

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

**DINÂMICA OVARIANA DE FÊMEAS ZEBUÍNAS SUBMETIDAS A  
DIFERENTES PROTOCOLOS DE RESSINCRONIZAÇÃO  
SUPERPRECOCE DE ESTRO E OVULAÇÃO**

**MARIANA ALVES DE ANDRADE SILVA**

Salvador - BA

2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

**DINÂMICA OVARIANA DE FÊMEAS ZEBUÍNAS SUBMETIDAS A  
DIFERENTES PROTOCOLOS DE RESSINCRONIZAÇÃO  
SUPERPRECOCE DE ESTRO E OVULAÇÃO**

**MARIANA ALVES DE ANDRADE SILVA**

Médica Veterinária

Salvador - BA

2022

**MARIANA ALVES DE ANDRADE SILVA**

**DINÂMICA OVARIANA DE FÊMEAS ZEBUÍNAS SUBMETIDAS A  
DIFERENTES PROTOCOLOS DE RESSINCRONIZAÇÃO  
SUPERPRECOCE DE ESTRO E OVULAÇÃO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos da Universidade Federal da Bahia, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal nos Trópicos

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientador: Prof. Dr. Antônio de Lisboa Ribeiro Filho

Coorientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Galvão Loiola

Salvador – Ba

2022

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Alves de Andrade Silva, Mariana  
DINÂMICA OVARIANA DE FÊMEAS ZEBUÍNAS SUBMETIDAS A  
DIFERENTES PROTOCOLOS DE RESSINCRONIZAÇÃO  
SUPERPRECOCE DE ESTRO E OVULAÇÃO / Mariana Alves de  
Andrade Silva. -- Salvador, 2022.  
96 f.

Orientador: Antonio de Lisboa Ribeiro Filho.  
Coorientador: Marcus Vinícius Galvão Loiola.  
Tese (Doutorado - Pós Graduação em Ciência Animal  
nos Trópicos) -- Universidade Federal da Bahia, Escola  
de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2022.

1. IATF. 2. Dinâmica ovariana. 3. Ovulação. 4.  
Hormônios. 5. Doppler . I. de Lisboa Ribeiro Filho,  
Antonio. II. Galvão Loiola, Marcus Vinícius. III.  
Título.

**DINÂMICA OVARIANA DE FÊMEAS ZEBUÍNAS SUBMETIDAS A  
DIFERENTES PROTOCOLOS DE RESSINCRONIZAÇÃO  
SUPERPRECOCE DE ESTRO E OVULAÇÃO**

**MARIANA ALVES DE ANDRADE SILVA**

Defesa Final de Doutorado

Salvador, de 01 de agosto de 2022

Comissão Examinadora:

---

Prof. Dr. Antonio de Lisboa Ribeiro Filho  
EMEVZ/UFBA

---

Prof. Dr João Carlos Pinheiro Ferreira  
UNESP/Botucatu

---

Profa. Dra. Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva  
UFV

---

Prof. Dr Luiz Fernando Batista Pinto  
EMEVZ/UFBA

---

Prof. Dr. Caio Victor Damasceno Carvalho  
UFOB

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

MARIANA ALVES DE ANDRADE SILVA – Nascido em 30 de agosto de 1990, na cidade de Amargosa - BA. Concluiu o ensino médio na Escola Criação, Amargosa – BA, em 2007 e iniciou o Curso de Graduação em Medicina Veterinária na UFRB em 2008. Em 2014, ingressou na Residência em Reprodução e Obstetrícia Veterinária na UFBA - Salvador - BA, permanecendo na mesma instituição para a realização do mestrado em Ciência Animal nos Trópicos, sob a orientação do Prof. Dr. Antonio de Lisboa Ribeiro Filho, defendendo a dissertação intitulada “Marcadores para diagnóstico precoce de gestação em fêmeas zebuínas submetidas à IATF” em 06 de agosto de 2018. Em agosto de 2018 ingressou no doutorado em Ciência Animal nos Trópicos – UFBA.

“ Sonhar é verbo, é seguir,  
é pensar, é inspirar,  
é fazer força, insistir,  
é lutar, é transpirar.  
São mil verbos que vêm antes  
do verbo realizar.

Sonhar é ser sempre meio,  
é ser meio indeciso,  
meio chato, meio bobo,  
é ser meio improvisado,  
meio certo, meio errado,  
é ter só meio juízo.

Sonhar é ser meio doido  
é ser meio trapaceiro,  
trapaceando o real  
pra ser meio verdadeiro.  
Na vida, bom é ser meio,  
não tem graça ser inteiro.

O inteiro é o completo,  
não carece acrescentar,  
é sem graça, é insosso,  
é não ter por que lutar.  
Quem é meio é quase inteiro  
e o quase nos faz sonhar...”

Braúlio Bessa - Sonhar

Aos meus Amados.

## AGRADECIMENTOS

A Deus como meu guia em todos os momentos.

À minha linda família, Nelcy, Gilson, Angela, Lucas, Gabriela, Vinícius e Monna, com a qual eu sempre posso contar e estão apostos para festejar as minhas vitórias.

À Dona Amada e Glorinha (*in memoriam*) pelo exemplo de força e luta das mulheres.

Ao professor Antonio de Lisboa, pela confiança e inspiração à docência.

Ao professor Chalhoub, Rodrigo, Marcus Vinícius, Gusmão e Carmo pelo acolhimento e todos os ensinamentos passados. Agradeço todas as oportunidades que me trouxeram até aqui.

Aos meus amigos do Grupo de Reprodução Animal da UFBA, em especial à Bia, Endrigo, Alexandra, pelas incontáveis parcerias e a todo grupo que me acolheu desde a chegada na residência.

À Verônica, por todo apoio e amizade que temos mantido, mesmo com a distância, todo esse tempo.

Ao Senhor Atílio, Marinês e Géssica pela amizade e confiança ao ceder a fazenda Beckmann para realização do trabalho, assim como aos funcionários Amilton e seu filho, Murilo.

À minha pequena e eficiente equipe de trabalho, Bia, Lucas, Gessica e Hugo. Sem vocês esse trabalho não teria sido possível. Muito obrigada

À professora Thereza Cristina Borio dos Santos Calmon de Bittencourt pela colaboração na análise estatística do estudo. Ao amigo Neto pela colaboração com as revisões do texto.

Ao Setor de Reprodução Animal da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMEVZ) da UFBA que concedeu os equipamentos e materiais de consumo necessários para desenvolvimento da pesquisa.

Ao Laboratório de Imunologia do ICS da UFBA pelas dosagens hormonais de progesterona realizadas para o experimento.

A CAPES pelo auxílio financeiro concedido através da bolsa de doutorado.

Muito obrigada a todos que fizeram e fazem parte da minha vida!

## RESUMO

SILVA, M. A. A. **Dinâmica ovariana de fêmeas zebuínas submetidas a diferentes protocolos de ressincronização superprecoce de estro e ovulação.** Salvador, 2022, 94p. Tese (Doutoranda em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal da Bahia, 2022.

Objetivou-se caracterizar o efeito de 1 mg de benzoato de estradiol (BE) na estrutura do corpo lúteo de 12 dias, assim como avaliar o crescimento folicular de fêmeas submetidas a quatro diferentes tipos de protocolos hormonais que propiciam sincronização de estro e ovulação. Dessa maneira, foram utilizadas 33 fêmeas bovinas (*Bos taurus indicus*), criadas em sistema extensivo. Tais fêmeas foram submetidas a um primeiro protocolo de sincronização de estro e ovulação, iniciando com a inserção de um dispositivo de progesterona associado à aplicação de 2,0 mg de BE. Oito dias após, os dispositivos de progesterona foram removidos, e realizada aplicação de 12,5 mg de dinoprost trometamina, 0,5 mg de cipionato de estradiol e 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG), pela via intramuscular. Após 22 dias do início do protocolo citado acima, foram iniciados os protocolos de ressincronização superprecoce. Inicialmente, os animais que apresentaram corpo lúteo, 21 vacas, foram divididos em grupo 1 ( 11 animais) e 2 (10 animais), todas receberam implante intravaginal de progesterona. As fêmeas que estavam inclusas no grupo 2, além do implante de progesterona, receberam também 1,0 mg de BE (Capítulo 1). A partir do momento da inserção dos implantes, por três dias, todas as vacas foram avaliadas a cada 24 horas com o intuito de identificar alterações no corpo lúteo presente nos ovários. Foi realizada mensuração de diâmetro, área e área de vascularização dos corpos lúteos. Posteriormente, as 21 fêmeas foram redistribuídas em 4 grupos experimentais: G1, contendo sete animais; G2, com seis animais; G3, contando com quatro animais; e G4, com quatro animais. Oito dias (D8) após a inserção dos dispositivos do G1 e G2, foram removidos os dispositivos intravaginais e realizada aplicação de 12,5mg de dinoprost trometamina, 0,5mg de cipionato de estradiol e 300 UI de eCG todos por via intramuscular. Sete dias (D7) após o início da ressincronização das fêmeas do G3 e G4, foi realizada aplicação de 12,5 mg de dinoprost trometamina (i.m.). Nove dias (D9) após a inserção dos dispositivos de G3

e G4, prosseguiu-se com remoção dos mesmos, aplicação de 0,5mg de cipionato de estradiol e 300 UI de eCG. Entre 48 e 52 horas após a remoção dos implantes intravaginais, todas as fêmeas foram inseminadas por um técnico experiente. As avaliações para acompanhamento da dinâmica folicular iniciaram a partir do momento da aplicação do dinoprost trometamina, sendo realizadas a cada 12 horas, até que tenha sido identificada a ovulação, ou 96 horas após a remoção dos implantes, tais dados estão contemplados no capítulo 2 desse trabalho. Todas as avaliações de ovários contaram com a utilização de ultrassonografia em modo B e *power doppler*, assim como o diâmetro folicular, a área folicular e a área de vascularização da parede folicular. Para a análise de progesterona sérica, o sangue das fêmeas foi coletado no dia zero do protocolo de ressincronização, no dia da aplicação do dinoprost trometamina e no dia na inseminação artificial em tempo fixo. As características estruturais e funcionais do CL foram similares em todos os protocolos com ou sem aplicação do benzoato de estradiol. Foi realizada teste de Friedman para avaliar em que medida os níveis de ACL eram equivalentes nos diferentes tempos (D0, D1 e D2), obtendo-se resultados estatisticamente significativos ( $P=0,008$ ). Testes de Wilcoxon Signed Rank, a posteriori, demonstraram que no D0 a ACL foi significativamente maior que no D1 e no D2. Os mesmos testes estatísticos foram feitos para avaliação de VCL ao longo do tempo, demonstraram que no D0 a VCL não foi maior que no D1, porém foi maior do que no D2. Desta forma, sugere-se que não houve influência da aplicação do Benzoato de estradiol na morfofunção do CL, podendo ser uma ferramenta útil da ressincronização de fêmeas para IATF. As avaliações foliculares não apresentaram diferença significativa entre os quatro grupos avaliados.

**Palavras-chave:** IATF, doppler, folículo, corpo lúteo.

## ABSTRACT

SILVA, M. A. A. **Ovarian dynamics of zebu females submitted to different super-early estrus resynchronization and ovulation protocols 12 days after FTAI.** Salvador, 2022, 63p. Tese (Doctoral Student in Animal Science in the Tropics) – School of Veterinary Medicine and Animal Science – Universidade Federal da Bahia, 2022.

The objective of this study was to characterize the effect of 1mg of estradiol benzoate (EB) on the 12-day corpus luteum structure, as well as to evaluate the follicular growth of females submitted to four different types of hormonal protocol that provide estrus and ovulation synchronization. Thus, 33 *Bos taurus indicus* females, from an extensive farming, were used. Such females were submitted to a first protocol of estrus and ovulation synchronization, starting with the insertion of a progesterone device associated with the application of 2.0mg of EB. Eight days later, the progesterone devices were removed, and 12.5mg of dinoprost tromethamine, 0.5mg of estradiol cypionate and 300 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG) were administered, all intramuscularly. After 22 days from the beginning of the protocol mentioned above, the super-early resynchronization protocols were started. Thus, 13 females received intravaginal progesterone device, comprising the females of group one and two (G1, containing seven animals and G2 with six animals, respectively), in addition, the females of G1 received 1.0mg of EB. Twenty-three days after the start of the first synchronization protocol, eight females received the intravaginal progesterone device, comprising females from groups three and four (G3 with four animals and G4 with four animals, respectively). In addition, females from G3 received 1.0mg of EB. Seven days after the beginning of resynchronization of females from G3 and G4, 12.5mg of dinoprost tromethamine (i.m.) was applied. Eight days after the intravaginal device insertion of the G1 and G2, they were removed and 12.5mg of dinoprost tromethamine, 0.5mg of estradiol cypionate and 300 IU of eCG were administered. Nine days after insertion of the G3 and G4 devices, they were removed, 0.5mg of estradiol cypionate and 300 IU of eCG were applied. From the moment of intravaginal devices insertion, for three days, all cows were evaluated every 24 hours in order to identify changes in

the corpus luteum present in the ovaries. Evaluations to monitor follicular dynamics started from the moment of application of dinoprost tromethamine, being performed every 12 hours, until ovulation has been identified, or 96 hours after intravaginal devices removal. All evaluations of the ovaries relied on the use of B-mode ultrasound and power doppler. Diameter, area, area of vascularization of the corpora lutea were measured, as well as follicular diameter, follicular area and area of vascularization of the follicular wall. For serum progesterone analysis, blood was collected from the females on day zero of the resynchronization protocol, on the day of application of dinoprost tromethamine and on the day of fixed-time artificial insemination. The structural and functional post-ovulatory characteristics of the CL were similar in all protocols with or without application of estradiol benzoate. A Friedman ANOVA was performed to assess the extent to which ACL levels were equivalent at different times (D0, D1 and D2), obtaining statistically significant results ( $P=0.008$ ). Wilcoxon Signed Rank tests, a posteriori, showed that on D0 the ACL was significantly higher than on D1 and D2. The same statistical tests were performed for the assessment of LCV over time. The results were statistically significant ( $P=0.01$ ). Wilcoxon Signed Rank tests, a posteriori, showed that on D0 the VCL was not significantly higher than on D1, but it was higher than on D2. The difference in VAS level between D1 and D2 was not significant. In this way, it is suggested that there was no influence of the application of estradiol benzoate on the morphofunction of the CL, which could be a useful tool for resynchronization of females for FTAI.

**Keywords:** FTAI, doppler, follicle, corpus luteum.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	13
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1 FOLICULOGÊNESE.....	16
2.2 LUTEOGÊNESE, LUTEÓLISE E AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL.....	18
2.3 RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO.....	23
2.4 PROTOCOLOS DE RESSINCRONIZAÇÃO.....	25
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	28
3.1 OBJETIVO GERAL.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
<b>4. HIPÓTESES</b> .....	28
<b>5. CAPÍTULO 1: Avaliação luteal após uso do benzoato de estradiol em protocolo de ressinchronização superprecoce de estro e ovulação</b> .....	29
<b>6. CAPÍTULO 2: Dinâmica folicular de fêmeas zebuínas submetidas a diferentes protocolos de ressinchronização superprecoce para IATF</b> .....	51
<b>REFERÊNCIAS GERAIS</b> .....	80
<b>ANEXO</b> .....	90

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui o maior rebanho comercial de bovinos e é o maior exportador de carne bovina do mundo, com cerca de 218 milhões de cabeças, (IBGE, 2020). Apesar disto, o país ainda perde para os Estados Unidos no quesito produção de carne bovina, mesmo com um rebanho aproximadamente 2,33 vezes menor que o brasileiro (ABIEC, 2019).

As condições edafoclimáticas brasileiras permitem a criação de bovinos a pasto em todo território nacional durante as quatro estações do ano. Essas características barateiam a produção e oferecem potencial para que o Brasil seja o maior produtor de carne bovina do mundo. Para isso, é necessário o investimento na melhoria dos indicadores zootécnicos dos sistemas pecuários, principalmente no que diz respeito a eficiência reprodutiva já que esse indicador está diretamente ligado a produção anual de bezerros (BARUSELLI et al., 2017).

A eficiência reprodutiva é principalmente afetada por fatores incidentes sobre vacas criadas a pasto em condições tropicais, que ocasiona o aumento do intervalo entre partos (IEP) e, conseqüentemente, baixos índices reprodutivos. Dessa forma, alternativas para melhorar esse indicador zootécnico podem se basear em: redução do IEP, identificação de morte embrionária precoce e das fêmeas não gestantes o mais rápido possível, garantindo a esses animais novas oportunidades de serem trabalhados e ficarem gestantes durante a estação de monta (BARUSELLI et al., 2013).

