Apesar da previsibilidade do momento da ovulação após o protocolo de sincronização da ovulação utilizando BE, 24 horas após a remoção do dispositivo de P4, como estímulo ovulatório (média de 66 a 72 horas após a remoção do dispositivo intravaginal de P4), o momento da ovulação é influenciado pelo diâmetro do folículo dominante no momento da administração do indutor de ovulação (NEVES, 2010). O referido autor avaliou o momento da ovulação após protocolo de sincronização da ovulação utilizando BE, administrado 24 horas após a remoção do dispositivo de P4, como indutor de ovulação em um grande número de vacas zebuínas lactantes (n = 312). Verificou-se média de 71,8 ± 7,7 horas de intervalo entre a retirada do dispositivo de P4 e a ovulação. No entanto, o momento da ovulação foi alterado pelo diâmetro do folículo ovulatório no momento da administração do indutor de ovulação. As vacas com ovulação prematura, ou seja, com ovulação 48-59 h após a remoção do dispositivo P4, apresentam folículo de maior diâmetro (14,0 ± 2,2 mm) do que vacas com ovulação atrasada (11,4 ± 2,2 mm; 73-96 h após P4 remoção do dispositivo). Além disso, as vacas que ovularam no momento esperado, ou seja, 60 a 72 h após a remoção do dispositivo de P4 apresentaram diâmetro folicular intermediário (13,6 ± 2,1 mm). Dessa forma, a maior taxa de concepção observada após o uso de sêmen sexado em vacas com folículos ≥ 9 mm no momento da IATF pode ser decorrente de maiores respostas ovarianas e, também devido ao menor intervalo entre a IATF e a ovulação das fêmeas que apresentaram maior diâmetro folicular no momento da IATF.

Uma atenção especial deve ser dada entre às diferenças na fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas no que diz respeito ao tamanho em que o folículo dominante adquire capacidade ovulatória (SARTORI et al., 2001; GIMENES et al., 2008). Em fêmeas zebuínas, a resposta ovulatória após a administração de LH porcino (pLH) ocorre em 33%, 80%, e 90% em folículos de 7 a 8,4 mm, 8,5 a 10 mm, e > 10 mm de diâmetro, respectivamente (GIMENES et al., 2008). No entanto, vacas da raça Holandesa (*Bos taurus*), a aquisição da capacidade ovulatória após desafio com pLH ocorre apenas em tamanhos ≥ 10 mm (SARTORI et al., 2001). Portanto, é necessária uma adaptação do tamanho folicular para a seleção de vacas taurinas para receberem sêmen sexado ou convencional com base no diâmetro do folículo no momento da IATF. Outros estudos são necessários para avaliar esta estratégia de manejo reprodutivo.

No presente estudo, fêmeas que apresentaram estro após o protocolo de sincronização da ovulação tiveram maior taxa de concepção do que as fêmeas que não apresentaram estro, independente do tipo de sêmen utilizado. Além disso, as fêmeas que tiveram maior diâmetro folicular no momento da IATF apresentam maior probabilidade de apresentarem estro. Da mesma forma, estudos anteriores demonstraram que vacas que apresentam estro têm maior diâmetro folicular na IATF, melhores respostas ovarianas, melhor função luteínica no diestro subsequente e maior risco de se tornarem gestantes do que aquelas fêmeas que não apresentam estro após o protocolo de sincronização da ovulação (PERRY et al., 2005a; PERRY et al., 2007; HILLEGASS et al., 2008; SÁ FILHO et al., 2011b). Portanto, a ocorrência de estro pode ser utilizada para selecionar as fêmeas com maior probabilidade de se tornarem gestantes para receberem sêmen sexado, assim, melhorando o uso comercial do sêmen sexado em programas de IATF.