Diante desse cenário, a ressincronização da ovulação tem sido muito utilizada para aumentar a eficiência reprodutiva dos rebanhos em programas para IATF. Essa técnica traz vantagens como: concentração da concepção no início da estação de monta (EM), maior taxa de gestação ao final da EM associada ao maior número de bezerros oriundos da IATF, promovendo o melhoramento genético do rebanho (BARUSELLI et al., 2019). Além disso, é comprovado que fêmeas que emprenham no início da EM, conseqüentemente parem no começo da estação de parição e desmamam bezerros mais pesados (AZEREDO et al., 2007).

Os tratamentos hormonais para o protocolo de ressincronização podem ser iniciados em diferentes momentos após a primeira IATF. A ressincronização

convencional tem início no momento do diagnóstico de gestação (DG), 30 dias após a IATF, quando as fêmeas bovinas diagnosticadas como não gestantes, são submetidas a um novo protocolo hormonal. Todavia, com esse método as fêmeas só terão a chance de engravidarem 40 dias após a primeira tentativa, sendo inseminadas três vezes em um intervalo de 80 dias (MARQUES et al., 2012).

Para reduzir o intervalo entre as inseminações foi desenvolvida a ressincronização precoce, na qual o protocolo é iniciado em todas as fêmeas 22 dias após a IATF, independente do DG, sendo submetidas aos DG convencional no dia 30 e somente as fêmeas não gestantes seguem no protocolo para serem submetidas à IATF no dia 32. Dessa forma, é possível realizar três inseminações em um intervalo de 64 dias (SÁ FILHO et al., 2014).

Com a implementação da ultrassonografia modo Doppler na rotina veterinária e suas aplicações na reprodução de bovinos é possível realizar o diagnóstico superprecoce da gestação de 20 a 22 dias após a IATF com base na vascularização do corpo lúteo para identificar as fêmeas não gestantes. Diante disso, foi desenvolvida a ressincronização superprecoce que possibilita a realização de três inseminações em 48 dias. Esse método se inicia aos 14 dias pós IATF e aos 22 dias as fêmeas são submetidas ao diagnóstico superprecoce e os animais não gestantes são inseminados com 24 dias (PUGLIESI et al., 2017).

Entretanto, o início desse protocolo coincide com um período anterior ao reconhecimento materno-fetal da gestação, que é uma fase crítica para a manutenção desta. Uma vez que o estrógeno participa da cascata luteolítica, a utilização de protocolos hormonais para a ressincronização superprecoce da ovulação a base de estradiol e progestágenos podem causar a lise lútea, impossibilitando a manutenção da gestação (PUGLIESI et al., 2012).

Estudos anteriores avaliaram os efeitos da administração de 17- $\beta$ -estradiol (E2) ou benzoato de estradiol (BE) após a IATF sobre as características luteais e taxa de concepção. Burke et al. (2000) relataram que a aplicação de 1mg BE no dia 13 do ciclo estral de vacas holandesas não lactantes comprometeu o diâmetro e função luteal. Corroborando com esses achados,

Vieira et al. (2014) observaram que o uso de 1,5 mg de BE 13 dias após a inseminação reduziu a vascularização do corpo lúteo e, conseqüentemente, diminuiu a taxa de gestação da primeira IATF de vacas holandesas lactantes.

Contraopondo esses resultados, Leyva et al. (2016) afirmaram que a aplicação de 1 mg de éster de estradiol 13 dias após a inseminação de vacas holandesas não afetou a taxa de concepção quando comparado ao grupo controle. Em concordância com esses resultados, Motta et al. (2020) relataram que a administração de 1 mg de BE ou 1 mg de E2 + 9 mg de progesterona (P4) injetável, associados a um dispositivo intravaginal de P4 para a ressincronização da ovulação 14 dias após a IATF de novilhas da raça nelore anteciparam a luteólise, mas não comprometeu a manutenção da gestação das fêmeas gestantes.

Diante do exposto, é possível observar que os resultados do uso do E2 ou BE, em protocolos de ressincronização superprecoce, sobre a atividade luteal ainda são controversos na literatura. Devido a importância desse método para otimizar a EM e melhorar a eficiência reprodutiva dos rebanhos de corte nacionais, são necessários novos estudos para esclarecer os efeitos do uso desses hormônios sobre a atividade luteal e sua capacidade de sincronização de nova onda folicular.

Outro fator que vem sendo amplamente estudado constitui o momento de aplicação da PGF2 $\alpha$ . Peres et al. (2009) , em protocolos de IATF a base de progesterona e estrógeno, estudaram o efeito de aplicação da PGF2 $\alpha$  no dia sete em relação ao dia nove, verificando que fêmeas não lactantes que tiveram o tratamento com PGF2 $\alpha$  no dia sete do protocolo demonstraram níveis baixos de progesterona e maiores diâmetros foliculares durante a o programa de IATF, sendo ambas as características associadas a uma maior taxa de concepção. Em concordância a estes achados, Meneghetti et al. (2009), ao administrarem a PGF2 $\alpha$  no dia sete em vacas zebuínas, obtiveram altas taxas de concepção em fêmeas com presença de CL em comparação aquelas que receberam o hormônio no dia nove.

A antecipação da luteólise em um protocolo de IATF tem sido associada ao aumento do período de proestro e melhores condições reprodutivas, sendo caracterizado pela elevação das concentrações de estradiol próximo da IA, redução da possibilidade de perda embrionária pela menor ocorrência de ciclos curtos e aumento das concentrações de progesterona após a IA (DADARWAL et al., 2013)

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **Foliculogênese**

O crescimento, o desenvolvimento e a maturação dos folículos ovarianos são processos fundamentais para alta eficiência reprodutiva. Um número fixo de folículos primordiais é estabelecido durante o desenvolvimento fetal, o seu crescimento, que ocorre em um período de três a quatro meses, é categorizado em independente e dependente de gonadotrofina (WEBB et al., 2004).

Um folículo primordial consiste em um oócito imaturo, quiescente, cercado por uma única camada de células achatadas da pré-granulosa. A transição de folículos quiescentes para folículos em crescimento é um processo gradual que começa logo após a formação dos folículos primordiais e continua ao longo da vida reprodutiva (FORTUNE et al., 1998).

O início de crescimento ou ativação de folículos primordiais é a transição destes folículos para o folículo primário. Esse processo é acompanhado por proliferação e diferenciação de células da granulosa: no folículo primário, as células da granulosa são de forma cônica em vez de achatadas e aumenta o número de células da granulosa. Nos estágios subsequentes de crescimento, o oócito sofre expansão de volume e desenvolve uma zona pelúcida entre as células do oócito e granulosa (VAN WEZEL & RODGERS, 1996).

A maioria dos folículos ativados evolui para o estágio antral, caracterizada pela formação de uma cavidade. Após a ativação, a maioria dos folículos entra em processo de regressão e parece haver uma morte programada por apoptose, a menos que a presença de níveis suficientemente elevados de FSH mude seu

destino e inclua-os em uma onda de crescimento folicular (OKTEM & OKTAY, 2008).

Para que ocorra a ativação de folículos primordiais, as gonadotrofinas não desempenham função direta, uma vez que *in vivo* o processo de ativação é contínuo e não relacionado aos padrões cíclicos de liberação de LH e FSH e *in vitro* ocorre ativação espontânea de folículos primordiais em várias espécies, incluindo bovinos (WANDJI et al., 1996).

Estudos vêm mostrando que fatores autócrinos e parácrinos controlam a ativação de folículos, esses fatores ativadores são originados tanto das células da granulosa que circundam o oócito quanto do próprio oócito e, atualmente, se conhece a identidade de alguns fatores oocitários envolvidos no desenvolvimento folicular inicial, como a proteína morfogenética óssea 15 (BMP15) e o fator de diferenciação de crescimento 9 (GDF9); fatores cuja ausência em animais geneticamente (ou experimentalmente) deficientes causa bloqueio nos estágios iniciais da foliculogênese (McNATTY et al., 2007). O hormônio anti-Mulleriano (AMH) exerce importantes funções na regulação local da foliculogênese. Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que o AMH afeta a formação e a ativação de folículos primordiais, bem como a sensibilidade dos folículos em crescimento ao FSH (FANCHIN et al., 2007)

Um importante fator originado das células da granulosa e implicado no processo de ativação folicular é o kit ligante (kitl), que está relacionado à sobrevivência e proliferação das células da granulosa (JIN et al., 2005), com o recrutamento das células da teca e na regulação da esteroidogênese (HUTT et al., 2006). Camundongos que possuem mutações no gene que codifica o kitl, não possuem células germinativas primordiais e são incapacitados de iniciar o crescimento folicular (YOSHIDA et al., 1997). O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) pode ser considerado como essencial para o crescimento de folículos pré-antrais, estando envolvido nos mecanismos intraovarianos para a sobrevivência celular, na regulação do crescimento folicular e função do corpo lúteo (WANG et al., 2009a).

Como resultado da ativação, os folículos iniciam crescimento e progridem pelas fases de folículo pré-antral primário e secundário e atingem o estágio de terciário, com a formação do antro folicular, no episódio da puberdade. Para a evolução a esse estágio, ocorre inicialmente a aquisição de resposta às gonadotrofinas e posteriormente a dependência de estímulo gonadotrófico para manter o crescimento até o estágio pré-ovulatório (AERTS e BOLS, 2010). O crescimento do folículo dependente da gonadotrofina ocorre com dois a três ondas por ciclo estral (SAVIO et al., 1988). Cada onda de crescimento envolve emergência, seleção e dominância, seguida de atresia ou ovulação do folículo dominante (MELLO et al., 2013).

Em vacas, estima-se que a progressão da ativação ao estágio pré-ovulatório leva em torno de 6 meses (LUSSIER et al., 1987), sendo que o estágio de desenvolvimento de secundário pré-antral à pré-ovulatório dura aproximadamente 42 dias.

### **Luteogênese, luteólise e avaliação morfofuncional**

O corpo lúteo é considerado como uma glândula transitória, responsável pela produção de progesterona, com intuito de manutenção de um ambiente uterino ideal para a implantação e desenvolvimento de um conceito (WEBB et a., 2004).

O crescimento folicular, em toda sua complexidade, e a ovulação demandam uma eficiente microcirculação na parede folicular. A camada da teca dos folículos pré-ovulatórios desenvolve uma fina rede de capilares, que atinge a proximidade da camada basal onde as células da granulosa estão em íntimo contato, responsável pelo fornecimento de nutrientes e hormônios para as células da granulosa e para o complexo cúmulos-oócito, situado no interior do folículo, para suprir o metabolismo folicular e esteroidogênese (VIANA et al., 2013). O aumento do fluxo de sangue para a camada da teca do folículo dominante resulta em um aumento da oferta de gonadotrofinas e outros fatores

hormonais e bioquímicos necessários para a maturação folicular e a consequente ovulação (JIANG et al., 2003).

Imediatamente após a ovulação as paredes do folículo colapsam em várias dobras, essas dobras começam a se interdigitar, permitindo que as células da teca e granulosa se misturem e invadam a cavidade folicular (FIELDS e FIELDS, 1996). O crescimento inicial do CL é exacerbado e seu peso aumenta mais de seis vezes na primeira metade do ciclo estral bovino (ZHENG et al., 1994), secretando quantidades crescentes de progesterona. O CL atinge seu tamanho máximo aproximadamente no dia 10 do ciclo estral (SENGER, 2003).

A formação do CL é iniciada por uma série de mudanças morfológicas e bioquímicas em células da teca interna e granulosa do folículo pré-ovulatório. O CL é um dos poucos tecidos adultos que apresentam períodos regulares de crescimento, função e lise, sendo considerado um tecido heterogêneo e além de conter células endoteliais, células esteroideogênicas grandes e pequenas, também constitui-se de fibroblastos, células musculares lisas e do sistema imunológico (TREVISOL et al., 2013).

Na formação da estrutura lútea, os vários tipos de células devem interagir sobre o crescimento de novos vasos sanguíneos e o estabelecimento de um suprimento de sangue funcional. Vários fatores angiogênicos e vasoativos estão presentes no CL, dentre os fatores angiogênicos pode-se citar: fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), angiopoetina 1 e 2 (ANPT-1 e -2) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), responsáveis pela formação de novos vasos sanguíneos e distribuição corporal de P4; e entre os fatores vasoativos: endotelina-1 (EDN1), angiotensina II (Ang II) e o óxido nítrico (NO), responsáveis pelo fluxo sanguíneo (BERICHA et al., 2016).

Em ruminantes domésticos, os hormônios luteotrópicos primários, que apoiam o desenvolvimento e a função do CL, são LH e GH. O aumento do número de receptores de LH observados no CL bovino é precedido por um aumento de RNAm, que codifica este receptor (KOBAYASHI et al., 2001). A maioria dos receptores de LH está localizada em pequenas células lúteas e o

mecanismo de liberação de progesterona por essas células envolve a formação de AMPc e ativação da PKA. Os receptores para o hormônio do crescimento estão localizados nas grandes células luteais que são responsáveis pela produção de 80% da progesterona liberada pelo CL (SCHAMS & BERISHA, 2004).

A luteólise é complexa e envolve vários processos desencadeados a partir do não reconhecimento da gestação e da liberação de PGF2 $\alpha$ . O conceito tem capacidade de liberação de prostaglandina E, que atua de forma importante como protetor da função lútea. Quando não há a produção e liberação desse hormônio, uma cascata hormonal pode ser liberada para que a luteólise ocorra através da produção de PGF2 $\alpha$  (OCHOA et al., 2018).

Em ruminantes e outros animais domésticos já foi comprovado que a regressão lútea no final do ciclo estral é causada pela liberação de PGF2 $\alpha$  do útero, atingindo o CL através de um sistema íntimo entre a veia uterina e a artéria ovariana (SCHAMS & BERISHA, 2004).

O corpo lúteo dos bovinos possui receptores específicos para PGF2 $\alpha$ , contudo a afinidade desses receptores é maior entre o 13 $^{\circ}$  e o 20 $^{\circ}$  dia. A administração de PGF2 $\alpha$  em novilhas na fase média do ciclo estral causa, de 4 a 12 horas após sua administração, uma diminuição significativa no RNAm luteínico da proteína reguladora aguda esteroideogênica (StAR), responsável pelo transporte de colesterol citoplasmático para o interior da mitocôndria (WAITE et al., 2005).

A ligação da PGF2 $\alpha$  a seus receptores na membrana das células luteais esteroideogênicas também estimula a atividade da proteína quinase C, que interrompe a produção de P4 de diversas maneiras: diminuindo a captação e o transporte de colesterol para o citoplasma e para a mitocôndria, promovendo retroalimentação negativa dos receptores de LH e aumentando a expressão e a ativação das proteínas envolvida nos processos de apoptose (BERTAN et al., 2006).

Em ruminantes, a ocitocina exerce diversas funções no sistema reprodutivo, podendo ser salientada sua ação na indução da luteólise. Uma vez que ao ligar-se aos seus receptores endometriais estimula a secreção de  $\text{PGF2}\alpha$  e induz a secreção da ocitocina estocada no corpo lúteo (LEE et al., 2013). Esta liberação suplementar de ocitocina irá amplificar a produção endometrial de  $\text{PGF2}\alpha$ , resultando na regressão completa do corpo lúteo (CLARO et al., 2010).

Outros fatores podem influenciar na ocorrência da luteólise, como a elevação da secreção de estradiol. O benzoato de estradiol, quando aplicado durante a fase do diestro, pode induzir a regressão precoce do CL através da ativação da síntese e secreção de prostaglandina  $\text{PGF2}\alpha$ . A luteólise provocada pela aplicação de estradiol pode ter como causa a maior sensibilidade do CL com 15 a 17 dias de idade (BAZER et al., 2010). Também foi demonstrado haver diferenças significativas nas taxas de prenhez da primeira inseminação em novilhas submetidas à resincronização de estro com BE e P4 13 dias após a primeira IA (COLAZO et al., 2006; CUTAIA et al., 2002). Nestes casos, observa-se comprometimento do CL identificado pela menor produção de P4 após a aplicação de estradiol (EL-ZARKOUNY S.Z. & STEVENSON J.S., 2004).

Nesse sentido, Vieira et al. (2014) verificaram que a aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol no início do protocolo de resincronização (13 a 14 dias após prévia IATF) induziu luteólise e reduziu a taxa de concepção da primeira inseminação, fato que não ocorre em vacas resincronizadas 22 dias após a IATF (SÁ FILHO et al., 2014). Diante desse limitante, programas de resincronização super-precoce passaram a ser desenvolvidos sem o uso de estradiol no início do tratamento. Estes protocolos hormonais para resincronização se baseiam no uso de uma alta dose de P4 injetável no momento da inserção de dispositivo de P4 (14 após a IATF) para induzir a emergência de uma nova onda de crescimento folicular (PUGLIESI et al., 2019)

Apesar do grande conhecimento adquirido em relação às mudanças fisiológicas de perfusão sanguínea em órgãos, tecidos e componentes reprodutivos, só recentemente foram desenvolvidos estudos que possibilitaram novas estratégias de uso do Doppler com potencial para incorporação em

programas reprodutivos comerciais e que visam melhorar a eficiência reprodutiva. Dentre as diversas possibilidades de avaliação, a ultrassonografia Color-Doppler vem sendo mais usada como uma técnica não-invasiva e em tempo real para estimar a funcionalidade do corpo lúteo (CL) para seleção de receptoras e para o diagnóstico precoce da gestação em programas de IATF e TETF (PUGLIESI et al., 2017; SILVA et al., 2018).

O modo Power-Doppler é um método que permite a mensuração da intensidade do fluxo sanguíneo, o número de células sanguíneas se movendo no vaso por unidade de tempo, e a imagem apresenta coloração de diferente intensidade de acordo com a intensidade do fluxo em cada ponto da área avaliada. Este modo pode ser indicado quando a estrutura a ser avaliada apresenta fluxo sanguíneo mais baixo (BOLLWEIN et al., 2016).

Os modos Color e Power-Doppler demonstram detalhes anatômicos e informações da perfusão sanguínea em tempo real dos tecidos e órgãos reprodutivos através de mensurações subjetivas ou objetivas. As representações coloridas da perfusão sanguínea na tela podem ser estimadas pela proporção do tecido com sinais coloridos ou calculados por programas computacionais através da quantidade de pixels coloridos. Uma alternativa para avaliação é a determinação subjetiva através de uma escala de 0 a 4 para a área avaliada em relação a quantidade de pixels observados pelo ultrassonografista tanto no centro, quanto na região periférica da estrutura lútea (SILVA & GINTHER, 2010).

Dessa forma, a avaliação em modo B, pode trazer informações incompletas no tocante à funcionalidade da estrutura lútea. Ao incrementarmos a função doppler power, certamente são obtidos dados fidedignos quanto a sua funcionalidade e potencial da produção de progesterona, não sendo necessário o uso de métodos mais invasivos, como a biópsia do CL, e de resposta tardia, como a dosagem de progesterona (SILVA et al., 2018)

## Reconhecimento materno da gestação

O reconhecimento materno da gestação pode ser definido como o período em que o concepto sinaliza sua presença para a mãe. Em ruminantes, este período requer o alongamento do embrião, que coincide com a máxima produção de interferon-tau (IFN- $\tau$ ), produto secretado em grandes quantidades pelas células do trofoblasto do concepto entre os dias 15 e 17 da gestação (GRAY et al., 2002). As moléculas de interferon são citocinas com propriedades antivirais, antiproliferativas e imunomodulatórias, sendo críticas para respostas imunológicas. O IFN- $\tau$  é o único interferon liberado pelo concepto, que leva ao reconhecimento da gestação em ruminantes (QUITES et al., 2011; DESTRO et al., 2014).

Durante as fases iniciais da gestação, o IFN- $\tau$  exerce ação parácrina antiestrogênica, suprimindo a expressão dos receptores de estrógeno (ESR1) e de ocitocina (OXTR) no endométrio (SPENCER, 1995). Essa ação antiluteolítica previne a produção da PGF2 $\alpha$ , com o intuito de manter o corpo lúteo funcional, produtor de progesterona (BAZER, 1994). O IFN- $\tau$  também tem o papel de estimular a produção de prostaglandina E2, um agente luteotrófico, e aumentar a produção de diversas proteínas secretórias de origem uterina, que podem estar envolvidas na manutenção da viabilidade do concepto (NAGAOKA et al., 2003). Além disso, o IFN- $\tau$  estimula a transcrição de uma série de genes e atividades de várias enzimas de uma maneira específica das células do endométrio, implicando no estabelecimento de receptividade uterina, alongamento do concepto e implantação em ruminantes (DORNIK et al., 2013).

O início da expressão do gene do IFN- $\tau$  parece ser programado de um modo geneticamente independente do ambiente uterino, uma vez que ele é expresso em sistemas *in vivo* e *in vitro*. No entanto, a produção de IFN- $\tau$  é influenciada pelo ambiente uterino, pois sua produção *in vitro* aumenta na presença de tecido uterino (KERBLER et al., 1997). A expressão de IFN- $\tau$  termina com a implantação, pois o contato do trofoblasto com o endométrio cessa sua produção (DEMMERS et al., 2001). Qites Antoniazzi et al. (2011) sugerem que a função endócrina do IFN- $\tau$  pode estar diretamente ligada com a

expressão de genes ativados pelo interferon (ISGs), estes modulam parcial ou totalmente a resistência luteal à ação luteolítica da PGF2 $\alpha$ .

A sobrevivência, crescimento do blastocisto pré-implantação e o alongamento embrionário, exigem claramente fatores embriotróficos (amnoácidos, carboidratos, proteínas, lipídios e outras substâncias) no lúmen uterino. As ações individuais, interativas e coordenadas de progesterona, IFN- $\tau$  e prostaglandinas, regulam a expressão de genes relacionados ao alongamento e à implantação no epitélio endometrial, que por sua vez, alteram o crescimento histotrófico luminal e definem a sobrevivência e crescimento do concepto (SPENCER et al., 2015)

O termo “embriocinas” tem sido usado para descrever a mistura de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento que são secretados pelo oviduto e útero durante o desenvolvimento inicial do embrião e implantação (KOWSAR et al. 2019; TRÍBULO et al., 2017). “Embriocina” é apenas parcialmente correto, pois os fatores produzidos pelo útero afetam tanto o concepto quanto o próprio útero. As citocinas têm um papel particularmente fundamental regulando o equilíbrio de pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, ações que preparam o útero para a implantação. As “embriocinas” são parcialmente produzidas por mastócitos, macrófagos e células natural killer que povoam o endométrio uterino no início gestação. Os bovinos são reconhecidos como de “implantação tardia”, o que significa que durante cerca de três semanas o conceptus pode ser considerado vulnerável antes de se ligar ao útero e estabelece uma gravidez (CAMPANILE et al., 2021)

O alongamento de concepto envolve aumentos exponenciais de comprimento, peso, proliferação celular do trofoblasto (WANG et al., 2009b) e início da diferenciação de membrana extraembrionária, incluindo gastrulação do embrião, formação do saco vitelino e alantoides, que são vitais para sobrevivência do embrião e formação da placenta (HUE et al., 2012).

Além da liberação de interferon, presença de progesterona em concentrações adequadas e alongamento embrionário e atuação de citocinas são considerados relevante para o sucesso do reconhecimento e

desenvolvimento da gestação. As citocinas são um grupo grande de moléculas sinalizadoras divididas em classes funcionais, incluindo fatores de crescimento linfocitário, moléculas pró- e anti-inflamatórias e podem estimular diretamente respostas a antígenos. Um exemplo de grande importância para o desenvolvimento embrionário inicial e sua implantação é a interleucina 6 (IL-6) (SESHAGIRI et al., 2016). Uma segunda citocina, Fator Inibidor de Leucemia (LIF), é observada na pré-implantação do blastocisto e no desenvolvimento do trofotoderma, e a redução da sua concentração está relacionada a falhas de implantação (INGMAN et al., 2008)

Do dia 8 ao 27, concomitante com o alongamento embrionário e o reconhecimento maternal da prenhez, as perdas médias são de aproximadamente 30%. Do dia 28 ao 60, as perdas são de aproximadamente 12%, enquanto no quarto período, durante o terceiro mês de gestação, as perdas gestacionais são reduzidas (aproximadamente 2%), mas podem ser elevadas em algumas vacas, particularmente naquelas que carregam gêmeos no mesmo corno uterino (WILTBANK et al., 2016).

O período de pré-implantação é considerado crítico para o desenvolvimento dos embriões em ruminantes, representando elevados índices de perda gestacional. Nesse período, uma série de eventos coordenam o crescimento e a sobrevivência dos embriões, envolvendo a atuação de citocinas, esteroides, metabólitos e fatores de crescimento, responsáveis por garantir o sucesso da gestação e o subsequente desenvolvimento fetal (LIMA e SOUZA, 2009).

### **Protocolos de Ressincronização**

O sistema tradicional de ressincronização da ovulação, começa depois do diagnóstico de gestação, e esse método é utilizado para uma segunda possibilidade de acasalamento, com intervalo de aproximadamente 40 dias depois da primeira inseminação artificial. Esse intervalo para novo acasalamento é longo, aumentando o período de serviço dessas fêmeas, piorando os índices zootécnicos ligados a reprodução em uma propriedade. A segunda inseminação

ocorre com aproximadamente 32 dias após a primeira, inviabilizando uma ressinchronização do ciclo estral de forma precoce (MOTTA et al., 2021)

Estudos recentes em vacas de leite e corte, indicam que o ultrassom Doppler pode ser usado como método para avaliação da vascularização do CL, e conseqüentemente identificar as fêmeas não-gestantes, criando estratégias para um programa de ressinchronização precoce, reduzindo o intervalo entre duas inseminações (SILVA et al., 2018). Todavia, a aplicação dos ésteres de estradiol ou seus análogos durante a segunda semana do ciclo estral, poderá induzir uma regressão luteal nas fêmeas inseminadas e gestantes (MOTTA et al., 2021)

A ressinchronização precoce, 12 a 14 dias após a primeira IATF, pode encurtar a estação de monta e disponibilizar mais dias para maior ganho de peso de bezerros recém-nascidos, especialmente quando comparado a ressinchronização tradicional, após o diagnóstico com ultrassom em modo B (30 dias de gestação). Pugliesi e colaboradores (2019) estudando o uso do ultrassom color Doppler, 20 dias após a primeira IATF, associado a antecipação da ressinchronização, possibilitou intervalo de 22 dias entre as inseminações, resultando uma redução de 18 dias, comparado ao sistema tradicional de ressinchronização. A eficácia desse protocolo foi verificada pela taxa de gestação média de 53,3% na segunda IATF, acumulando uma taxa de 74,7% em um intervalo de 22 dias.

Além disso, em relação ao tratamento hormonal de ressinchronização da emergência da nova onda folicular 13 dias após a IATF, indicam que o uso do éster de estradiol ou seus análogos podem apresentar um efeito negativo na manutenção do CL, induzindo luteólise (VIEIRA et al., 2014).

Em fêmeas que não foram inseminadas, o efeito do estradiol sob a prostaglandina é indicado pelo aumento da concentração do metabólito de PGF<sub>2</sub>alfa, a 13,14-dihidro-15-keto-GF<sub>2</sub>α (PGFM). A maior esterificação na molécula de BE resulta em uma onda maior e mais duradoura da concentração de estradiol, do que o próprio 17beta. E sabe-se que este hormônio é capaz de estimular receptores endometriais de ocitocina, levando a uma elevação da produção e liberação de prostaglandina. Em contrapartida, ao ser usado 1mg de

E2 ou BE, não foram identificados efeitos negativos ou deletérios ao CL após 14 dias da primeira IATF, não havendo elucidações mais profundas a respeito dos efeitos diretos sobre essa estrutura (PUGLIESI et al., 2019).

Na tentativa de encontrar outros meios farmacológicos para indução de uma nova onda de desenvolvimento folicular, estudos vêm testando a utilização da progesterona injetável (CAVALIERI, 2018; 2019). Tais trabalhos sugerem que elevadas doses de progesterona injetável associada à inserção do implante contendo o mesmo hormônio, conseguem inibir significativamente as gonadotrofinas, levando a ocorrência de uma nova onda de crescimento. Tendo usado 100 mg de progesterona de curta ação, associada ao uso de dispositivos intravaginais, Pugliesi et al. (2018) demonstraram taxas de gestação que variaram entre 45 e 60%, tanto em protocolos de inseminação, quanto em transferências de embrião em tempo fixo. Apesar do expressivo resultado, os autores ainda sugerem mais estudos a respeito da utilização de fármacos para recrutamento de nova onda, incluindo o efeito do estradiol nesse momento de ressincronização.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos na dinâmica folicular e luteal de quatro diferentes protocolos de sincronização de estro e ovulação, para ressincronização superprecoce de estro e ovulação, visando a IATF.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o efeito da utilização do benzoato de estradiol no corpo lúteo, no dia zero do protocolo de ressincronização superprecoce.
- Avaliar o desenvolvimento folicular de fêmeas zebuínas submetidas a quatro diferentes protocolos de ressincronização superprecoce.

#### 4. HIPÓTESES

- A utilização do benzoato de estradiol, no dia zero do protocolo de ressincronização, interfere negativamente na permanência e vascularização da estrutura luteal de fêmeas gestantes, 14 dias após a indução de ovulação.

- A não utilização do benzoato de estradiol no dia zero do protocolo de ressincronização, afeta negativamente a sincronização de uma nova onda de desenvolvimento folicular.

- Ajustes em relação aos hormônios utilizados e os dias de aplicação deles, nos protocolos de sincronização de estro e ovulação, irão interferir no desenvolvimento de uma nova onda folicular, resultando em melhores taxas de ovulação.

## **CAPÍTULO 1**

**Avaliação luteal após uso do benzoato de estradiol em protocolo de  
ressincronização superprecoce de estro e ovulação**

**ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE**

---

1        **Avaliação luteal após uso do benzoato de estradiol em protocolo de**  
2        **ressincronização superprecoce de estro e ovulação em vacas Nelore (*Bos***  
3        ***taurus indicus*)**

4  
5        Mariana Alves de Andrade Silva<sup>1\*</sup>, Bia Santos Souza Carôso<sup>1</sup>, Endrigo Adonis  
6        Braga de Araujo<sup>1</sup>, Marcus Vinicius Galvão Loiola<sup>1</sup>, Alexandra Soares Rodrigues<sup>2</sup>,  
7        Antonio de Lisboa Ribeiro Filho<sup>1</sup>

8  
9        <sup>1</sup>Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia  
10        (UFBA), Salvador, BA, 40.170-110, Brazil

11        <sup>2</sup>Centro Multidisciplinar da Barra, Universidade Federal do Oeste da Bahia  
12        (UFOB), Barra, BA, 47.100-000 Brasil.

13  
14        \*Corresponding author. Departamento de Anatomia, Patologia e Clínicas  
15        Veterinárias, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Av. Ademar de Barros, nº  
16        500, Ondina, Salvador, BA, 40170-110, Brasil.

17        Endereço de e-mail: marianadeandradesilva@gmail.com

18  
19        **Resumo**

20        Objetivou-se caracterizar o efeito da administração de 1 mg de benzoato de  
21        estradiol (BE) na estrutura do corpo lúteo de 12 dias em vacas Nelore (*Bos taurus*

22 *indicus*). Dessa maneira, foram utilizadas 33 fêmeas *Bos taurus indicus*, com  
23 média de 389Kg, idade entre 4 e 9 anos, criadas em sistema extensivo,  
24 submetidas a um primeiro protocolo de sincronização de estro e ovulação,  
25 iniciado com a inserção de um dispositivo de 1,9g de progesterona (CIDR<sup>®</sup>,  
26 Zoetis, São Paulo, Brasil) associado à aplicação de 2,0 mg de BE (GONADIOL<sup>®</sup>,  
27 Zoetis, São Paulo, Brasil) via intramuscular. Oito dias após o início do protocolo,  
28 os dispositivos de progesterona foram removidos, e foi realizada a aplicação de  
29 12,5 mg de dinoprost trometamina (LUTALYSE<sup>®</sup>, Zoetis, São Paulo, Brasil), 0,5  
30 mg de cipionato de estradiol (ECP<sup>®</sup>, Zoetis, São Paulo, Brasil) i.m. e 300 UI de  
31 Gonadotrofina Coriônica Equina i.m. (eCG, NOVORMON<sup>®</sup>, MSD Saúde Animal,  
32 São Paulo, Brasil), sendo todas as aplicações realizadas pela via intramuscular.  
33 Após 22 dias do início do protocolo citado acima, foram iniciados os protocolos  
34 de resincronização superprecoce nas fêmeas que apresentavam estrutura lútea  
35 em seus ovários, desta forma, 11 fêmeas receberam dispositivo intravaginal de  
36 progesterona, além de 1,0 mg de BE, compreendendo as fêmeas do grupo um  
37 (G1). Posteriormente, 10 fêmeas receberam apenas os dispositivos intravaginais  
38 de progesterona, compreendendo o grupo 2 (G2). A partir do início dos  
39 tratamentos, todas as vacas foram avaliadas a cada 24 horas por três dias (D0,  
40 D1 e D2), com o intuito de identificar alterações no corpo lúteo. Todas as  
41 avaliações de ovários contaram com a utilização de ultrassonografia em modo B  
42 e power Doppler. Desta forma, foram realizadas mensurações de diâmetro, área,  
43 área de vascularização e porcentagem de área de vascularização do corpo lúteo  
44 (DCL, ACL, VCL, %VCL respectivamente). Os dados obtidos foram avaliados  
45 pelo SPSS (versão 19) considerando  $P \leq 0,05$ . As características estruturais e  
46 funcionais pós-ovulatórias do CL foram similares em todos os protocolos com ou

47 sem aplicação do benzoato de estradiol. Foi realizada teste de Friedman para  
48 avaliar em que medida os níveis de ACL eram equivalentes nos diferentes  
49 tempos (D0, D1 e D2), obtendo-se resultados estatisticamente significativos  
50 ( $P=0,008$ ). Testes de Wilcoxon Signed Rank, a posteriori, demonstraram que no  
51 D0 a ACL foi signitivamente maior que no D1 e no D2. Os mesmos testes  
52 estatísticos foram feitos para avaliação de VCL ao longo do tempo. Os resultados  
53 foram estatisticamente significativos ( $P =0,01$ ). Além disso, demonstraram que  
54 no D0 a VCL não foi maior que no D1, porém foi maior do que no D2. Desta  
55 forma, sugere-se que não houve influência da aplicação do BE na morfofunção  
56 do CL, podendo ser uma ferramenta útil da ressincronização de fêmeas para  
57 IATF.