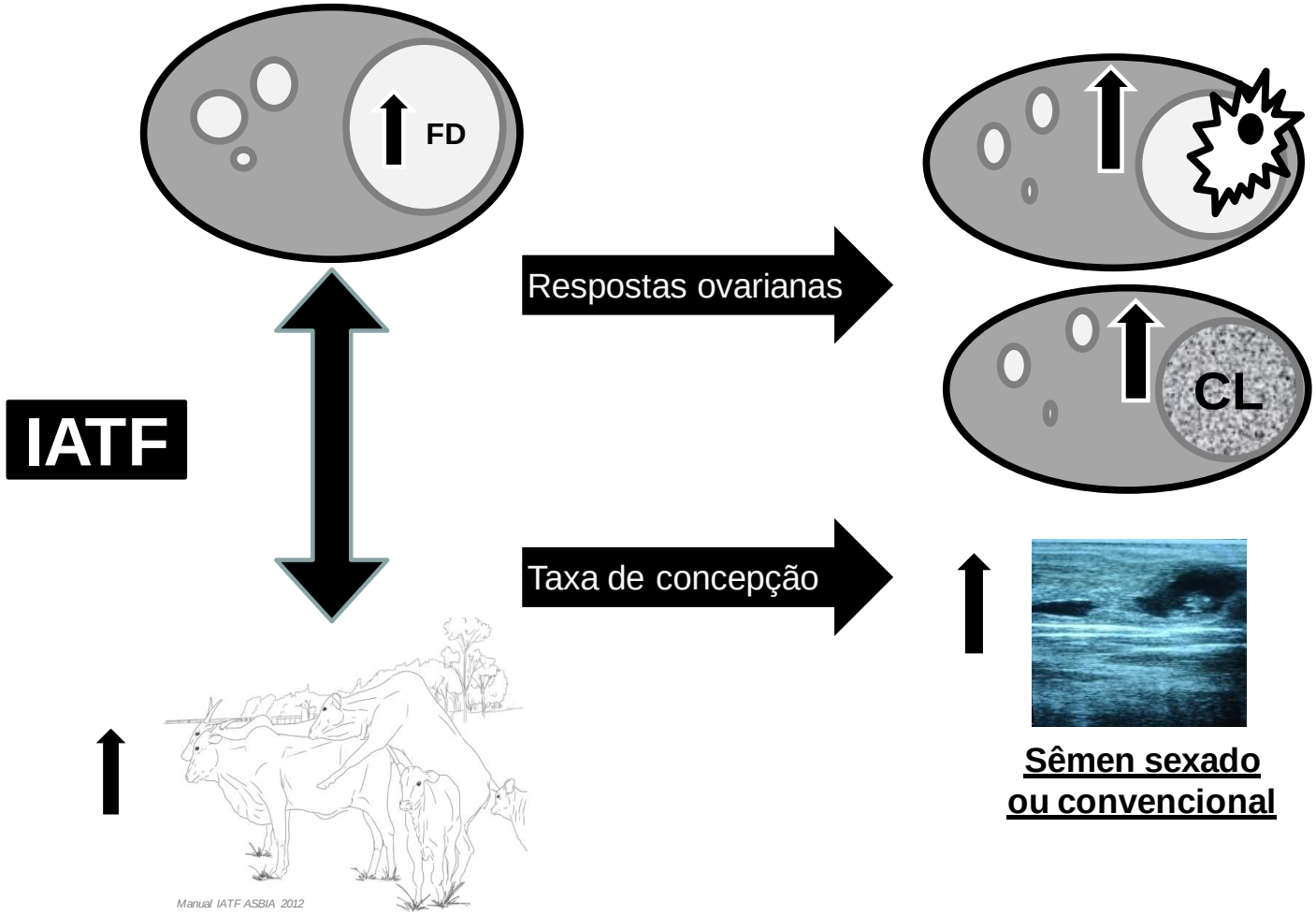
6 CONCLUSÕES

O diâmetro folicular no momento da IATF foi associado à melhores respostas ovarianas e melhor taxa de concepção das fêmeas zebuínas sincronizadas e inseminadas em tempo fixo. Além disso, o aumento do diâmetro folicular aumenta a taxa de ovulação após o protocolo de sincronização, aumenta a taxa de concepção, bem como a taxa de concepção daquelas vacas que ovularam após o protocolo de sincronização da ovulação para IATF.

A ocorrência de estro foi associada a melhor resposta ovariana e melhor taxa de concepção de vacas zebuínas lactantes submetidas a protocolos de sincronização da ovulação para IATF. Além disso, fêmeas que apresentam estro apresentam maior diâmetro folicular no momento da retirada do dispositivo intravaginal de P4 e no momento da IATF, maior taxa de ovulação e melhor função luteínica no ciclo subsequente, bem como, maior taxa de concepção após IATF. No entanto, o tratamento adicional com GnRH não melhora a taxa de concepção de fêmeas que não apresentam estro após o protocolo de sincronização da ovulação, bem como o tipo de éster de estradiol não influencia as taxas de ocorrência de estro e de concepção após a IATF.

Por fim, a ocorrência de estro após o protocolo de sincronização e o diâmetro folicular no momento da IATF podem ser utilizados como critérios de seleção para identificar fêmeas com maior probabilidade de resposta ao protocolo e de se tornarem gestantes para, assim, receberem sêmen de maior valor agregado como o sêmen sexado (Figura 1).

Figura 1 - Diagrama esquemáticos sobre a importância da ocorrência de estro e do diâmetro folicular no momento da inseminação em protocolos de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em fêmeas zebuínas de corte



7 IMPLICAÇÕES

Esse estudo estabeleceu critérios de seleção de fêmeas zebuínas que apresentam maior probabilidade de se tornarem gestantes em programas de IATF. O diâmetro do maior folículo no momento da IATF e a ocorrência de estro após o tratamento de sincronização são relacionados à melhor resposta aos protocolos de sincronização da ovulação para IATF. Tais procedimentos são facilmente aplicados e podem ser incorporados na rotina das fazendas comerciais com o intuito de melhorar a eficiência do uso de sêmen de maior valor agregado.

De maneira geral, o diâmetro do maior folículo no momento da inseminação e a ocorrência do estro influenciam positivamente a taxa de ovulação, a função luteínica no ciclo subsequente e a taxa de concepção à IATF.

Os mecanismos fisiológicos associados a melhor resposta das fêmeas aos protocolos de sincronização da ovulação ainda não estão totalmente esclarecidos. Futuras pesquisas devem investigar as bases endócrinas, bioquímicas e moleculares associadas aos períodos periovulatórios e diestro. A fertilidade das fêmeas com folículo de maior diâmetro na IATF ou que apresentam estro ao final do protocolo poderia ser explicada pela melhor qualidade oocitária, pelas condições mais favoráveis para o transporte de gametas e fertilização e pelo adequado ambiente uterino para o desenvolvimento embrionário.

REFERÊNCIAS

ACOTT, T. S.; CARR, D. W. Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: II. Interaction of pH and a quiescence factor. **Biology of Reproduction**, v. 30, n. 4, p. 926-935, 1984.

ADAMS, G. P.; JAISWAL, R.; SINGH, J.; MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 72-80, 2008.

ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; KASTELIC, J. P.; KO, J. C. H.; GINTHER, O. J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, n. 1, p. 177-188, 1992.

ALLRICH, R. D. Endocrine and neural control of estrus in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 9, p. 2738-2744, 1994.

ARLOTTO, T.; SCHWARTZ, J. L.; FIRST, N. L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, n. 5, p. 943-956, 1996.

AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; DEMÉTRIO, C. G. B.; DE LIMA, C. G.; BARUSELLI, P. S. Validation of body condition score as a predictor of subcutaneous fat in Nelore (Bos indicus) cows. **Livestock Science**, v. 123, n. 2-3, p. 175-179, 2009.

BARREIROS, T. R. R.; SENEDA, M. M.; REIS, E. L.; BARUSELLI, P. S.; BARROS, C. M. Efeito do desmame temporário na sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo. In: **Acta Scientiae Veterinariae**, p. 238–239, 2003.

BARROS, C. M.; MOREIRA, M. B. P.; FIGUEIREDO, R. A.; TEIXEIRA, A. B.; TRINCA, L. A. Synchronization of ovulation in beef cows (Bos indicus) using GnRH, PGF2α and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 53, n. 5, p. 1121-1134, 2000.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. D. O.; CARVALHO, N. A. T. D.; BERBER, R. C. D. A.; VALENTIM, R.; CARVALHO FILHO, A. F. D.; COSTA NETO, W. P. Dinâmica folicular e taxa de prenhez em novilhas receptoras de embrião (Bos taurus indicus x Bos taurus taurus) tratadas com o protocolo "Ovsynch" para inovulação em tempo fixo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 96-106, 2003.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, N. A. T.; MADUREIRA, E. H.; CAMPOS FILHO, E. P. Effect of different treatments for timed artificial insemination on the reproductive efficiency in lactating beef cows. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, p. 218-221, 2002.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, N. A. T.; VALENTIN, R.; CARVALHO, A. F.; MADUREIRA, E. H.; COSTA NETO, W. P. Dinâmica folicular em novilhas receptoras de embrião bovino submetidas à sincronização da ovulação para inovulação em tempo fixo. **XV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões**, v. 28, p. 217, 2000.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BÓ, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 479-486, 2004.

BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; NASSER, L. F.; NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M.; BÓ, G. A. Superovulation and embryo transfer in Bos indicus cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 77-88, 2006.

BARUSELLI, P. S.; SALES, J. N.; SALA, R. V.; VIEIRA, L. M.; SÁ FILHO, M. F. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 139-152, 2012.