58 **Palavras-chave:** IATF, power Doppler, vascularização luteal; hormonioterapia.

59

## 60 **Abstract**

61 The objective was to characterize the effect of 1mg of estradiol benzoate (EB) on  
62 the 12-day corpus luteum structure. Thirty-three *Bos taurus indicus* females from  
63 a extensive farming system. They were submitted to a first estrus and ovulation  
64 synchronization protocol, initiated with the insertion of a progesterone device  
65 (1.9g) associated with the application of 2.0mg of EB. Eight days later, the  
66 progesterone devices were removed, and 12.5mg of dinoprost tromethamine,  
67 0.5mg of estradiol cypionate and 300 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG)  
68 were administered intramuscularly. After 22 days from the beginning of the  
69 protocol, the super-early resynchronization protocols were started in females that

70 had luteal structure in their ovaries. Eleven 11 females received an intravaginal  
71 progesterone device, in addition to 1.0mg of EB, comprising the females of the  
72 group one (G1). Subsequently, 10 females received only intravaginal  
73 progesterone devices, comprising group 2 (G2). From the moment of intravaginal  
74 device insertion, for three days (D0, D1 and D2), all cows were evaluated every  
75 24 hours to identify changes in the corpus luteum present in the ovaries. All  
76 evaluations of the ovaries relied on the use of B-mode ultrasound and power  
77 doppler. Thus, measurements of diameter, area, area of vascularization of the  
78 corpora lutea and percentage of area of vascularization of the corpus luteum  
79 (DCL, ACL, VCL, %VCL respectively) were performed. The data obtained were  
80 evaluated by SPSS (version 19) considering  $P \leq 0.05$ . The structural and  
81 functional post-ovulatory characteristics of the CL were similar in all protocols  
82 with or without application of estradiol benzoate. A Friedman ANOVA was  
83 performed to assess the extent to which ACL levels were equivalent at different  
84 times (D0, D1 and D2), obtaining statistically significant results ( $P=0.008$ ).  
85 Wilcoxon Signed Rank tests, a posteriori, showed that on D0 the ACL was  
86 significantly higher than on D1 and D2. The same statistical tests were performed  
87 for the assessment of LCV over time. The results were statistically significant  
88 ( $P=0.01$ ). Wilcoxon Signed Rank tests, a posteriori, showed that on D0 the VCL  
89 was not significantly higher than on D1, but it was higher than on D2. The  
90 difference in VAS level between D1 and D2 was not significant. In conclusion, it  
91 is suggested that there was no influence of the application of estradiol benzoate  
92 on the morphofunction of the CL, which could be a useful tool for  
93 resynchronization of females for FTAI.

94 **Keywords:** FTAI, power doppler, vascularization.

95

## 96 **Introdução**

97 A ressincronização da ovulação tem sido muito utilizada para aumentar a  
98 eficiência reprodutiva dos protocolos de IATF. Essa técnica traz vantagens  
99 como: concentração da concepção no início da estação de monta (EM), maior  
100 taxa de gestação ao final da EM associada ao maior número de bezerras  
101 oriundas da IATF, promovendo o melhoramento genético do rebanho  
102 (BARUSELLI et al., 2019).

103 Todavia, quando ressincronizadas ao retorno do estro e ovulação, fêmeas  
104 não gestantes só podem ser detectadas com 28 dias após a ovulação, usando  
105 ultrassonografia modo B por via transretal, para só então, iniciar um segundo  
106 protocolo para uma nova IATF (BARUSELLI et al., 2017).

107 O sistema tradicional de ressincronização da ovulação, começa depois do  
108 diagnóstico de gestação, e esse método é utilizado para uma segunda  
109 possibilidade de acasalamento, com atraso de aproximadamente 40 dias depois  
110 da primeira inseminação artificial. Esse intervalo para novo acasalamento é  
111 longo, aumentando o período de serviço dessas fêmeas, piorando os índices  
112 zootécnicos ligados à reprodução (MOTTA et al., 2021)

113 Em estudos recentes em vacas de leite e corte, indicam que o ultrassom  
114 modo Doppler pode ser usado como método para avaliação da vascularização  
115 do CL, e conseqüentemente identificar as fêmeas não-gestantes a partir de 20  
116 dias após IATF, criando estratégias para um programa de ressincronização,

117 reduzindo o intervalo entre duas inseminações (SILVA et al., 2018). Em vacas  
118 não gestantes, a luteólise ocorre entre o 15<sup>o</sup> ao 18<sup>o</sup> dia após o estro, levando  
119 esta fêmea a um novo momento de receptividade sexual entre 18 e 24 dias  
120 (GINTHER et al., 2010).

121 Assim, é sugestivo que a avaliação do CL associado ao modo Doppler em  
122 momentos próximos a sua regressão ou ao reconhecimento materno da  
123 gestação poderia permitir um acesso correto do *status* gestacional, tendo em  
124 vista que ocorre uma alteração significativa na vascularização de estruturas  
125 luteais em fêmeas não gestantes (SILVA et al., 2018).

126 De forma corriqueira, a aplicação de estradiol, ou seus esteres, são  
127 usados para estabelecer a sincronização de nova onda de crescimento folicular  
128 no dia zero dos protocolos de IATF, porém a utilização desse hormônio durante  
129 a segunda semana do ciclo estral poderia induzir uma regressão luteal nas  
130 fêmeas inseminadas e gestantes, pois tal momento coincide com um período  
131 anterior ao reconhecimento materno-fetal da gestação (PUGLIESI, et al., 2012).

132 Baseado em tais considerações, o presente estudo objetivou avaliar a  
133 viabilidade morfofuncional do corpo lúteo em resposta a aplicação de 1mg de  
134 benzoato de estradiol associado ao implante intravaginal de progesterona em  
135 protocolos de ressincronização aos 14 dias após a sincronização do estro e  
136 ovulação de fêmeas zebuínas.

## 137 **Material e métodos**

138 Este estudo foi realizado em conformidade com as recomendações do  
139 Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal do Brasil (CONCEA).

140 Os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pelo Comitê de  
141 Ética no Uso de Animal da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da  
142 Universidade Federal da Bahia (UFBA), Bahia, Brasil (nº 32/2020).

143

#### 144 *Local e animais*

145 O experimento foi realizado entre os meses de novembro a agosto, na  
146 fazenda Bekcmann, localizada no município de Amélia Rodrigues, Bahia. A  
147 região apresenta pluviosidade média anual de 1277mm e possui clima Tropical  
148 Litorâneo. A propriedade adota um sistema extensivo de criação, tendo seus  
149 animais mantidos em pastagens de *Brachiaria decumbens*, suplementação  
150 mineral e acesso à água *ad libitum*.

151 Para a realização deste trabalho, foram utilizadas 33 vacas de corte *Bos*  
152 *taurus indicus*, multíparas em lactação, com média de escore de condição  
153 corporal (ECC)  $3,0 \pm 0,5$ , na escala de 1 a 5 (SINGH et al., 2015), idade entre 4  
154 e 9 anos.

155 Previamente ao início do experimento, os animais foram submetidos ao  
156 exame clínico-ginecológico e ultrassonografia transretal utilizando-se um  
157 transdutor linear com frequência de 7,5MHz (Mindray Z5, Shenzhen, China).  
158 Foram consideradas aptas a participar do experimento, somente fêmeas não  
159 gestantes e que apresentaram no momento da avaliação ausência de  
160 anormalidades no trato reprodutivo.

161

162 *Protocolos de sincronização e resincronização*

163 Todos os animais foram submetidos ao seguinte protocolo de  
164 sincronização de estro e ovulação: em um dia aleatório do ciclo estral,  
165 denominado dia menos 22 (D-22), todos os animais receberam um dispositivo  
166 intravaginal (CIDR<sup>®</sup>, Zoetis, São Paulo, Brasil) contendo 1,9 g de P4 associado  
167 a 2 mg de Benzoato de Estradiol (BE) (GONADIOL<sup>®</sup>, Zoetis, São Paulo, Brasil)  
168 por via intramuscular (i.m.). No dia menos 14 (D-14) foram removidos os  
169 dispositivos de P4 e administrado 12,5 mg (i.m) de Dinoprost Trometamina  
170 (PGF2 $\alpha$ , LUTALYSE<sup>®</sup>, Zoetis, São Paulo, Brasil), seguido por 1 mg (i.m) de  
171 Cipionato de Estradiol (CE) (ECP<sup>®</sup>, Zoetis, São Paulo, Brasil) e 300 UI (i.m) de  
172 Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG, NOVORMON<sup>®</sup>, MSD Saúde Animal, São  
173 Paulo, Brasil).

174 Após 22 dias do início do protocolo citado acima, foram iniciados os  
175 protocolos de resincronização superprecoce nas fêmeas que apresentavam  
176 estrutura lútea em seus ovários, desta forma, 11 fêmeas receberam dispositivo  
177 intravaginal de progesterona, além de 1,0 mg de BE, compreendendo as fêmeas  
178 do grupo um (G1). Posteriormente, 10 fêmeas receberam apenas os dispositivos  
179 intravaginais de progesterona, compreendendo o grupo 2 (G2). A partir do início  
180 dos tratamentos, todas as vacas foram avaliadas a cada 24 horas por três dias  
181 (D0, D1 e D2), com o intuito de identificar alterações no corpo lúteo

182 Após realização da primeira sincronização do estro e ovulação de 33  
183 animais, apenas 25 responderam ao protocolo, apresentando corpo lúteo no  
184 momento da avaliação para a resincronização, perfazendo 75,75% dos  
185 animais. Após o início da resincronização, quatro fêmeas foram consideradas

186 parcela perdida por não serem avaliadas devido ao manejo. Dessa forma, foram  
187 obtidos dados em relação às variáveis de CL e progesterona de 21 animais.

188

### 189 *Avaliações ultrassonográficas*

190 Os exames ultrassonográficos foram realizados utilizando um aparelho  
191 portátil equipado com as funções modo B e Doppler (Mindray Z5, Shenzhen,  
192 China). Para as avaliações em modo B, empregou-se um transdutor transretal  
193 com frequência de 6,5 MHz. No modo Doppler, as configurações foram ajustadas  
194 na faixa de velocidade de 6 cm/s para detectar movimento das células  
195 sanguíneas em pequenos vasos, para tanto, foi utilizado modo *power-flow*, em  
196 uma frequência de 8,5 Mhz, com padrões de ganho de cor de 70%, frequência  
197 de repetição de pulsos (PRF) de 1,0 KHz e a profundidade de avaliação de seis  
198 centímetros.

199 As avaliações do corpo lúteo foram realizadas pela ultrassonografia modo  
200 B e Doppler *power-flow* nos dias D0, D1 e D2 de ambos os grupos experimentais.  
201 Após a localização do ovário contendo o CL, o mesmo foi analisado por  
202 ultrassonografia em modo B e a imagem do CL foi congelada para mensuração  
203 do diâmetro (DCL) e área total (ACL). Nos CLs cavitários, foi calculada a área e  
204 volume da cavidade luteal e subtraída da área e volume total do CL para  
205 determinar o volume do tecido luteal em corpos lúteos cavitários, conforme  
206 metodologia descrita por Kastelic et al. (1990).

207 As imagens dos CCLL foram armazenadas e submetidas a avaliação pela  
208 tecnologia Doppler. Sendo assim, foi calculada a área de vascularização do

209 corpo lúteo (VCL) de cada animal, empregando uma função do próprio aparelho.  
210 Para determinação do percentual de vascularização da área do corpo lúteo  
211 (VCL%) foi realizada a razão entre a área de vascularização e área total do corpo  
212 lúteo (VCL%/ACL).

213

#### 214 *Coleta de sangue e dosagem de progesterona*

215 As amostras de sangue para dosagem da concentração sérica de P4  
216 foram coletadas nos dias zero (P4D0) e no dia oito (P4D8) do protocolo de  
217 resincronização do estro e ovulação, por meio da punção venosa coccígea, em  
218 tubos a vácuo de 10 mL, sem anticoagulante (VACUTAINERR, Becton,  
219 Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA) e imediatamente refrigeradas  
220 em isopor contendo gelo, permanecendo a uma temperatura de 4 °C.  
221 Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3.000 x g por 15 min, para  
222 separação do soro que foi transferido para microtubos de polietileno  
223 identificados. As amostras ficaram armazenados em freezer a -20°C, até o  
224 momento da análise. As análises da concentração de P4 foram realizadas pela  
225 metodologia de quimioluminescência, utilizando o *imunoensaio Access*  
226 *immunoassay systems Progesterone* (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), no  
227 Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da UFBA.

228

229

230 *Análise estatística*

231 Para analisar estatisticamente as características estruturais e funcionais  
232 do corpo lúteo proveniente da primeira sincronização, foram utilizadas as  
233 variáveis: diâmetro do CL, área do CL, área de vascularização do CL, percentual  
234 de vascularização na área do CL, nos dias zero, um e dois (D0, D1 e D2) dos  
235 grupos experimentais.

236 Utilizou-se as variáveis DCL0, DCL1, DCL2 - diâmetro do CL nos dias  
237 zero, um e dois, respectivamente; ACL0, ACL1, ACL2 - área do CL nos dias zero,  
238 um e dois; VCLD0, VCLD1, VCLD2 - área de vascularização do CL nos dias zero,  
239 um e dois; %VCLD0, %VCLD1, %VCLD2 - percentual de vascularização na área  
240 do CL nos dias zero, um e dois.

241 Os dados foram processados usando o *Statistical Package for Social*  
242 *Science* (SPSS) versão 19 (SPSS, 2012). Para tanto, se realizou a seguinte  
243 sequência de análises: 1- A média e desvio padrão das variáveis de interesse ao  
244 estudo foram obtidas por meio da análise descritiva; 2- As diferenças entre as  
245 médias das variáveis avaliadas nos diferentes grupos experimentais foram  
246 comparadas utilizando-se a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey. 3-  
247 Foi realizada uma ANOVA de Friedman para avaliar em que medida os níveis de  
248 DCL, ACL e VCL %VCL eram equivalentes nos diferentes tempos (D0, D1 e D2).  
249 Quando observada diferença relevante, os Testes de Wilcoxon Signed Rank  
250 foram empregados. Para todas as análises foram consideradas diferenças  
251 significativas quando o  $P \leq 0,05$ .

252

## 253 Resultados e discussão

254 Não foi observada diferença significativa na comparação das médias entre  
 255 as variáveis de área, diâmetro, área de vascularização e porcentagem de área  
 256 de vascularização do corpo lúteo entre grupos com e sem benzoato de estradiol  
 257 (G1 e G2, respectivamente) (Tabela 1).

258 **Tabela 1** - Influência da aplicação do benzoato de estradiol no protocolo de  
 259 ressincronização sobre os parâmetros morfofuncionais do corpo lúteo 14  
 260 dias após indução de ovulação.

Variáveis	Protocolos de ressincronização			
	Grupo 1 (Média±S) (n=11)	Grupo 2 (Média±S) (n=10)	p-valor	Total (Média±S) (n=21)
DCL0(cm)	1,70±0,27	1,70±0,21	0,75	1,70±0,24
DCL1(cm)	1,63±0,30	1,63±0,24	0,38	1,63±0,26
DCL2(cm)	1,68±0,24	1,61±0,25	0,76	1,64±0,24
ACL0(cm <sup>2</sup> )	2,32±0,65	2,33±0,69	0,67	2,33±0,65
ACL1(cm <sup>2</sup> )	2,14±0,75	2,21±0,78	0,80	2,17±0,74
ACL2(cm <sup>2</sup> )	2,23±0,73	2,03±0,56	0,61	2,13±0,65
VCL0 (cm <sup>2</sup> )	0,93±0,32	0,87±0,18	0,14	0,90±0,26
VCL1(cm <sup>2</sup> )	0,71±0,22	0,67±0,35	0,24	0,69±0,28
VCL2(cm <sup>2</sup> )	0,80±0,32	0,71±0,27	0,62	0,76±0,29
%VCL0 (%)	40,55±10,21	39,02±8,76	0,32	39,82±9,34
%VCL1(%)	35,60±12,51	31,00±10,70	0,33	33,41±11,64
%VCL2(%)	35,97±10,66	35,76±9,81	0,55	35,87±10,00

261 DCL0, DCL1, e DCL2= diâmetro do corpo lúteo nos dias 0, 1 e 2 respectivamente

262 ACL0, ACL1, ACL2= área do corpo lúteo nos dias 0, 1 e 2 respectivamente

263 VCL0, VCL1, VCL2= área de vascularização do corpo lúteo nos dias 0, 1 e 2 respectivamente

264 %VCL0, %VCL1, %VCL2 = percentual de vascularização na área do corpo lúteo nos dias 0, 1 e  
 265 2 respectivamente.

266

267 No intuito de reduzir o período de estação de monta, intensificando a  
 268 produtividade de rebanhos bovinos, protocolos de ressincronização 12 a 14 dias  
 269 após a primeira IATF vêm sendo estudados e desenvolvidos. Os tratamentos  
 270 hormonais na ressincronização começam próximo do período crítico para o

271 reconhecimento materno da gestação e não devem comprometer tal evento  
272 (PUGLIESI, 2019). Considerando que o estradiol (E<sub>2</sub>) tem grande relevância no  
273 processo luteolítico e pode comprometer o estabelecimento da prenhez, os  
274 efeitos a utilização do benzoato de estradiol sobre alterações morfofuncionais do  
275 corpo lúteo foram estudados no presente experimento de forma pioneira.

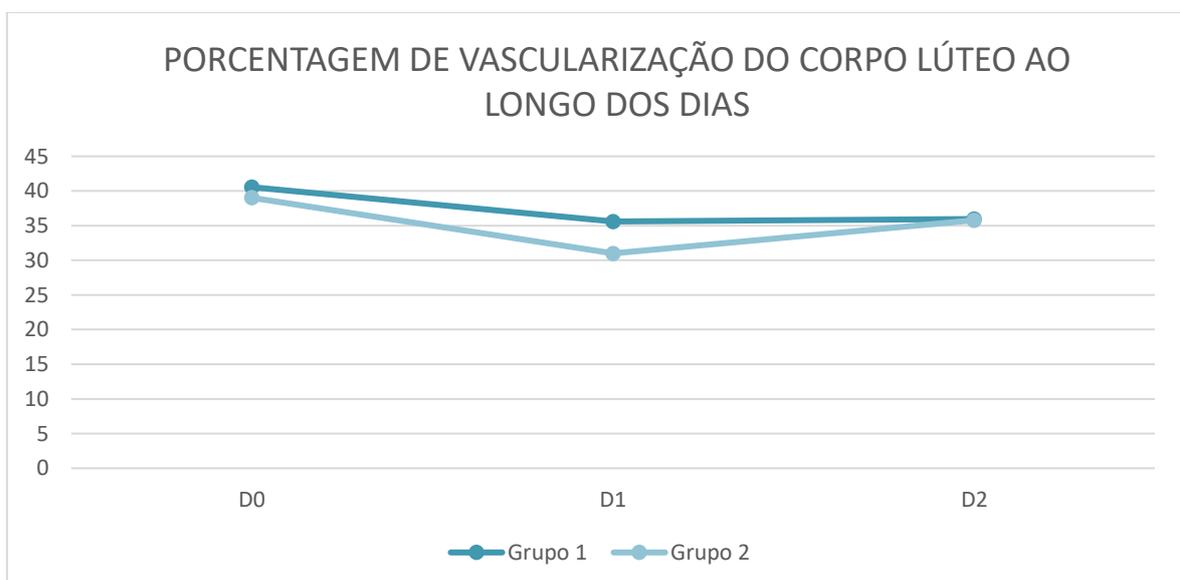
276 Observando os resultados supracitados, pode-se afirmar que a utilização  
277 de 1 mg de benzoato de estradiol no dia zero da ressincronização não  
278 desencadeou processo de luteólise, quando comparado a fêmeas que não foram  
279 submetidas à aplicação deste hormônio. Motta et al. (2021), encontraram  
280 resultados semelhantes ao avaliar a produção de metabólito de prostaglandina,  
281 (13,14-dihydro-15-ketoPGF<sub>2</sub>α) após a utilização de estradiol (17-β) em  
282 comparação ao benzoato, observando em novilhas de corte que não houve  
283 elevação significativa de prostaglandina F<sub>2</sub>α após a utilização do benzoato de  
284 estradiol.

285 Nesse sentido, Vieira et al. (2014) verificaram que a aplicação de 2 mg de  
286 benzoato de estradiol, no início do protocolo de ressincronização (13 a 14 dias  
287 após prévia IATF), induziu luteólise e reduziu a taxa de concepção da primeira  
288 inseminação. Diante desse limitante, programas de ressincronização  
289 superprecoce passaram a ser desenvolvidos sem o uso de estradiol no início do  
290 tratamento. Tais protocolos se baseiam no emprego de uma alta dose de  
291 progesterona injetável no momento da inserção de dispositivo de P4 (14 após a  
292 IATF) para induzir a emergência de uma nova onda de crescimento folicular.  
293 Porém, ao realizar estudo de viabilidade financeira em alguns rebanhos  
294 nacionais, o que se percebe é que o uso da progesterona injetável em elevadas

295 doses, pode inviabilizar a utilização dos programas de ressincronização. Desta  
296 forma, o uso do benzoato de estradiol em menores doses, como no presente  
297 trabalho, poderá tornar os programas mais exequíveis.

298 Na avaliação das medidas repetidas ao longo dos dias, foi possível notar  
299 redução da vascularização do corpo lúteo (VCL) entre os dias zero e um  
300 ( $0,90\text{cm}^2$  para D0 e  $0,69\text{cm}^2$  para D1,  $P=0,004$ ) e entre os dias zero e dois  
301 ( $0,90\text{cm}^2$  para D0 e  $0,76\text{cm}^2$  para D2,  $P=0,019$ ), não observando o efeito do  
302 Grupo, apenas do tempo. Diferenças também foram observadas ao realizar a  
303 comparação das médias ao longo dos dias sobre a porcentagem da área de  
304 vascularização do corpo lúteo (%VCL), entre os dias zero (40,55%) e o dia um  
305 (35,60%)  $P=0,05$ . É válido ressaltar que tais diferenças não estão relacionadas  
306 à aplicação do benzoato de estradiol na ressincronização, e sim ao fator tempo.  
307 Para as demais variáveis, não foi possível observar diferença ao longo dos dias.

308 **Figura 1.** Demonstração da porcentagem de vascularização do corpo lúteo nos três  
309 primeiros dias após início do protocolo de ressincronização do estro e  
310 ovulação.



311

312 Após avaliação da concentração sérica de progesterona, pôde-se constatar que  
313 o G1 apresentou média semelhante ao G2 em todos os momentos da avaliação  
314 ( $P>0,05$ ), determinando uma equivalência entre a utilização do benzoato no dia  
315 zero do protocolo, comparado aos animais que não receberam o hormônio. Ao  
316 avaliar as médias da concentração de P4 ao longo dos dias, foi constatada uma  
317 redução significativa,  $P<0,01$ , em todos os animais, independente do grupo  
318 estudado.

319

320 **Tabela 2** – Dosagem de progesterona em dois diferentes momentos da execução do protocolo  
 321 de ressincronização para IATF.

Variáveis	Protocolos de ressincronização			P-valor	Total (Média±S) (n=21)
	Grupo 1 (Média±S) (n=11)	Grupo 2 (Média±S) (n=10)			
P4D0 (ng/mL)	15,70±9,13 <sup>a</sup>	13,58±4,78 <sup>a</sup>	0,32	14,49±7,21	
P4D8 (ng/mL)	7,16±6,5 <sup>b</sup>	5,86±3,82 <sup>b</sup>	0,31	6,54±5,56	

322 P4D0 = Dosagem de progesterona no dia zero no protocolo de ressincronização.

323 P4D8 = Dosagem de progesterona no dia oito do protocolo de ressincronização.

324 Expoentes diferentes divergem significativamente P<0,01.

325

326 É válido ressaltar que todas as fêmeas avaliadas, tanto para a morfologia  
 327 do corpo lúteo, como concentração de progesterona, não estavam gestantes.  
 328 Então, o que se observa é o curso natural da luteólise após a não ocorrência da  
 329 sinalização embrionária, deflagrando na regressão da estrutura lútea,  
 330 considerado um evento de alta complexidade e que envolve vários processos  
 331 desencadeados a partir do não reconhecimento da gestação e da liberação de  
 332 PGF2 $\alpha$ . Os principais agentes responsáveis por esses fenômenos são os fatores  
 333 angiogênicos e vasoativos, que direta ou indiretamente influenciam na função  
 334 luteínica e na secreção de PGF2 $\alpha$  e P4 (TREVISOL et al., 2013). Quites et al.  
 335 (2011) sugerem que a função endócrina do IFN- $\tau$  pode estar diretamente ligada  
 336 com a expressão de genes ativados pelo interferon (ISGs), estes modulam  
 337 parcial ou totalmente a resistência luteal à ação luteolítica da PGF2 $\alpha$ .

338 Para atestar os dados encontrados no presente estudo, somado aos  
 339 fatores supracitados, afirma-se que existe uma maior afinidade dos receptores  
 340 específicos para prostaglandina por volta do 13<sup>o</sup> e o 20<sup>o</sup> dia do ciclo, coincidindo  
 341 com os momentos da avaliação da estrutura (WAITE et al., 2005).

342 A ligação da PGF2 $\alpha$  a seus receptores na membrana das células luteais  
 343 esteroidogênicas também estimula a atividade da proteína quinase C, que

344 interrompe a produção de P4 de diversas maneiras: diminuindo a captação e o  
345 transporte de colesterol para o citoplasma e para a mitocôndria, promovendo  
346 retroalimentação negativa dos receptores de LH e, possivelmente, aumentando  
347 a expressão e a ativação das proteínas envolvida nos processos de apoptose  
348 (BERTAN et al., 2006).

349 Em relação aos demais parâmetros, para os quais não foi possível  
350 observar diferença significativa, como área e diâmetro de CL, justifica-se tal fato  
351 pela fisiologia da luteólise. Segundo Pugliesi et al. (2017) e Silva et al. (2018), a  
352 modificação funcional da estrutura precede as alterações de formato que podem  
353 ser identificados por meio da ultrassonografia em modo B. Dessa forma, é  
354 esperado que exista uma redução da vascularização da glândula e redução da  
355 produção de progesterona, e posteriormente, diminuição notável ao exame  
356 ginecológico simples.

357

## 358 **Conclusão**

359 A utilização de benzoato de estradiol, no dia zero do protocolo para  
360 ressincronização do ciclo estral de fêmeas zebuínas, na dosagem de 1mg, não  
361 influenciou na redução de características morfofuncionais do corpo lúteo de  
362 fêmeas que foram induzidas a ovular há 14 dias em fêmeas não gestantes.

## 363 **Declaração de contribuição de autoria do CRediT**

364 **Mariana Alves de Andrade Silva** Conceitualização, Metodologia,  
365 Investigação e Redação original do manuscrito. **Alexandra Soares Rodrigues**

366 **e Marcus Vinícius Galvão Loiola:** Análise formal, Curadoria de dados, Redação  
367 - rascunho original, Redação - revisão e edição. **Bia Sousa Carôso; Endrigo**  
368 **Adonis Braga de Araujo:** Investigação e Curadoria de dados. **Antônio de**  
369 **Lisboa Ribeiro Filho:** Conceitualização, Metodologia, Captação de recursos,  
370 Visualização, Investigação, Análise formal, Supervisão, Administração de  
371 projetos, Redação - rascunho original, Redação - revisão e edição.

### 372 **Agradecimentos**

373 Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
374 Superior – CAPES pela concessão de Bolsa de Estudos (Código de  
375 financiamento 001), ao Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências da  
376 Saúde (ICS) da UFBA e à Fazenda Beckmann.

### 377 **Conflito de Interesse:**

378 Os autores declaram que não há conflito de interesses que possa ser  
379 prejudicial à imparcialidade da pesquisa relatada.

380

381 **Referências**

382 BARUSELLI, P. S., FERREIRA, R.M., COLLI, M. H. A.; ELLIFF, F. M.; FREITAS,  
383 B. G. Timed artificial insemination: current challenges and recent conquests for  
384 improving the efficiency in the field. **Animal Reproduction**, v.14, n.3, p.558-571,  
385 2017.

386 BARUSELLI, P.S., CATUSSI, B. L. C., DE ABREU, L. Â., ELLIFF, F. M., DA  
387 SILVA, L. G., BATISTA, E. S., CREPALDI, G. A. Evolução e perspectivas da  
388 inseminação artificial em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**,  
389 v. 43, n. 2, p. 308-314, 2019.

390 BERTAN, C.M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E.H.; TRALDI, A.S. Mecanismos  
391 endócrinos e moleculares envolvidos na formação de corpo lúteo e na luteólise  
392 – revisão de literatura. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal**  
393 **Science**, v.43, p.824-840, 2006.

394 GINTHER, O. J., SHRESTHA, H. K., & BEG, M. A. Circulating hormone  
395 concentrations within a pulse of a metabolite of prostaglandin F<sub>2α</sub> during  
396 preluteolysis and early luteolysis in heifers. **Animal Reproduction Science**, 122,  
397 253–258, 2010

398 KASTELIC, J.P.; PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonic morphology of  
399 corpora lutea and central luteal cavities during the estrous cycle and early  
400 pregnancy in heifers. **Theriogenology**, v.34, n.3, p.487-498, 1990.

401 MOTTA, IG, ROCHA, CC, BISINOTTO, DZ, MELO, GD, JÚNIOR, GAA,  
402 NISHIMURA, TK, ... & PUGLIESI, G. Efeitos de tratamentos com estradiol na  
403 liberação de PGF<sub>2α</sub> em novilhas de corte submetidas à resincronização estral

404 14 dias após a IA-cronometrada. **Domestic Animal Endocrinology** , v. 76,  
405 p. 106625, 2021.

406 PUGLIESI, G., BISINOTTO, DZ, MELLO, BP, LAHR, FC, FERREIRA, CA,  
407 MELO, GD, ... & MADUREIRA, EH. Uma nova estratégia para resincronização  
408 da ovulação em vacas Nelore usando progesterona injetável (P4) e dispositivos  
409 de liberação de P4 para realizar duas inseminações cronometradas em 22  
410 dias. **Reprodução em Animais Domésticos** , v. 54, n. 8, pág. 1149-1154, 2019.

411 PUGLIESI, G., KHAN, F. A., HANNAN, M. A., BEG, M. A., CARVALHO, G. R.,  
412 GINTHER, O. J. Inhibition of prostaglandin biosynthesis during postluteolysis and  
413 effects on CL regression, prolactin, and ovulation in heifers. **Theriogenology**,  
414 v.78, p. 443-54, 2012.

415 PUGLIESI, G., REZENDE, R. G., DA SILVA, J. C. B., LOPES, E., NISHIMURA,  
416 T. K., BARUSELLI, P.S., MADUREIRA, E. H., BINELLI, M. Uso da  
417 ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. **Revista**  
418 **Brasileira de Reprodução Animal**, v.41, n.1, p.140- 150, 2017.

419 QUITES A. A.; ERNANI, H. L.; COELHO, O. J. F e HOSS, H. T. Função do  
420 interferon-tau durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes.  
421 **Ciência Rual**, v. 41, n.1, 2011

422 SILVA, M.A.A, RODRIGUES, A.S, BRANDÃO, T.O, CARÔSO, B.S.S,  
423 MAGGITT JR. L., BITTENCOUT, R.F., CHALHOUB, M.C.L, RIBEIRO FILHO,  
424 A.L. Avaliação morfofuncional do corpo lúteo para diagnóstico precoce de  
425 gestação 20 dias após iatf em fêmeas bovinas mestiças leiteiras. **Pesquisa**  
426 **Veterinária Brasileira**, 2018.