BAUERSACHS, S.; ULBRICH, S. E.; GROSS, K.; SCHMIDT, S. E. M.; MEYER, H. H. D.; EINSPANIER, R.; WENIGERKIND, H.; VERMEHREN, M.; BLUM, H.; SINOWATZ, F.; WOLF, E. Gene expression profiling of bovine endometrium during the oestrous cycle: detection of molecular pathways involved in functional changes. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 889-908, 2005.

BAZER, F. W.; WU, G.; SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; BAYLESS, K. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 3, p. 135-152, 2009.

BERGFELT, D. R.; LIGHTFOOT, K. C.; ADAMS, G. P. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. **Theriogenology**, v. 42, n. 6, p. 895-907, 1994.

BISINOTTO, R. S.; CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E. P. Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 8, p. 3578-3587, 2010.

BISINOTTO, R. S.; SANTOS, J. E. P. The use of endocrine treatments to improve pregnancy rates in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 1, p. 258, 2012.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; NASSER, L. F.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. **Theriogenology**, v. 40, n. 2, p. 225-239, 1993.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Effect of progestogen plus estradiol-17β treatment on superovulatory response in beef cattle. **Theriogenology**, v. 45, n. 5, p. 897-910, 1996.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTINEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in Bos indicus cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 307-326, 2003.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRÍBULO, R.; TRÍBULO, H.; MAPLETOFT, R. J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 53-72, 2002.

BÓ, G. A.; CUTAIA, L.; PERES, L. C.; PINCINATO, D.; MARAÑA, D.; BARUSELLI, P. S. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of Bos indicus cattle. **Society of Reproduction Fertility Supplement**, v. 64, p. 223-236, 2007.

BÓ, G. A.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. The effect of estradiol valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cows with Syncro-Mate-B implants. **Theriogenology**, v. 36, n. 2, p. 169-183, 1991.

BREVINI-GANDOLFI, T. A. L.; FAVETTA, L. A.; MAURI, L.; LUCIANO, A. M.; CILLO, F.; GANDOLFI, F. Changes in poly(A) tail length of maternal transcripts during in vitro maturation of bovine oocytes and their relation with developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, v. 52, n. 4, p. 427-433, 1999.

BREVINI GANDOLFI, T. A. L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1255-1276, 2001.

BREVINI, T. A. L.; LONERGAN, P.; CILLO, F.; FRANCISCI, C.; FAVETTA, L. A.; FAIR, T.; GANDOLFI, F. Evolution of mRNA polyadenylation between oocyte maturation and first embryonic cleavage in cattle and its relation with developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, v. 63, n. 4, p. 510-517, 2002.

BRIDGES, G. A.; MUSSARD, M. L.; BURKE, C. R.; DAY, M. L. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 117, n. 3-4, p. 208-215, 2010.

BRIDGES, G. A.; MUSSARD, M. L.; PATE, J. L.; OTT, T. L.; HANSEN, T. R.; DAY, M. L. Impact of preovulatory estradiol concentrations on conceptus development and uterine gene expression. **Animal Reproduction Science**, v. 133, n. 1, p. 16-26, 2012.

BURKE, C. R.; MACMILLAN, K. L.; BOLAND, M. P. Oestradiol potentiates a prolonged progesterone-induced suppression of LH release in ovariectomised cows. **Animal Reproduction Science**, v. 45, n. 1–2, p. 13-28, 1996.

BURKE, C. R.; MUSSARD, M. L.; GRUM, D. E.; DAY, M. L. Effects of maturity of the potential ovulatory follicle on induction of oestrus and ovulation in cattle with oestradiol benzoate. **Animal Reproduction Science**, v. 66, n. 3, p. 161-174, 2001.

BUTTREY, B. S.; BURNS, M. G.; STEVENSON, J. S. Ovulation and pregnancy outcomes in response to human chorionic gonadotropin before resynchronized ovulation in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 73, n. 4, p. 449-459, 2010.

CACCIA, M.; BÓ, G. A. Follicle wave emergence following treatment of CIDR-implanted beef cows with estradiol benzoate and progesterone. **Theriogenology**, v. 49, n., p. 34, 2008.

CARATY, A.; SKINNER, D. C. Progesterone priming is essential for the full expression of the positive feedback effect of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. **Endocrinology**, v. 140, n. 1, p. 165-170, 1999.

CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, N. A. T.; REIS, E. L.; NICHI, M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in Bos indicus, Bos indicus×Bos taurus, and Bos taurus heifers. **Theriogenology**, v. 69, n. 2, p. 167-175, 2008.

CAVALIERI, J.; HEPWORTH, G.; FITZPATRICK, L. A.; SHEPHARD, R. W.; MACMILLAN, K. L. Manipulation and control of the estrous cycle in pasture-based dairy cows. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 45-64, 2006.

CERRI, R. L. A.; CHEBEL, R. C.; RIVERA, F.; NARCISO, C. D.; OLIVEIRA, R. A.; AMSTALDEN, M.; BAEZ-SANDOVAL, G. M.; OLIVEIRA, L. J.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. P. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and uterine responses. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 7, p. 3352-3365, 2011.

CERRI, R. L. A.; SANTOS, J. E. P.; JUCHEM, S. O.; GALVÃO, K. N.; CHEBEL, R. C. Timed artificial insemination with estradiol cypionate or insemination at estrus in high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 11, p. 3704-3715, 2004.

CHEBEL, R. C.; GUAGNINI, F. S.; SANTOS, J. E. P.; FETROW, J. P.; LIMA, J. R. Sex-sorted semen for dairy heifers: Effects on reproductive and lactational performances. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 6, p. 2496-2507, 2010.

CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E. P. Effect of inseminating cows in estrus following a presynchronization protocol on reproductive and lactation performances. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 10, p. 4632-4643, 2010.

CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E. P.; REYNOLDS, J. P.; CERRI, R. L. A.; JUCHEM, S. O.; OVERTON, M. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 84, n. 3-4, p. 239-255, 2004.

CLARKE, I. J. Control of GnRH secretion: One step back. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 32, n. 3, p. 367-375, 2011.

CLARKSON, J.; D'ANGLEMONT DE TASSIGNY, X.; MORENO, A. S.; COLLEDGE, W. H.; HERBISON, A. E. Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 35, p. 8691-8697, 2008.

CLARKSON, J.; HERBISON, A. E. Oestrogen, kisspeptin, GPR54 and the pre-ovulatory luteinising hormone surge. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 21, n. 4, p. 305-311, 2009.

COLAZO, M. G.; GORDON, M. B.; RAJAMAHENDRAN, R.; MAPLETOFT, R. J.; AMBROSE, D. J. Pregnancy rates to timed artificial insemination in dairy cows treated with gonadotropin-releasing hormone or porcine luteinizing hormone. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 262-270, 2009.

COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; DAVIS, H.; RUTLEDGE, M. D.; MARTINEZ, M. F.; SMALL, J. A.; MAPLETOFT, R. J. Effects of plasma progesterone concentrations on LH release and ovulation in beef cattle given GnRH. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 34, n. 1, p. 109-117, 2008.

COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. **Theriogenology**, v. 60, n. 5, p. 855-865, 2003.

DALTON, J. C.; NADIR, S.; BAME, J. H.; NOFTSINGER, M.; NEBEL, R. L.; SAACKE, R. G. Effect of time of insemination on number of accessory sperm, fertilization rate, and embryo quality in nonlactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 11, p. 2413-2418, 2001.

DE VRIES, A.; OVERTON, M.; FETROW, J.; LESLIE, K.; EICKER, S.; ROGERS, G. Exploring the impact of sexed semen on the structure of the dairy industry. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 2, p. 847-856, 2008.

DEJARNETTE, J. M.; LEACH, M. A.; NEBEL, R. L.; MARSHALL, C. E.; MCCLEARY, C. R.; MORENO, J. F. Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers: Is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible? **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 7, p. 3477-3483, 2011.

DEJARNETTE, J. M.; NEBEL, R. L.; MARSHALL, C. E. Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. **Theriogenology**, v. 71, n. 1, p. 49-58, 2009.

DRANSFIELD, M. B. G.; NEBEL, R. L.; PEARSON, R. E.; WARNICK, L. D. Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 7, p. 1874-1882, 1998.

DRION, P. V.; DE ROOVER, R.; HOUTAIN, J. Y.; MCNAMARA, E. M.; REMY, B.; SULON, J.; BECKERS, J. F. Increase of plasma eCG binding rate after administration of repeated high dose of eCG to cows. **Reproduction Nutrition Development**, v. 41, n. 3, p. 207-215, 2001.

ESTRADA, K. M.; CLAY, C. M.; POMPOLO, S.; SMITH, J. T.; CLARKE, I. J. Elevated KiSS-1 Expression in the Arcuate Nucleus Prior to the Cyclic Preovulatory Gonadotrophin-Releasing Hormone/Lutenising Hormone Surge in the Ewe Suggests a Stimulatory Role for Kisspeptin in Oestrogen-Positive Feedback. Journal of **Neuroendocrinology**, v. 18, n. 10, p. 806-809, 2006.

EVANS, N. P.; DAHL, G. E.; MAUGER, D.; KARSCH, F. J. Estradiol induces both qualitative and quantitative changes in the pattern of gonadotropin-releasing hormone secretion during the presurge period in the ewe. **Endocrinology**, v. 136, n. 4, p. 1603-1609, 1995a.

EVANS, N. P.; DAHL, G. E.; MAUGER, D. T.; PADMANABHAN, V.; THRUN, L. A.; KARSCH, F. J. Does estradiol induce the preovulatory gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge in the ewe by inducing a progressive change in the mode of operation of the GnRH neurosecretory system. **Endocrinology**, v. 136, n. 12, p. 5511-5519, 1995b.

FAO. **FOOD AGRIGULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS** - Food outlook global market analysis: secondary title, 2011.

FERNANDES, P.; TEIXEIRA, A. B.; CROCCI, A. J.; BARROS, C. M. Timed artificial insemination in beef cattle using Gn RH agonist, PGF2alpha and estradiol benzoate (EB). **Theriogenology**, v. 55, n. 7, p. 1521-1532, 2001.

FIELDS, S. D.; GEBHART, K. L.; PERRY, B. L.; GONDA, M. G.; WRIGHT, C. L.; BOTT, R. C.; PERRY, G. A. 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 steriodogenic enzyme expression. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 42, n. 1, p. 11-19, 2012.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. P. Ovarian follicular dynamics in nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1489-1505, 1997.

FIKE, K. E.; KOJIMA, F. N.; LINDSEY, B. R.; BERGFELD, E. G. M.; QUINTAL-FRANCO, J. A.; MELVIN, E. J.; ZANELLA, E. L.; WEHRMAN, M. E.; KINDER, J. E. Regulation of frequency of luteinizing hormone pulses by magnitude of acute change in circulating concentration of progesterone of female cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 84, n. 3-4, p. 279-291, 2004.

FORDE, N.; BELTMAN, M. E.; LONERGAN, P.; DISKIN, M.; ROCHE, J. F.; CROWE, M. A. Oestrous cycles in Bos taurus cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3-4, p. 163-169, 2011.

GALBIATI, M.; MARTINI, L.; MELCANGI, R. C. Role of glial cells, growth factors and steroid hormones in the control of LHRH-secreting neurons. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 25, n., p. 101-108, 2003.

GALBIATI, M.; SAREDI, S.; MELCANGI, R. C. Steroid hormones and growth factors act in an integrated manner at the levels of hypothalamic astrocytes. **Steroids and the Nervous System**, v. 1007, n. 1, p. 162-168, 2003.

GALVÃO, K. N.; SÁ FILHO, M. F.; SANTOS, J. E. P. Reducing the interval from presynchronization to initiation of timed artificial insemination improves fertility in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 9, p. 4212-4218, 2007.

GALVÃO, K. N.; SANTOS, J. E. P. Factors affecting synchronization and conception rate after the ovsynch protocol in lactating Holstein cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 3, p. 439-446, 2008.

GARCIA-ISPIERTO, I.; LÓPEZ-HELGUERA, I.; MARTINO, A.; LÓPEZ-GATIUS, F. Reproductive performance of anoestrous high-producing dairy cows improved by adding equine chorionic gonadotrophin to a progesterone-based oestrous synchronizing protocol. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 5, p. 752-758, 2012.

GARCIA-SEGURA, L. M.; LORENZ, B.; DONCARLOS, L. L. The role of glia in the hypothalamus: implications for gonadal steroid feedback and reproductive neuroendocrine output. **Reproduction**, v. 135, n. 4, p. 419-429, 2008.

GARCIA-SEGURA, L. M.; MCCARTHY, M. M. Minireview: Role of glia in neuroendocrine function. **Endocrinology**, v. 145, n. 3, p. 1082-1086, 2004.

GARNER, D. L.; SEIDEL JR, G. E. History of commercializing sexed semen for cattle. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 886-895, 2008.

GEARY, T. W.; WHITTIER, J. C.; DOWNING, E. R.; LEFEVER, D. G.; SILCOX, R. W.; HOLLAND, M. D.; NETT, T. M.; NISWENDER, G. D. Pregnancy rates of postpartum beef cows that were synchronized using Syncro-Mate-B or the Ovsynch protocol. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 6, p. 1523-1527, 1998.

GEARY, T. W.; WHITTIER, J. C.; HALLFORD, D. M.; MACNEIL, M. D. Calf removal improves conception rates to the Ovsynch and CO-Synch protocols. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 1, p. 1-4, 2001.

GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; CARVALHO, N. A. T.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; SOUZA, A. H.; MADUREIRA, E. H.; TRINCA, L. A.; SARTORELLI, E. S.; BARROS, C. M.; CARVALHO, J. B. P.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Follicle deviation and ovulatory capacity in Bos indicus heifers. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 852-858, 2008.

GOODMAN, R. L. Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. In: Press, R. (Ed.). **The physiology of reproduction**. New York: Knobil E, Neill JD, 1993. v.2, p.659-709.

GOSÁLVEZ, J.; RAMIREZ, M. A.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; CRESPO, F.; EVANS, K. M.; KJELLAND, M. E.; MORENO, J. F. Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: II. Dynamic features. **Theriogenology**, v. 75, n. 2, p. 206-211, 2011.

GREGG, D. W.; NETT, T. M. Direct effects of estradiol-17 beta on the number of gonadotropin-releasing hormone receptors in the ovine pituitary. **Biology of Reproduction**, v. 40, n. 2, p. 288-293, 1989.

HAMERNIK, D. L.; CLAY, C. M.; TURZILLO, A.; VAN KIRK, E. A.; MOSS, G. E. Estradiol increases amounts of messenger ribonucleic acid for gonadotropin-releasing hormone receptors in sheep. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 1, p. 179-185, 1995.

HANLON, D. W.; WILLIAMSON, N. B.; WICHTEL, J. J.; STEFFERT, I. J.; CRAIGIE, A. L.; PFEIFFER, D. U. Ovulatory responses and plasma luteinizing hormone concentrations in dairy heifers after treatment with exogenous progesterone and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 47, n. 5, p. 963-975, 1997.

HAWK, H. W. Transport and fate of spermatozoa after insemination of cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 7, p. 1487-1503, 1987.

HAWK, H. W. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 12, p. 2645-2660, 1983.

HERBISON, A. E. Third Edition - Chapter 28 - Physiology of the gonadotropin-releasing hormone neuronal network. Knobil and Neill's **Physiology of Reproduction**. St Louis: Academic press, 2006, p.1415-VII.

HERBISON, A. E. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. **Endocrine Reviews**, v. 19, n. 3, p. 302-330, 1998.

HIERS, E. A.; BARTHLE, C. R.; DAHMS, M. V.; PORTILLO, G. E.; BRIDGES, G. A.; RAE, D. O.; THATCHER, W. W.; YELICH, J. V. Synchronization of Bos indicus × Bos taurus cows for timed artificial insemination using gonadotropin-releasing hormone plus prostaglandin F2α in combination with melengestrol acetate. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 4, p. 830-835, 2003.

HILLEGASS, J.; LIMA, F. S.; SÁ FILHO, M. F.; SANTOS, J. E. P. Effect of time of artificial insemination and supplemental estradiol on reproduction of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 11, p. 4226-4237, 2008.

HOCKEY, C. D.; MORTON, J. M.; NORMAN, S. T.; MCGOWAN, M. R. Improved prediction of ovulation time may increase pregnancy rates to artificial insemination in lactating dairy cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 6, p. e239-e248, 2010.

HOLLINSHEAD, F. K.; GILLAN, L.; O'BRIEN, J. K.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. In vitro and in vivo assessment of functional capacity of flow cytometrically sorted ram spermatozoa after freezing and thawing. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 15, n. 6, p. 351-359, 2003.

JENKINS, T. G.; FERRELL, C. L. Lactation characteristics of nine breeds of cattle fed various quantities of dietary energy. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 6, p. 1652-1660, 1992.

JOHNSON, L. A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, n. 0, p. 93-107, 2000.

JOHNSON, M. L.; REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Uterine growth, cell proliferation, and c-fos proto-oncogene expression throughout the estrous cycle in ewes. **Biology of Reproduction**, v. 56, n. 2, p. 393-401, 1997a.

JOHNSON, M. L.; REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Effects of ovarian steroids on uterine growth, morphology, and cell proliferation in ovariectomized, steroid-treated ewes. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 3, p. 588-596, 1997b.

JONES, J. M.; BAVISTER, B. D. Acidification of intracellular pH in bovine spermatozoa suppresses motility and extends viable life. **Journal of Andrololgy**, v. 21, n. 5, p. 616-624, 2000.

KASIMANICKAM, R.; DAY, M. L.; RUDOLPH, J. S.; HALL, J. B.; WHITTIER, W. D. Two doses of prostaglandin improve pregnancy rates to timed-AI in a 5-day progesterone-based synchronization protocol in beef cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 762-767, 2009.

KIEBORZ-LOOS, K. R.; GARVERICK, H. A.; KEISLER, D. H.; HAMILTON, S. A.; SALFEN, B. E.; YOUNGQUIST, R. S.; SMITH, M. F. Oxytocin-induced secretion of prostaglandin F2α in postpartum beef cows: Effects of progesterone and estradiol-17β treatment. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 7, p. 1830-1836, 2003.

KINDER, J. E.; KOJIMA, F. N.; BERGFELD, E. G.; WEHRMAN, M. E.; FIKE, K. E. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 6, p. 1424-1440, 1996.

KRSMANOVIC, L. Z.; HU, L.; LEUNG, P.-K.; FENG, H.; CATT, K. J. The hypothalamic GnRH pulse generator: multiple regulatory mechanisms. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 20, n. 8, p. 402-408, 2009.

KWAKOWSKY, A.; HERBISON, A. E.; ÁBRAHÁM, I. M. The role of cAMP response element-binding protein in estrogen negative feedback control of gonadotropin-releasing hormone neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 33, p. 11309-11317, 2012.

LAMB, G. C.; STEVENSON, J. S.; KESLER, D. J.; GARVERICK, H. A.; BROWN, D. R.; SALFEN, B. E. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F2alpha for ovulation control in postpartum suckled beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 9, p. 2253-2259, 2001.

LAMMING, G. E.; MANN, G. E. Control of endometrial oxytocin receptors and prostaglandin F2α production in cows by progesterone and oestradiol. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, n. 1, p. 69-73, 1995.

LAWS, S. C.; WEBSTER, J. C.; MILLER, W. L. Estradiol alters the effectiveness of gonadotropin- releasing hormone (GnRH) in ovine pituitary cultures: GnRH receptors versus responsiveness to GnRH. **Endocrinology**, v. 127, n. 1, p. 381-386, 1990.

LOOPER, M. L.; VIZCARRA, J. A.; WETTEMANN, R. P.; MALAYER, J. R.; BRADEN, T. D.; GEISERT, R. D.; MORGAN, G. L. Influence of estradiol, progesterone, and nutrition on concentrations of gonadotropins and GnRH receptors, and abundance of mRNA for GnRH receptors and gonadotropin subunits in pituitary glands of beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 1, p. 269-278, 2003.

LOPEZ, H.; SATTER, L. D.; WILTBANK, M. C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 81, n. 3-4, p. 209-223, 2004.