- 427 SINGH, R., RANDHAWA, S.N.S., RANDHAWA, C.S. Body condition score and  
428 its correlation with ultrasonographic back fat thickness in transition crossbred  
429 cows. **Veterinary World** 8 (3), 290-294, 2015
- 430 TREVISOL, E.; ACKERMANN, C.L.; DESTRO, F.C.; AMARAL, J.B. Luteólise  
431 em bovinos: revisão. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.37, p.29-36,  
432 2013.
- 433 VIEIRA, L. M., SÁ FILHO, M. F., PUGLIESI, G., GUERREIRO, B. M.,  
434 CRISTALDO, M. A., BATISTA, E. O. S., BARUSELLI P. S. Resynchronization in  
435 dairy cows 13 days after TAI followed by pregnancy diagnosis based on corpus  
436 luteum vascularization by color doppler. **Animal Reproduction**, 11, 378, 2014
- 437 WAITE, A.L.; HOLTAN, D.W.; STORMSHAK, F. Changes in bovine luteal  
438 progesterone metabolism in response to exogenous prostaglandin F2alfa.  
439 **Domestic Animal Endocrinology**, v.28, p.162-171, 2005.

## **CAPÍTULO 2**

**Avaliação folicular de fêmeas zebuínas submetidas a diferentes protocolos de ressincronização superprecoce para IATF**

**ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE**

---

1 **Avaliação folicular de fêmeas Nelore submetidas a diferentes protocolos**  
2 **de ressincronização superprecoce para IATF**

3 Mariana Alves de Andrade Silva<sup>1\*</sup>, Bia Santos Souza Carôso<sup>1</sup>, Endrigo Adonis  
4 Braga de Araujo<sup>1</sup>, Marcus Vinicius Galvão Loiola<sup>1</sup>, Alexandra Soares Rodrigues<sup>2</sup>,  
5 Antonio de Lisboa Ribeiro Filho<sup>1</sup>

6

7 <sup>1</sup>Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia  
8 (UFBA), Salvador, BA, 40.170-110, Brazil

9 <sup>2</sup>Centro Multidisciplinar da Barra, Universidade Federal do Oeste da Bahia  
10 (UFOB), Barra, BA, 47.100-000 Brasil.

11

12 \*Corresponding author. Departamento de Anatomia, Patologia e Clínicas  
13 Veterinárias, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Av. Ademar de Barros, nº  
14 500, Ondina, Salvador, BA, 40170-110, Brasil.

15 Endereço de e-mail: [marianadeandradesilva@gmail.com](mailto:marianadeandradesilva@gmail.com)

16

17 **Resumo**

18 Objetivou-se avaliar o crescimento folicular de fêmeas que foram submetidas a  
19 quatro diferentes tipos de protocolo hormonal que propicie sincronização de  
20 estro e ovulação de forma superprecoce, 14 dias após a primeira indução de  
21 ovulação para IATF. Dessa maneira, foram utilizadas 33 fêmeas *Bos taurus*  
22 *indicus*, criadas em sistema extensivo. Tais fêmeas foram submetidas a um

23 primeiro protocolo de sincronização de estro e ovulação, iniciando com a  
24 inserção de um dispositivo de progesterona, contendo 1,9 g, associado à  
25 aplicação intramuscular de 2,0 mg de BE. Oito dias após, foi realizada a remoção  
26 dos dispositivos de progesterona, aplicação de 12,5 mg de dinoprost  
27 trometamina, 0,5 mg de cipionato de estradiol e 300 UI de gonadotrofina  
28 coriônica equina (eCG), sendo todas as aplicações realizadas pela via  
29 intramuscular. Posteriormente, as fêmeas que apresentaram corpo lúteo na  
30 avaliação ginecológica, foram divididas em quatro grupos, diferindo nos  
31 protocolos hormonais para ressincronização. As fêmeas destinadas aos grupos  
32 um e dois (G1 e G2), receberam dispositivo intravaginal de progesterona após  
33 22 dias do início do protocolo supracitado, além disso, as fêmeas do G1  
34 receberam 1,0 mg de BE. Oito dias após, retirou-se o dispositivo intravaginal  
35 destes animais, associando a aplicação de 12,5 mg de dinoprost trometamina,  
36 0,5 mg de cipionato de estradiol e 300 UI de eCG. Os animais que compuseram  
37 os grupos três e quarto (G3 e G4) receberam o dispositivo intravaginal de  
38 progesterona 23 dias após o início do primeiro protocolo de sincronização, além  
39 disso, as fêmeas do G3 receberam 1,0 mg de BE. Sete dias após o início do  
40 protocolo destas fêmeas, foi realizada aplicação de 12,5 mg de dinoprost  
41 trometamina (i.m.). Nove dias após a inserção dos dispositivos, foi realizada a  
42 remoção dos mesmos, aplicação de 0,5 mg de cipionato de estradiol e 300 UI de  
43 eCG. As avaliações para acompanhamento da dinâmica folicular iniciaram a  
44 partir do momento da aplicação do dinoprost trometamina, sendo realizadas a  
45 cada 12 horas, até que tenha sido identificada a ovulação ou 96 horas após a  
46 remoção dos implantes. Todas as avaliações de ovários contaram com a  
47 utilização de ultrassonografia em modo B e power Doppler. Foram realizadas

48 mensurações do diâmetro, área e área de vascularização da parede folicular.  
49 Além disso, foram realizadas três coletas de amostras de sangue para avaliação  
50 da concentração sérica de progesterona nos dias zero do protocolo de  
51 ressincronização, no dia da aplicação da prostaglandina, e no dia da  
52 inseminação do protocolo de ressincronização. Os dados obtidos foram  
53 avaliados pelo SPSS (versão 19) considerando  $P \leq 0,05$ . Não houve diferença  
54 significativa entre os protocolos de sincronização para nenhum dos parâmetros  
55 estruturais da dinâmica folicular. As concentrações séricas de progesterona pré-  
56 ovulatórias mantiveram-se semelhantes entre os grupos.

57 **Palavras-chave:** dinâmica folicular, vascularização, ovulação

#### 58 **Abstract**

59 The objective was to evaluate the follicular growth of females that were submitted  
60 to four different types of hormonal protocol that provide estrus synchronization  
61 and super-early ovulation 12 days after the first FTAI. Thus, 33 *Bos taurus indicus*  
62 females, reared in an extensive system, were used. Such females were submitted  
63 to a first protocol of estrus and ovulation synchronization, starting with the  
64 insertion of a progesterone device, containing 1.9g, associated with the  
65 application of 2.0mg of BE. Eight days later, the progesterone devices were  
66 removed, 12.5mg of dinoprost tromethamine, 0.5mg of estradiol cypionate and  
67 300 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG) were applied, all intramuscularly.  
68 Subsequently, the females that presented corpus luteum in the gynecological  
69 evaluation were divided into four groups differing in the hormonal protocols for  
70 resynchronization. Females assigned to groups one and two (G1 and G2)  
71 received an intravaginal progesterone device 22 days after the beginning of the

72 above mentioned protocol, in addition, the females of G1 received 1.0mg of BE.  
73 Eight days later, the intravaginal device was removed from these animals,  
74 associating the application of 12.5mg of dinoprost tromethamine, 0.5mg of  
75 estradiol cypionate and 300 IU of eCG. The animals that composed groups three  
76 and four (G3 and G4) received the intravaginal progesterone device 23 days after  
77 the beginning of the first synchronization protocol, in addition, the females of G3  
78 received 1.0mg of BE. Seven days after the beginning of the protocol for these  
79 females, 12.5mg of dinoprost tromethamine (i.m.) was applied. Nine days after  
80 insertion of the devices, they were removed, 0.5mg of estradiol cypionate and  
81 300 IU of eCG were applied. Evaluations to monitor follicular dynamics started  
82 from the moment of application of dinoprost tromethamine, being performed  
83 every 12 hours, until ovulation has been identified or 96 hours after implant  
84 removal. All evaluations of the ovaries relied on the use of B-mode  
85 ultrasonography and power doppler. The diameter, area and area of  
86 vascularization of the follicular wall were measured. In addition, three blood  
87 samples were collected to evaluate the serum concentration of progesterone on  
88 days zero of the resynchronization protocol, on the day of prostaglandin  
89 application, day 10 for G1 and G2 and day 11 for G3 and G4, of the protocol of  
90 resynchronization . The data obtained were evaluated by SPSS (version 19)  
91 considering  $P \leq 0.05$ . There was no significant difference between the  
92 synchronization protocols for any of the structural parameters of follicular  
93 dynamics. Pre-ovulatory serum progesterone concentrations remained similar  
94 between groups.

95 **Keywords:** follicular dynamics, vascularization, ovulation

## 96 **Introdução**

97           A utilização de hormônios exógenos para sincronização de estro e  
98 ovulação trouxeram para a pecuária grande avanço para incremento da  
99 produtividade e possibilidade de melhoramento genético. Dessa forma, a  
100 identificação do estro foi suprimida para realização de inseminação artificial em  
101 tempo fixo de todo o rebanho. No entanto, a detecção de fêmeas não gestantes  
102 de forma tardia, poderá impactar negativamente na possibilidade de redução da  
103 estação de monta (PUGLIESI et al., 2019). Os protocolos de inseminação em  
104 tempo fixo variam normalmente entre 10 a 11 dias, e só após 28 a 30 dias deste  
105 protocolo, as fêmeas podem ser diagnosticadas através da avaliação  
106 ultrassonográfica em modo B (RIBEIRO-FILHO et al., 2001).

107           Alternativas para redução do período refratário após a primeira IATF, seria  
108 ressinchronização das fêmeas mesmo antes do diagnóstico de gestação. Desta  
109 forma, a ultrassonografia modo Doppler trouxe a possibilidade da avaliação  
110 luteal, e através da presença da vascularização desta estrutura, estabelecer o  
111 diagnóstico preditivo 20 dias após a primeira inseminação (PUGLIESI et al. 2017,  
112 SILVA et al. 2018). Tal tecnologia proporciona o início do protocolo de  
113 ressinchronização dessas fêmeas 12 a 14 dias após a primeira IATF, tornando  
114 possível a realização de duas inseminações em um intervalo de 22 dias,  
115 favorecendo a redução da estação de monta (PUGLIESI et al. 2019).

116           O dispositivo intravaginal de progesterona e o estradiol (17-beta ou  
117 benzoato) são comumente utilizados para recrutamento de uma nova onda de  
118 desenvolvimento folicular em programas de IATF, no entanto, não se sabe se a  
119 administração do estradiol de forma precoce, aos 14 dias após a primeira IATF,

120 podem causar perdas gestacionais, já que o estradiol está envolvido na liberação  
121 pulsátil da prostaglandina pelo útero (PUGLIESI et al., 2019).

122        Outro fator que vem sendo amplamente estudado constitui o momento de  
123 aplicação da PGF2 $\alpha$ . Peres et al. (2009) , em protocolos de IATF a base de  
124 progesterona e estrógeno, estudaram o efeito de aplicação da PGF2 $\alpha$  no dia  
125 sete em relação ao dia nove do protocolo, verificando que fêmeas não lactantes  
126 que tiveram o tratamento com PGF2 $\alpha$  no dia sete do protocolo demonstraram  
127 níveis baixos de progesterona e maiores diâmetros foliculares durante a IATF,  
128 sendo ambas as características associadas a uma maior taxa de concepção. Em  
129 concordância a estes achados, Meneghetti et al. (2009), ao administrarem a  
130 PGF2 $\alpha$  no dia sete em vacas zebuínas, obtiveram altas taxas de concepção em  
131 fêmeas com presença de CL em comparação aquelas que receberam o  
132 hormônio no dia nove.

133        A antecipação da luteólise em um protocolo de IATF tem sido associada  
134 ao aumento do período de proestro e melhores condições reprodutivas, sendo  
135 caracterizado pela elevação das concentrações de estradiol próximo da IA,  
136 redução da possibilidade de perda embrionária pela menor ocorrência de ciclos  
137 curtos e aumento das concentrações de progesterona após a IA (RODRIGUES  
138 et al., 2018).

139        Diante do exposto, é possível observar que os resultados do uso do  
140 estradiol, em protocolos de ressincronização superprecoce, sobre a atividade  
141 luteal ainda são controversos na literatura, assim como o momento ideal para  
142 realização de luteólise em fêmeas. Devido a importância desse método para  
143 otimizar a EM e melhorar a eficiência reprodutiva dos rebanhos de corte

144 nacionais, o presente trabalho propõe a utilização de diferentes protocolos de  
145 sincronização de estro e ovulação para que a atividade ovariana no tocante ao  
146 crescimento folicular seja avaliada.

147

## 148 **Material e métodos**

149 Este estudo foi realizado em conformidade com as recomendações do  
150 Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal do Brasil (CONCEA).  
151 Os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pelo Comitê de  
152 Ética no Uso de Animal da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da  
153 Universidade Federal da Bahia (UFBA), Bahia, Brasil (nº 32/2020).

154

### 155 *Local e animais*

156 O experimento foi realizado entre os meses de novembro de 2020 a  
157 agosto de 2021, na fazenda Bekcmann, localizada no município de Amélia  
158 Rodrigues, Bahia. A região apresenta pluviosidade média anual de 1277mm e  
159 possui clima Tropical Litorâneo. A propriedade adotava um sistema extensivo de  
160 criação, tendo seus animais mantidos em pastagens de *Brachiaria Decumbens*,  
161 suplementação mineral e acesso à água *ad libitum*.

162 Para a realização deste trabalho, foram utilizadas 33 vacas de corte *Bos*  
163 *taurus indicus*, múltíparas em lactação, média de escore de condição corporal  
164 (ECC)  $3,0 \pm 0,5$ , na escala de 1 a 5 (SINGH et al., 2015), idade entre 4 a 9 anos.

165           Previamente ao início do experimento, os animais foram submetidos ao  
166 exame clínico-ginecológico e ultrassonografia transretal utilizando-se um  
167 transdutor linear com frequência de 7,5MHz (Mindray Z5, Shenzhen, China).  
168 Foram consideradas aptas a participar do experimento, somente fêmeas não  
169 gestantes e que apresentaram no momento da avaliação ausência de  
170 anormalidades no trato reprodutivo.

171

#### 172 *Protocolos de sincronização e ressincronização*

173           Todos os animais foram submetidos ao seguinte protocolo de  
174 sincronização de estro e ovulação: em um dia aleatório do ciclo estral,  
175 denominado dia menos 22 (D-22), todos os animais receberam um dispositivo  
176 intravaginal (CIDR<sup>®</sup>, Zoetis, São Paulo, Brasil) contendo 1,9 g de P4 associado  
177 a 2 mg de Benzoato de Estradiol (BE) (GONADIOL<sup>®</sup>, Zoetis, São Paulo, Brasil)  
178 por via intramuscular (i.m.). No dia menos 14 (D-14) foram removidos os  
179 dispositivos de P4 e administrado 12,5 mg de Dinoprost Trometamina (PGF<sub>2</sub>α)  
180 (LUTALYSE<sup>®</sup>, Zoetis, São Paulo, Brasil) i.m., seguido por 1 mg de Cipionato de  
181 Estradiol (CE) (ECP<sup>®</sup>, Zoetis, São Paulo, Brasil) i.m. e 300 UI de Gonadotrofina  
182 Coriônica Equina i.m. (eCG, NOVORMON<sup>®</sup>, MSD Saúde Animal, São Paulo,  
183 Brasil).

184           As fêmeas que apresentaram corpo lúteo foram divididas em quatro  
185 grupos que diferiram nos tratamentos hormonais para ressincronização em  
186 protocolos de três e quatro manejos. As fêmeas destinadas aos grupos um e  
187 dois (G1, sete animais e G2, seis animais), receberam dispositivo intravaginal

188 contendo 1,9 g de P4 (CIDR<sup>®</sup>, Zoetis, São Paulo, Brasil) 22 dias do início do  
189 protocolo acima citado, caracterizado dia zero (D0) do protocolo de  
190 ressincronização, além disso, as fêmeas do G1 receberam 1,0 mg de BE  
191 (GONADIOL<sup>®</sup>, Zoetis, São Paulo, Brasil). Oito dias após (D8), retirou-se o  
192 dispositivo intravaginal destes animais, associando a aplicação de 12,5 mg de  
193 dinoprost trometamina (LUTALYSE<sup>®</sup>, Zoetis, São Paulo, Brasil), seguido por 1  
194 mg de Cipionato de Estradiol (CE) (ECP<sup>®</sup>, Zoetis, São Paulo, Brasil) i.m. e 300  
195 UI de Gonadotrofina Coriônica Equina i.m. (eCG, NOVORMON<sup>®</sup>, MSD Saúde  
196 Animal, São Paulo, Brasil). Entre 48 e 52 horas após a remoção dos implantes  
197 as inseminações artificiais em tempo fixo foram realizadas, caracterizando  
198 protocolo de três manejos.

199 Os animais que compuseram os grupos três e quarto (G3, quatro animais  
200 e G4, quatro animais) receberam o dispositivo intravaginal de progesterona 23  
201 dias após o início do primeiro protocolo hormonal, sendo caracterizado D0 do  
202 protocolo de ressincronização; além disso, as fêmeas do G3 receberam 1,0mg  
203 de BE. Sete dias (D7) após o início do protocolo destas fêmeas, foi realizada  
204 aplicação de 12,5 mg de dinoprost trometamina (LUTALYSE<sup>®</sup>, Zoetis, São Paulo,  
205 Brasil) (i.m.). Nove dias (D9) após a inserção dos dispositivos, foi realizada a  
206 remoção dos mesmos, seguido por 1 mg de CE (ECP<sup>®</sup>, Zoetis, São Paulo, Brasil)  
207 i.m. e 300 UI de eCG (i.m.) (NOVORMON<sup>®</sup>, MSD Saúde Animal, São Paulo,  
208 Brasil). Entre 48 e 52 horas após a remoção dos implantes as inseminações  
209 artificiais em tempo fixo foram realizadas, caracterizando protocolo de quatro  
210 manejos.

211 Após realização da primeira sincronização do estro e ovulação de 33  
212 animais, apenas 25 responderam ao protocolo, apresentando corpo lúteo no  
213 momento da avaliação para a ressincronização, perfazendo 75,75% dos  
214 animais. Após o início da ressincronização, quatro fêmeas não retornaram para  
215 as avaliações, sendo considerada parcela perdida. Dessa forma, foram obtidos  
216 dados em relação às variáveis de desenvolvimento folicular e progesterona de  
217 21 animais.

218

#### 219 *Avaliações ultrassonográficas*

220 Os exames ultrassonográficos foram realizados utilizando um aparelho  
221 portátil equipado com as funções modo B e doppler (Mindray Z5, Shenzhen,  
222 China). Para as avaliações em modo B, empregou-se um transdutor transretal  
223 com frequência de 6,5 MHz. No modo doppler, as configurações foram ajustadas  
224 na faixa de velocidade de 6 cm/s para detectar movimento das células  
225 sanguíneas em pequenos vasos, para tanto, foi utilizado modo power-Doppler,  
226 em uma frequência de 8,5 Mhz, com padrões de ganho de cor de 70%,  
227 frequência de repetição de pulsos (PRF) de 0,5 KHz e a profundidade de  
228 avaliação de seis centímetros.

229

#### 230 *Avaliações foliculares*

231 O desenvolvimento folicular foi monitorado por avaliações  
232 ultrassonográficas modo B e power-Doppler realizadas a cada 12 horas entre o  
233 dia da remoção dos implantes de progesterona e o momento da ovulação.

234 Naqueles animais que não se detectou a ovulação, essa análise aconteceu até  
235 96 horas após a remoção do implante. Os ovários foram localizados e avaliados  
236 por ultrassonografia em modo B e a imagem do maior folículo foi congelada  
237 para determinação do diâmetro do folículo dominante no dia da aplicação do  
238 dinoprost trometamina (DFOLpgf), no dia da inseminação (DFOLin) e no  
239 momento prévio a ovulação (DFOLpréov) do protocolo de ressincronização. Para  
240 verificar o diâmetro do folículo pré-ovulatório (DFOLpréov) mensurou-se a  
241 imagem do maior folículo previamente ao seu desaparecimento em decorrência  
242 da ovulação. Também se empregou a ultrassonografia modo B para mensuração  
243 da área total da parede do folículo dominante no dia da aplicação do dinoprost  
244 trometamina (AFOLpgf), no da inseminação (AFOLin) e assim como do folículo  
245 pré-ovulatório (AFOLpréov). A ovulação foi definida pelo desaparecimento do  
246 folículo pré-ovulatório presente no exame anterior.

247 As imagens dos folículos foram armazenadas também com recurso power  
248 Doppler ativado para quantificar a área de vascularização da parede do folículo  
249 dominante no dominante no dia da aplicação do dinoprost trometamina  
250 (VFOLpgf), no dia da inseminação (VFOLin), assim como, a área de  
251 vascularização da parede do folículo pré-ovulatório (VFOLpréov).

252 Os dados obtidos pela ultrassonografia modo B e doppler foram  
253 submetidos a avaliação objetiva segundo Ghetti (2012). Para tanto, calculou-se  
254 a área total da parede do folículo em cada animal, utilizando uma função do  
255 próprio aparelho. Posteriormente, fez-se o cálculo da área de vascularização  
256 utilizando o cursor para se determinar a área de vascularização na parede do  
257 folículo. O percentual de vascularização na área da parede do folículo dominante

258 no dia da aplicação do dinoprost trometamina (%VFOLpgf), no dia da  
259 inseminação (%VFOLin), e no folículo pré-ovulatório (%VFOLpréov) foi obtido  
260 pela razão entre a área de vascularização e área total da parede folicular.

261

#### 262 *Coleta de sangue e dosagem de progesterona*

263 As amostras de sangue para dosagem da concentração sérica de P4  
264 foram coletadas nos dias zero (P4D0) e no dia da aplicação do dinoprost  
265 trometamina (P4PGF) e no dia da inseminação (P4IATF), por meio da punção  
266 venosa coccígea, em tubos a vácuo de 10 mL, sem anticoagulante  
267 (VACUTAINERR, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA) e  
268 imediatamente refrigeradas em isopor contendo gelo e permanecendo a uma  
269 temperatura de 4°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3.000 x  
270 g por 15 minutos para separação do soro, que foi transferido para microtubos de  
271 polietileno identificados. Posteriormente as amostras foram armazenadas a -  
272 20°C, até o momento da análise. As análises da concentração de P4 foram  
273 realizadas pela metodologia de quimioluminescência, utilizando o *imunoensaio*  
274 *Access immunoassay systems Progesterone* (Beckman Coulter, Fullerton, CA,  
275 USA), no Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da  
276 UFBA.

277

#### 278 *Análise estatística*

279 Para a análise estatística da dinâmica folicular foram estudados os  
280 seguintes dados: DFOLpgf - diâmetro do folículo dominante no momento da

281 aplicação do dinoprost trometamina, DFOLin - diâmetro do folículo dominante no  
282 dia da inseminação, DFOLpréov - diâmetro do folículo pré-ovulatório, AFOLpgf  
283 – área total da parede do folículo dominante no momento da aplicação do  
284 dinoprost trometamina, AFOLin - área total da parede do folículo dominante no  
285 dia da inseminação, AFOLpréov - área total da parede do folículo pré-ovulatório,  
286 VFOLpgf - área de vascularização da parede do folículo dominante no momento  
287 da aplicação do dinoprost trometamina, VFOLin - área de vascularização da  
288 parede do folículo dominante no dia da inseminação, VFOL - área de  
289 vascularização da parede do folículo pré-ovulatório, %VFOLpgf - percentual de  
290 vascularização na área da parede do folículo dominante no momento da  
291 aplicação do dinoprost trometamina, %VFOLin - percentual de vascularização na  
292 área da parede do folículo dominante no dia da inseminação, %VFOLpréov -  
293 percentual de vascularização na área da parede do folículo pré-ovulatório e MOM  
294 - tempo entre a remoção do dispositivo de progesterona e a ovulação.

295 Os dados foram processados usando o *Statistical Package for Social*  
296 *Science* (SPSS) versão 19 (SPSS, 2012). Para tanto, se realizou a seguinte  
297 sequência de análises: 1- A média e desvio padrão das variáveis de interesse ao  
298 estudo foram obtidas por meio da análise descritiva; 2- As diferenças entre as  
299 médias das variáveis avaliadas nos diferentes grupos experimentais foram  
300 comparadas utilizando-se a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey. 3-  
301 Foi realizada uma análise de Variância de Medidas Repetidas (ANOVA - MR)  
302 com o objetivo de avaliar o folículo ao longo do tempo. Quando observada  
303 diferença relevante, os testes de post-hoc de Bonferroni foram empregados.

304 Para todas as análises foram consideradas diferenças significativas quando o  
305  $P \leq 0,05$ .

306

## 307 Resultados

308 Segundo a avaliação estatística dos dados, não houve diferença  
 309 significativa entre as variáveis de diâmetro e área folicular estudadas entre os  
 310 diferentes grupos, como pode-se verificar na Tabela 1.

311 **Tabela 1** - Efeito dos diferentes protocolos de ressincronização sobre características foliculares  
 312 avaliadas por ultrassonografia modo B.

Variáveis	Protocolos de ressincronização				p-valor	Total (Média±S) (n=21)
	G1 (Média±S) (n=7)	G2 (Média±S) (n=6)	G3 (Média±S) (n=4)	G4 (Média±S) (n=4)		
DFOLpgf (cm)	0,72±0,27 <sup>a</sup>	0,65±0,20 <sup>a</sup>	0,61±0,06 <sup>a</sup>	0,79±0,09 <sup>a</sup>	0,59	0,69±0,19
DFOLin (cm)	0,95±0,27 <sup>b</sup>	0,96±0,31 <sup>b</sup>	0,88±0,22 <sup>b</sup>	1,02±0,23 <sup>b</sup>	0,91	0,95±0,25
DFOLpréov (cm)	1,17±0,13 <sup>c</sup>	1,23±0,14 <sup>c</sup>	1,15±0,05 <sup>c</sup>	1,18±0,06 <sup>c</sup>	0,39	1,18±0,24
AFOLpgf (cm <sup>2</sup> )	0,20±0,10	0,16±0,05	0,16±0,01	0,23±0,09	0,51	0,19±0,081
AFOLin (cm <sup>2</sup> )	0,29±0,12	0,28±0,13	0,14±0,06	0,27±0,07	0,90	0,27±0,10
AFOLpréov (cm <sup>2</sup> )	0,68±0,41	0,76±0,521	0,31±0,08	0,33±0,048	0,17	0,57±0,40
MOM (horas)	80,57±11,41	84,00±13,14	96,00±0,00	84,14±13,85	0,22	85,14±11,94

313 DFOLpgf= diâmetro do folículo dominante no momento da aplicação do dinoprost trometamina;  
 314 DFOLin= diâmetro do folículo dominante no dia da inseminação; DFOLpréov= diâmetro do  
 315 folículo pré-ovulatório; AFOLpgf= área total da parede do folículo dominante no dia da aplicação  
 316 do dinoprost trometamina; AFOLin= área total da parede do folículo dominante no dia da  
 317 inseminação; AFOLpréov= área total da parede do folículo pré-ovulatório; MOM= Tempo entre a  
 318 remoção do dispositivo de progesterona e a ovulação. Letras diferentes na mesma coluna  
 319 divergem estatisticamente intragrupo (P<0,001).

320

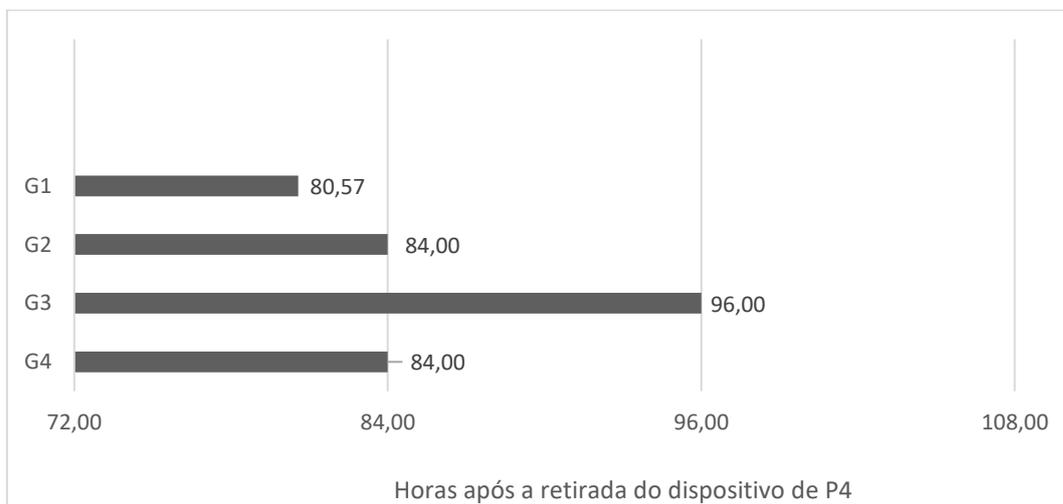
321 Ao serem avaliadas as medidas de diâmetro folicular ao longo do tempo,  
 322 observou-se uma diferença significativa, P<0,001, não havendo interferência do  
 323 tratamento utilizado.

324 Uma avaliação relevante para realização de protocolos de inseminação  
 325 em tempo fixo é o momento da ocorrência da ovulação. Tal parâmetro é  
 326 significativo ao programarmos o melhor momento para atingir uma maior  
 327 fertilidade dessas fêmeas, dessa forma, na Figura 1 pode-se observar a

328 equidade dos grupos em relação ao tempo transcorrido entre a aplicação da  
329 dinoprost trometamina e a ovulação.

330

331 **Figura 1** - Momento da ovulação (h) em relação à retirada do dispositivo intravaginal de  
332 progesterona nos diferentes grupos experimentais.



333

334

335 Seguindo a mesma premissa, também não foi possível verificar qualquer  
336 alteração entre os grupos levando em consideração as variáveis avaliadas  
337 através da ultrassonografia modo Doppler, Tabela 2. Em contraponto, ao serem  
338 avaliadas as medidas de área de vascularização da parede folicular, observou-  
339 se uma elevação no padrão entre o dia da aplicação do dinoprost trometamina  
340 quando comparado ao dia da inseminação e ao folículo pré-ovulatório,  $P=0,01$ .

341

342 **Tabela 2-** Efeito dos diferentes protocolos de ressincronização sobre características foliculares  
343 avaliadas por ultrassonografia modo doppler colorido.

Variáveis	Protocolos de ressincronização					p-valor	Total (Média±S) (n=21)
	G1 (Média±S) (n=7)	G2 (Média±S) (n=6)	G3 (Média±S) (n=4)	G4 (Média±S) (n=4)			
VFOLpgf (cm <sup>2</sup> )	0,09±0,12 <sup>a</sup>	0,06±0,05 <sup>a</sup>	0,04±0,02 <sup>a</sup>	0,04±0,04 <sup>a</sup>	0,79	0,06±0,08	
VFOLin (cm <sup>2</sup> )	0,12±0,10 <sup>b</sup>	0,16±0,10 <sup>b</sup>	0,09±0,05 <sup>b</sup>	0,13±0,03 <sup>b</sup>	0,65	0,13±0,08	
VFOLpréov (cm <sup>2</sup> )	0,14±0,15 <sup>b</sup>	0,24±0,14 <sup>b</sup>	0,16±0,06 <sup>b</sup>	0,07±0,05 <sup>b</sup>	0,25	0,16±0,12	
% VFOLpgf	32,79±29,66	36,86±30,56	28,62±15,19	19,23±18,45	0,76	30,58±24,96	
% VFOLin	37,38±17,95	51,17±29,27	39,37±29,30	52,81±21,68	0,65	44,64±23,67	
% VFOLpréov	26,97±33,99	32,46±22,84	54,27±27,06	22,46±15,06	0,35	32,88±27,32	

344 VFOLpgf= área de vascularização da parede do folículo dominante no dia da aplicação do  
345 dinoprost trometamina; VFOLin= no dia da inseminação; VFOLpréov= área de vascularização da  
346 parede do folículo pré-ovulatório; %VFOLpgf= percentual de vascularização na área da parede  
347 do folículo dominante no dia da aplicação do dinoprost trometamina, %VFOLin= no dia da  
348 inseminação; %VFOLpréov= percentual de vascularização na área da parede no folículo pré-  
349 ovulatório. Letras diferentes na mesma coluna divergem significativamente intragrupo, P=0,01.

350

351 Avaliando as concentrações de progesterona ao longo dos dias,  
352 observou-se que no P4D0 o nível de progesterona foi maior (p<0,001) que no  
353 dia da aplicação do dinoprost trometamina (p<0,01) e no dia da inseminação  
354 (p<0,01).

355 **Tabela 3 –** Dosagem de progesterona em três diferentes momentos da execução do protocolo  
356 de IATF em 4 diferentes tipos de protocolos hormonais.