LUCY, M. C.; MCDOUGALL, S.; NATION, D. P. The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, n., p. 495-512, 2004.

LYIMO, Z. C.; NIELEN, M.; OUWELTJES, W.; KRUIP, T. A. M.; EERDENBURG, F. J. C. M. V. Relationship among estradiol, cortisol and intensity of estrous behavior in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 53, n. 9, p. 1783-1795, 2000.

MAATJE, K.; LOEFFLER, S. H.; ENGEL, B. Predicting optimal time of insemination in cows that show visual signs of estrus by estimating onset of estrus with pedometers. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 6, p. 1098-1105, 1997.

MACKEY, D. R.; SREENAN, J. M.; ROCHET, J. F.; DISKIN, M. G. The effect of progesterone alone or in combination with estradiol on follicular dynamics, gonadotropin profiles, and estrus in beef cows following calf isolation and restricted suckling. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 7, p. 1917-1929, 2000.

MACMILLAN, K. L.; SEGWAGWE, B. V. E.; PINO, C. S. Associations between the manipulation of patterns of follicular development and fertility in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 327-344, 2003.

MACMILLAN, K. L.; THATCHER, W. W. Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 45, n. 6, p. 883-889, 1991.

MACMILLAN, K. L.; WATSON, J. D. Fertility differences between groups of sires relative to the stage of oestrus at the time of insemination. **Animal Science**, v. 21, n. 03, p. 243-249, 1975.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrous cycle in the cow. **Animal Reproduction Science**, v. 64, n. 3, p. 171-180, 2000.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Effect of the level of oestradiol on oxytocin-induced prostaglandin F2α release in the cow. **Journal of Endocrinology**, v. 145, n. 1, p. 175-180, 1995.

MANTOVANI, A. P. **Immunological response to equine chorionic gonadotropin (eCG) in Bos taurus and Bos indicus heifers.** Departament of Animal Reproduction, University of São Paulo, São Paulo, 2010.

MARTIN, I.; TORRES NETO, R.; OBA, E.; BURATINI JR, J.; BINELLI, M.; LAUFER-AMORIM, R.; FERREIRA, J. C. P. Immunohistochemical detection of receptors for oestrogen and progesterone in endometrial glands and stroma during the oestrous cycle in Nelore (Bos taurus indicus) cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 4, p. 415-421, 2008.

MARTINEZ, M. F.; ADAMS, G. P.; BERGFELT, D. R.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 57, n. 1–2, p. 23-33, 1999.

MARTINEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; ADAMS, G. P.; JANZEN, E.; MCCARTNEY, D. H.; MAPLETOFT, R. J. Estrus synchronization and pregnancy rates in beef cattle given CIDR-B, prostaglandin and estradiol, or GnRH. **Canadian Veterinary Journal**, v. 41, n., p. 786-790, 2000.

MARTÍNEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; BÓ, G. A.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R. J. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 86, n. 1-2, p. 37-52, 2005.

MARTÍNEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. The use of estradiol and/or GnRH in a two-dose PGF protocol for breeding management of beef heifers. **Theriogenology**, v. 62, n. 1, p. 363-372, 2004.

MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G.; HOLLINSHEAD, F. K.; BATHGATE, R.; DE GRAAF, S. P.; ERIKSSON, B. M.; GILLAN, L.; MORTON, K. M.; O'BRIEN, J. K. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, n., p. 79-95, 2004.

MEMBRIVE, C. M. B. **Estudo da sincronização das ondas foliculares e das características de estros, por radio telemetría, em novilhas cruzadas (Bos indicus × Bos taurus) tratadas com acetato de melengestrol e prostaglandina associados a hCG, GnRH ou 17b estradiol + progesterona.** Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

MENEGHETTI, M.; FILHO, O. G. S.; PERES, R. F. G.; LAMB, G. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for Bos indicus cows I: Basis for development of protocols. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 179-189, 2009.

MOCÉ, E.; GRAHAM, J. K.; SCHENK, J. L. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 929-936, 2006.

MOENTER, S. M.; CARATY, A.; KARSCH, F. J. The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. **Endocrinology**, v. 127, n. 3, p. 1375-1384, 1990.

MOORE, N. W. The use of embryo transfer and steroid hormone replacement therapy in the study of prenatal mortality. **Theriogenology**, v. 23, n., p. 121-129, 1985.

MOREIRA, F.; DE LA SOTA, R. L.; DIAZ, T.; THATCHER, W. W. Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 6, p. 1568-1576, 2000.

MURAMATSU, M.; INOUE, S. Estrogen receptors: How do they control reproductive and nonreproductive functions? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 270, n. 1, p. 1-10, 2000.

MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrine Reviews**, v. 12, n. 1, p. 27-44, 1991.

MUSSARD, M. L.; BURKE, C. R.; BEHLKE, E. J.; GASSER, C. L.; DAY, M. L. Influence of premature induction of a luteinizing hormone surge with gonadotropin-releasing hormone on ovulation, luteal function, and fertility in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 4, p. 937-943, 2007.

MUSSARD, M. L.; BURKE, C. R.; BEHLKE, E. J.; GASSER, C. L.; DAY, M. L. Influence of premature induction of a luteinizing hormone surge with gonadotropin-releasing hormone on ovulation, luteal function, and fertility in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 4, p. 937-943, 2006.

NEBEL, R. L.; WALKER, W. L.; MCGILLIARD, M. L.; ALLEN, C. H.; HECKMAN, G. S. Timing of artificial insemination of dairy cows: fixed time once daily versus morning and afternoon. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 10, p. 3185-3191, 1994.

NEVES, K. A. L. **Effect of interval between insemination and ovulation in conception rates in Nelore cows timed AI with sex-sorted.** Departament of Animal Reproduction, University of São Paulo, São Paulo, 2010.

O'ROURKE, M.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M.; ROCHE, J. F. The effect of dose and route of oestradiol benzoate administration on plasma concentrations of oestradiol and FSH in long-term ovariectomised heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 59, n. 1–2, p. 1-12, 2000.

ODDE, K. G. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 3, p. 817-830, 1990.

OLIVEIRA, V. C. D.; FONTES, C. A. D. A.; SIQUEIRA, J. G. D.; FERNANDES, A. M.; SANT´ANA, N. D. F.; CHAMBELA NETO, A. Produção de leite e desempenho dos bezerros de vacas Nelore e mestiças. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n., p. 2074-2081, 2007.

PATTERSON, D. J.; KIRACOFE, G. H.; STEVENSON, J. S.; CORAH, L. R. Control of the bovine estrous cycle with melengestrol acetate (MGA): A Review. **Journal of Animal Science**, v. 67, n. 8, p. 1895-1906, 1989.

PAWSON, A. J.; MCNEILLY, A. S. The pituitary effects of GnRH. **Animal Reproduction Science**, v. 88, n. 1, p. 75-94, 2005.

PENTEADO, L.; AYRES, H.; MADUREIRA, E. H.; REIS, E. L.; BARUSELLI, P. S. Efeito do eCG e do desmame temporário na taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes inseminadas em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 223, 2004.

PERES, R. F. G.; JÚNIOR, I. C.; FILHO, O. G. S.; NOGUEIRA, G. P.; VASCONCELOS, J. L. M. Strategies to improve fertility in Bos indicus postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v. 72, n. 5, p. 681-689, 2009.

PERRY, G. A.; PERRY, B. L. Effect of preovulatory concentrations of estradiol and initiation of standing estrus on uterine pH in beef cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 333-338, 2008.

PERRY, G. A.; SMITH, M. F.; LUCY, M. C.; GREEN, J. A.; PARKS, T. E.; MACNEIL, M. D.; ROBERTS, A. J.; GEARY, T. W. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 14, p. 5268-5273, 2005a.

PERRY, G. A.; SMITH, M. F.; ROBERTS, A. J.; MACNEIL, M. D.; GEARY, T. W. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 3, p. 684-689, 2007.

PERRY, G. A.; WELSHONS, W. V.; BOTT, R. C.; SMITH, M. F. Basis of melengestrol acetate action as a progestin. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 28, n. 2, p. 147-161, 2005b.

PETERS, M. W.; PURSLEY, J. R. Timing of final GnRH of the Ovsynch protocol affects ovulatory follicle size, subsequent luteal function, and fertility in dairy cows. **Theriogenology**, v. 60, n. 6, p. 1197-1204, 2003.

PETERSON, C. A.; HUHN, J. C.; KESLER, D. J. Norgestomet- and oestradiol valerate-induced luteolysis is dependent upon the uterus. **Animal Reproduction Science**, v. 58, n. 3, p. 253-259, 2000.

PINHEIRO, O. L.; BARROS, C. M.; FIGUEIREDO, R. A.; DO VALLE, E. R.; ENCARNAÇÃO, R. O.; PADOVANI, C. R. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2α or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v. 49, n. 3, p. 667-681, 1998.

POHLER, K. Y.; GEARY, T. C.; ATKINS, J.; PERRY, G.; JINKS, E.; SMITH, M. Follicular determinants of pregnancy establishment and maintenance. Cell **and Tissue Research**, v.1, p. 1-16, 2012.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2α and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915-923, 1995.

RAY, D. E. Oestrous response of ovariectomized beef heifers to oestradiol benzoate and human chorionic gonadotrophin. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 10, n. 3, p. 329-335, 1965.

REVAH, I.; BUTLER, W. R. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, n. 1, p. 39-47, 1996.

ROBINSON, R.; MANN, G.; LAMMING, G.; WATHES, D. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 965-979, 2001.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assisted reproductive techniques for cattle breeding in developing countries: A critical appraisal of their value and limitations. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n., p. 21-26, 2012.

ROELOFS, J.; LÓPEZ-GATIUS, F.; HUNTER, R. H. F.; VAN EERDENBURG, F. J. C. M.; HANZEN, C. When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. **Theriogenology**, v. 74, n. 3, p. 327-344, 2010.

ROSENFELD, C. S.; ROBERTS, R. M.; LUBAHN, D. B. Estrogen receptor- and aromatase-deficient mice provide insight into the roles of estrogen within the ovary and uterus. **Molecular Reproduction and Development**, v. 59, n. 3, p. 336-346, 2001.

SÁ FILHO, M. F.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; MARQUES, M. O.; REIS, E. L.; SILVA, R. C. P.; RODRIGUES, C. A.; MADUREIRA, E. H.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. **Theriogenology**, v. 73, n. 5, p. 651-658, 2010a.

SÁ FILHO, M. F.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; NICHI, M.; FOSADO, M.; CAMPOS FILHO, E. P.; BARUSELLI, P. S. Strategies to improve pregnancy per insemination using sex-sorted semen in dairy heifers detected in estrus. **Theriogenology**, v. 74, n. 9, p. 1636-1642, 2010b.

SÁ FILHO, M. F.; BALDRIGHI, J. M.; SALES, J. N. S.; CREPALDI, G. A.; CARVALHO, J. B. P.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for Bos indicus cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 129, n. 3–4, p. 132-139, 2011a.

SÁ FILHO, M. F.; CRESPILHO, A. M.; SANTOS, J. E. P.; PERRY, G. A.; BARUSELLI, P. S. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled Bos indicus cows. **Animal Reproduction Science**, v. 120, n. 1-4, p. 23-30, 2010c.

SÁ FILHO, M. F.; PENTEADO, L.; REIS, E. L.; SOUZA REIS, T.; GALVÃO, K. N.; BARUSELLI, P. S. Timed artificial insemination earlier during the breeding season improves the reproductive performance of suckled beef cows. **Theriogenology**, v. submmited, n., p., 2012.

SÁ FILHO, M. F.; SANTOS, J. E. P.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N. S.; BARUSELLI, P. S. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled Bos indicus cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 455-463, 2011b.

SÁ FILHO, M. F.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; PENTEADO, L.; GIMENES, L. U.; FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; CASTRO E PAULA, L. A.; SALES, J. N. S.; BARUSELLI, P. S. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (Bos indicus) heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 118, n. 2-4, p. 182-187, 2010d.

SÁ FILHO, O. G.; MENEGHETTI, M.; PERES, R. F.; LAMB, G. C.; VASCONCELOS, J. L. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for Bos indicus cows II: strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 210-218, 2009a.

SÁ FILHO, O. G.; VILELA, E. R.; GEARY, T. W.; VASCONCELOS, J. L. Strategies to improve fertility in postpartum multiparous Bos indicus cows submitted to a fixed-time insemination protocol with gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin F2alpha. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 9, p. 2806-2814, 2009b.

SAACKE, R. G. Insemination factors related to timed AI in cattle. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 479-484, 2008.

SAACKE, R. G.; DALTON, J. C.; NADIR, S.; NEBEL, R. L.; BAME, J. H. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Animal Reproduction Science**, v. 60, n., p. 663-677, 2000.

SALES, J. N. S.; CARVALHO, J. B. P.; CREPALDI, G. A.; CIPRIANO, R. S.; JACOMINI, J. O.; MAIO, J. R. G.; SOUZA, J. C.; NOGUEIRA, G. P.; BARUSELLI, P. S. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of

synchronized ovulations in Bos indicus cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 510-516, 2012.

SALES, J. N. S.; CREPALDI, G. A.; GIROTTO, R. W.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 1-2, p. 12-18, 2011a.

SALES, J. N. S.; NEVES, K. A. L.; SOUZA, A. H.; CREPALDI, G. A.; SALA, R. V.; FOSADO, M.; FILHO, E. P. C.; DE FARIA, M.; FILHO, M. F. S.; BARUSELLI, P. S. Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 427-435, 2011b.

SANTOS, J. E. P.; RUTIGLIANO, H. M.; SÁ FILHO, M. F. Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 110, n. 3-4, p. 207-221, 2009.

SANTOS, J. E. P.; THATCHER, W. W.; CHEBEL, R. C.; CERRI, R. L. A.; GALVÃO, K. N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, n., p. 513-535, 2004.

SARTORI, R.; FRICKE, P. M.; FERREIRA, J. C. P.; GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1403-1409, 2001.

SAVIO, J. D.; THATCHER, W. W.; MORRIS, G. R.; ENTWISTLE, K.; DROST, M.; MATTIACCI, M. R. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, n. 1, p. 77-84, 1993.

SCHENK, J. L.; CRAN, D. G.; EVERETT, R. W.; SEIDEL, G. E. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 717-728, 2009.

SCHENK, J. L.; SUH, T. K.; SEIDEL, G. E. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. **Theriogenology**, v. 65, n. 2, p. 299-307, 2006.

SCHMITT, E. J.; DROST, M.; DIAZ, T.; ROOMES, C.; THATCHER, W. W. Effect of a gonadotropin-releasing hormone agonist on follicle recruitment and pregnancy rate in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 1, p. 154-161, 1996.

SEIDEL JR, G. E. Overview of sexing sperm. **Theriogenology**, v. 68, n. 3, p. 443-446, 2007.

SENGER, P. L. The estrus detection problem: new concepts, technologies, and possibilities. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 9, p. 2745-2753, 1994.

SHIMIZU, T.; KREBS, S.; BAUERSACHS, S.; BLUM, H.; WOLF, E.; MIYAMOTO, A. Actions and interactions of progesterone and estrogen on transcriptome profiles of the bovine endometrium. **Physiological Genomics**, v. 42A, n. 4, p. 290-300, 2010.

SMALL, J. A.; COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 698-706, 2009.

SMITH, M.; JENNES, L. Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. **Reproduction**, v. 122, n. 1, p. 1-10, 2001.

SOARES, J. G.; MARTINS, C. M.; CARVALHO, N. A. T.; NICACIO, A. C.; ABREU-SILVA, A. L.; CAMPOS FILHO, E. P.; TORRES JÚNIOR, J. R. S.; SÁ FILHO, M. F.; BARUSELLI, P. S. Timing of insemination using sex-sorted sperm in embryo production with Bos indicus and Bos taurus superovulated donors. **Animal Reproduction Science**, v. 127, n. 3-4, p. 148-153, 2011.

SOUZA, A. H.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; WILTBANK, M. C. A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 70, n. 2, p. 208-215, 2008.

SOUZA, A. H.; VIECHNIESKI, S.; LIMA, F. A.; SILVA, F. F.; ARAÚJO, R.; BÓ, G. A.; WILTBANK, M. C.; BARUSELLI, P. S. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. **Theriogenology**, v. 72, n. 1, p. 10-21, 2009.

STEVENSON, J. S.; CARTMILL, J. A.; HENSLEY, B. A.; EL-ZARKOUNY, S. Z. Conception rates of dairy cows following early not-pregnant diagnosis by ultrasonography and subsequent treatments with shortened Ovsynch protocol. **Theriogenology**, v. 60, n. 3, p. 475-483, 2003.

STOCK, A. E.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. **Endocrinology**, v. 132, n. 3, p. 1108-1114, 1993.

THATCHER, W. W.; BILBY, T. R.; BARTOLOME, J. A.; SILVESTRE, F.; STAPLES, C. R.; SANTOS, J. E. P. Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 30-44, 2006.

THATCHER, W. W.; MACMILLAN, K. L.; HANSEN, P. J.; DROST, M. Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. **Theriogenology**, v. 31, n. 1, p. 149-164, 1989.

TWAGIRAMUNGU, H.; GUILBAULT, L. A.; DUFOUR, J. J. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 10, p. 3141-3151, 1995.

TWAGIRAMUNGU, H.; GUILBAULT, L. A.; PROULX, J.; DUFOUR, J. J. Synchronization of estrus and fertility in beef cattle with two injections of buserelin and prostaglandin. **Theriogenology**, v. 38, n. 6, p. 1131-1144, 1992a.

TWAGIRAMUNGU, H.; GUILBAULT, L. A.; PROULX, J.; VILLENEUVE, P.; DUFOUR, J. J. Influence of an agonist of gonadotropin-releasing hormone (buserelin) on estrus synchronization and fertility in beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 6, p. 1904-1910, 1992b.

VASCONCELOS, J. L. M.; FILHO, O. G. S.; PEREZ, G. C.; SILVA, A. T. N. Intravaginal progesterone device and/or temporary weaning on reproductive performance of anestrous crossbred Angus×Nelore cows. **Animal Reproduction Science**, v. 111, n. 2-4, p. 302-311, 2009.

VASCONCELOS, J. L. M.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H. N.; GUENTHER, J. G.; WILTBANK, M. C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v. 56, n. 2, p. 307-314, 2001.

VASCONCELOS, J. L. M.; SILCOX, R. W.; ROSA, G. J. M.; PURSLEY, J. R.; WILTBANK, M. C. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 52, n. 6, p. 1067-1078, 1999.

VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; PARRILLA, I.; ROCA, J.; GIL, M. A.; VAZQUEZ, J. L. Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 59, n. 7, p. 1605-1614, 2003.

WALKER, W. L.; NEBEL, R. L.; MCGILLIARD, M. L. Time of ovulation relative to mounting activity in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 9, p. 1555-1561, 1996.

WILLIAMS, S. W.; STANKO, R. L.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, G. L. Comparison of three approaches for synchronization of ovulation for timed artificial insemination in Bos indicus-influenced cattle managed on the Texas gulf coast. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 5, p. 1173-1178, 2002.

WILTBANK, J. N. Research needs in beef cattle reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 31, n. 4, p. 755-762, 1970.

WILTBANK, M. C.; GÜMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 21-52, 2002.

WILTBANK, M. C.; SARTORI, R.; HERLIHY, M. M.; VASCONCELOS, J. L. M.; NASCIMENTO, A. B.; SOUZA, A. H.; AYRES, H.; CUNHA, A. P.; KESKIN, A.; GUENTHER, J. N.; GUMEN, A. Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1568-1582, 2011.

WILTBANK, M. C.; SOUZA, A. H.; CARVALHO, P. D.; BENDER, R. W.; NASCIMENTO, A. B. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 1, p. 238, 2012.

WOLFENSON, D.; THATCHER, W. W.; SAVIO, J. D.; BADINGA, L.; LUCY, M. C. The effect of a GnRH analogue on the dynamics of follicular development and synchronization of estrus in lactating cyclic dairy cows. **Theriogenology**, v. 42, n. 4, p. 633-644, 1994.

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