Variáveis	Protocolos de ressincronização					p-valor	Total (Média±S) (n=21)
	G1 (Média±S) (n=7)	G2 (Média±S) (n=6)	G3 (Média±S) (n=4)	G4 (Média±S) (n=4)			
P4D0 (ng/mL)	12,4±4,58 <sup>a</sup>	16,36±4,70 <sup>a</sup>	19,00±14,10 <sup>a</sup>	10,80±2,68 <sup>a</sup>	0,32	14,48±7,22 <sup>a</sup>	
P4PGF (ng/mL)	5,20±1,60 <sup>b</sup>	4,51±1,67 <sup>b</sup>	10,60±11,40 <sup>b</sup>	7,87±5,58 <sup>b</sup>	0,31	6,54±5,56 <sup>b</sup>	
P4 IATF (ng/mL)	0,67±0,35 <sup>c</sup>	0,65±0,25 <sup>c</sup>	0,95±0,42 <sup>c</sup>	0,70±0,21 <sup>c</sup>	0,49	0,72±0,31 <sup>c</sup>	

357 P4D0 = Dosagem de progesterona no dia zero no protocolo de ressincronização

358 P4PGF = Dosagem de progesterona no dia da aplicação de prostaglandina no protocolo de ressincronização

359 P4IATF = Dosagem de progesterona no dia da inseminação no protocolo de ressincronização

360 Letras diferentes nas colunas divergem significativamente intragrupo (p<0,001).

361

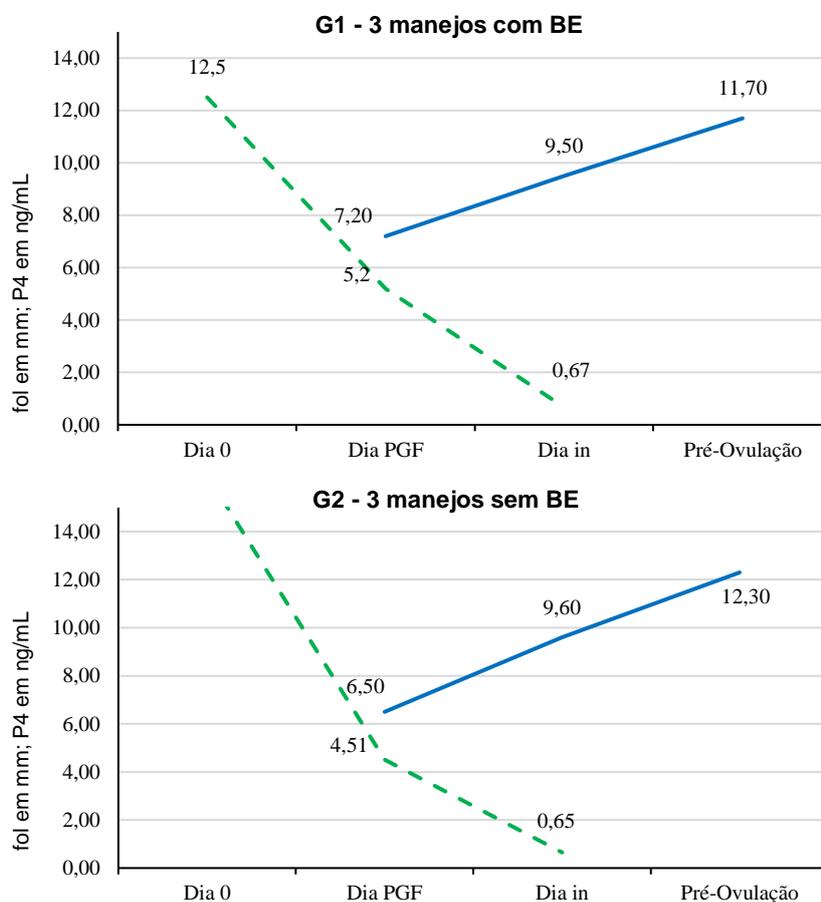
362 As variáveis de diâmetro folicular associados a concentração de  
363 progesterona estão demonstradas em gráfico individualmente por grupo na  
364 Figura 2, pode-se perceber a redução do padrão da progesterona  
365 concomitantemente a elevação do desenvolvimento do folículo.

366

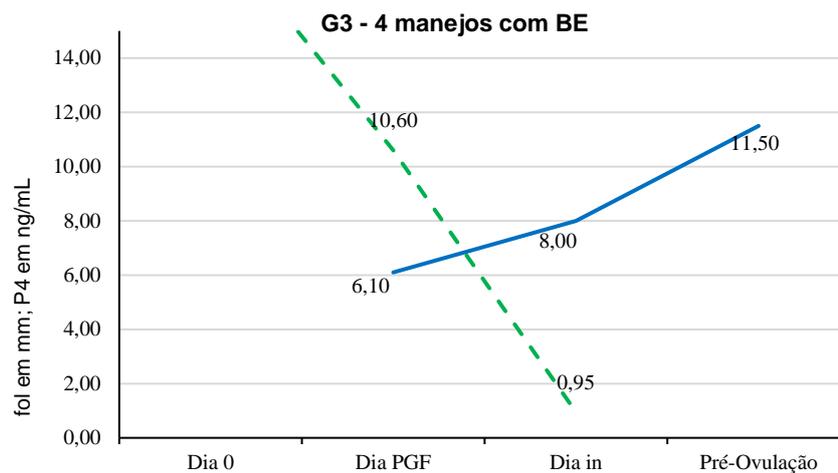
367 **Figura 2 –** Diâmetro do folículo dominante (mm) nos dias da aplicação do dinoprost trometamina,  
368 dia da inseminação e do folículo pré-ovulatório (mm) e concentração sérica de  
369 progesterona (ng/mL) nos dias 0, dia da aplicação do dinoprost trometamina e dia da  
370 inseminação.

371

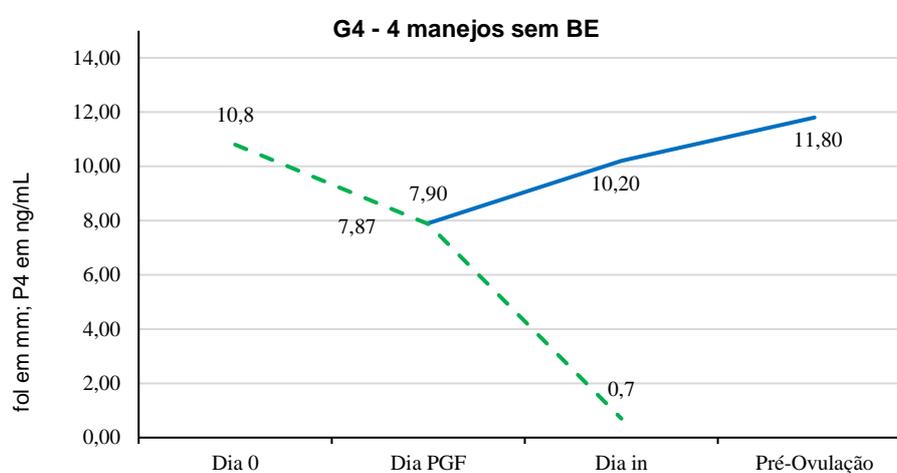
372



373



374



375

376

377

— Diâmetro (mm)    - - - [ ] P4 (ng/ml)

378

379

## Discussão

380

381

382

383

384

385

386

O desenvolvimento dos folículos ovarianos está estreitamente relacionado a formação da rede vascular na teca interna para prover nutrientes e suportar a esteroidogênese. Assim, resultados indicam uma associação positiva entre a vascularização e a função folicular (VIANA et al., 2013). Nesse sentido uma maior perfusão sanguínea é observada na parede folicular de folículos dominantes e pré-ovulatórios (MIYAMOTO et al. 2006), bem como os resultados observados no presente estudo.

387            Similarmente, tratamentos que promovem maior crescimento do folículo  
388 dominante resultam em um folículo pré-ovulatório mais vascularizado e com  
389 maior capacidade de secreção de estradiol do que folículos menores  
390 (MESQUITA et al., 2017). Assim, a avaliação da vascularização na parede de  
391 folículos dominantes no dia da retirada de dispositivo intravaginal em protocolos  
392 de IATF, ou de folículos pré-ovulatórios no dia da IATF poderia indicar a  
393 funcionalidade folicular

394            Estes achados enfatizam a importância de um adequado ambiente  
395 endócrino durante o crescimento e maturação do folículo ovulatório nos  
396 protocolos de sincronização para IATF. Alguns estudos relatam que altas  
397 concentrações circulantes de P4 pré-ovulatórias podem diminuir a eficiência dos  
398 protocolos de sincronização e podem estar relacionadas com a redução na  
399 pulsatilidade de LH, desencadeando diminuição no desenvolvimento folicular e  
400 conseqüentemente no diâmetro do folículo ovulatório (DADARWAL et al., 2013;  
401 MARTINS et al., 2014; SALES et al., 2015).

402            Ferraz et al. (2019) ao avaliar diferentes protocolos de sincronização de  
403 estro e ovulação para IATF, verificaram diferença significativa ( $P < 0,05$ ), no  
404 desenvolvimento do diâmetro de folículos, assim como área de vascularização  
405 do folículo pré-ovulatório quando comparando fêmeas que apresentavam baixa  
406 concentração de progesterona em relação àquelas com elevada dosagem deste  
407 hormônio. Adicionado a esse fato, o tempo transcorrido entre remoção dos  
408 implantes de progesterona até a ovulação também foi maior em fêmeas com  
409 maiores concentrações circulantes de P4 ( $P < 0,05$ ). Ao observarmos as  
410 concentrações de progesterona do presente estudo, o que se pode perceber é

411 que as fêmeas já se encontravam em luteólise, propiciando em ambiente  
412 endócrino favorável ao desenvolvimento folicular. Desta forma, as alterações dos  
413 protocolos em relação a aplicação da prostaglandina, não influenciaram em um  
414 melhor desempenho das fêmeas.

415         Pode-se afirmar que a luteólise das fêmeas avaliadas ocorreu de forma  
416 adequada, levando-se em consideração médias propostas por Ribeiro et al.  
417 (2012), quando afirmam luteólise completa quando são constatadas  
418 concentrações séricas abaixo de 1ng/mL deste hormônio.

419         Rodrigues et al. (2018), utilizando metodologia de avaliação folicular  
420 semelhante à proposta por este experimento, em fêmeas bovinas submetidas a  
421 protocolos de quatro manejos para sincronização de estro e ovulação,  
422 demonstraram similaridade entre as variáveis diâmetro folicular, área de  
423 vascularização da parede folicular em relação aos resultados expostos  
424 anteriormente. Em relação ao momento da ovulação das fêmeas, observa-se  
425 uma disparidade entre os resultados, quando obteve média de 70 horas entre a  
426 remoção dos implantes e a ovulação propriamente dita, sendo considerado  
427 tempo inferior ao encontrado neste trabalho, com média de 85 horas  
428 transcorridas.

429         Brito et al., (2020), ao realizarem avaliação de dinâmica folicular em  
430 fêmeas bovinas, também observou incremento tanto no diâmetro folicular, desde  
431 o momento da remoção dos implantes de P4 até a constatação da ovulação,  
432 quanto na área de vascularização da parede destas estruturas ovarianas.

433 Motta et al. (2020) ao realizar ressincronização superprecoce em fêmeas  
434 bovinas utilizando dois protocolos teste, com benzoato de estradiol no dia zero  
435 (grupo teste 1) e E2 associado a 9 mg de progesterona de longa ação (grupo  
436 teste 2), 14 dias após a IATF, verificou que em ambos os grupos avaliados, as  
437 fêmeas que se tornaram gestante, apresentaram emergência de nova onda de  
438 crescimento folicular em média de 4 dias. Foi observado também que o diâmetro  
439 do maior folículo no momento da remoção dos implantes não diferiu entre os  
440 grupos, apresentado-se similar ao encontrado no presente trabalho, 0,8mm. Ao  
441 final das suas avaliações, concluíram que o tratamento com 1 mg BE no início  
442 do protocolo da ressincronização superprecoce, aumentou a taxa de prenhez em  
443 novilhas submetidas a segunda IATF, além disso, foi constatado que a  
444 administração de E2 ou BE em baixas doses (1 mg) aos 14 dias pós-IATF não  
445 induz luteólise e não comprometeu a prenhez em novilhas.

446 Silva et al. (2021) ao avaliarem a eficácia da utilização de três diferentes  
447 doses de BE (1, 1,5 e 2 mg) em primíparas e múltíparas constataram que o  
448 desenvolvimento da onda folicular se deu de forma semelhante entre as fêmeas  
449 submetidas aos diferentes tratamentos. Porém, as primíparas apresentaram  
450 redução do diâmetro folicular em relação às múltíparas. Os valores de diâmetro  
451 folicular pré-ovulatórios foram similares com os resultados aqui apresentados,  
452 média de 11 mm. Desta forma, constataram que a dose de 1mg de BE é eficiente  
453 da sincronização de nova onda folicular, assim como nos resultados expostos  
454 neste trabalho.

455 Palhão et al. (2020) ao realizarem protocolo de ressincronização  
456 superprecoce, obteve taxa de gestação acumulativa de 70%, realizadas em

457 intervalo de 23 dias. Desta forma, os autores supracitados afirmam que, embora  
458 esta nova abordagem possa aumentar a complexidade das rotinas de manejo  
459 reprodutivo, tem um potencial para reduzir o intervalo médio entre partos, ou a  
460 duração da estação de monta.  
461

## 462 **Conclusão**

463 Os diferentes protocolos de sincronização de estro e ovulação superprecoce  
464 foram eficientes ao promover o recrutamento de nova onda de crescimento  
465 folicular. A não utilização do benzoato de estradiol não impactou negativamente  
466 no desenvolvimento das estruturas ovarianas, assim como não reduziu as taxas  
467 de ovulação. Ao eleger um protocolo de sincronização para IATF, fatores outros  
468 devem ser levados em consideração, como manejo dos animais e estrutura da  
469 propriedade.

470

## 471 **Declaração de contribuição de autoria do CRediT**

472 **Mariana Alves de Andrade Silva** Conceitualização, Metodologia,  
473 Investigação e Redação original do manuscrito. **Alexandra Soares Rodrigues**  
474 **e Marcus Vinícius Galvão Loiola:** Análise formal, Curadoria de dados, Redação  
475 - rascunho original, Redação - revisão e edição. **Bia Sousa Carôso; Endrigo**  
476 **Adonis Braga de Araujo:** Investigação e Curadoria de dados. **Antônio de**  
477 **Lisboa Ribeiro Filho:** Conceitualização, Metodologia, Captação de recursos,  
478 Visualização, Investigação, Análise formal, Supervisão, Administração de  
479 projetos, Redação - rascunho original, Redação - revisão e edição.

480

## 481 **Agradecimentos**

482 Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
483 Superior – CAPES pela concessão de Bolsa de Estudos (Código de

484 financiamento 001), ao Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências da  
485 Saúde (ICS) da UFBA e à Fazenda Beckmann.

486 **Conflito de Interesse:**

487 Os autores declaram que não há conflito de interesses que possa ser  
488 prejudicial à imparcialidade da pesquisa relatada.

489

490

491

492

493

494

495 **Referências**

- 496 BRITO, L.S., MAGITTI JUNIOR, L.D.P., FERRAZ, P.A., VASCONCELOS, I.C.,  
497 DA SILVA CARVALHO, J.V.G., LOIOLA, M.V.G., RIBEIRO FILHO, A.L. Efeitos  
498 da gonadotrofina coriônica equina administrada através do ponto de  
499 acupuntura Baihui na dinâmica folicular ovariana e na função lútea de bovinos  
500 durante um regime de tratamento de sincronização da ovulação para  
501 inseminação artificial em tempo fixo. **Animal Reproduction Science** , v. 223,  
502 p. 106631, 2020.
- 503 DADARWAL, D.; MAPLETOFT, R. J.; ADAMS, G. P.; PFEIFER, L. F. M.;  
504 CREELMAN, C.; SINGH, J. Effect of progesterone concentration and duration  
505 of proestrus on fertility in beef cattle after fixed-time artificial insemination.  
506 **Theriogenology**, v. 79, p. 859-866, 2013.
- 507 FERRAZ P.A., SILVA M.A.A., CARÔSO B.S.S., ARAUJO E.A.B.,  
508 BITTENCOURT T.C.B.S.C., CHALHOUB M., BITTENCOURT R.F. & RIBEIRO  
509 FILHO A.L. Effect of eCG on the follicular dynamics and vascularization of  
510 crossbred cows with different circulating progesterone concentrations during  
511 synchronization of ovulation in an FTAI protocol. **Pesquisa Veterinária**  
512 **Brasileira** 39(5):324-331. 2019
- 513 MARTINS, T.; PERES, R. F. G.; RODRIGUES, A. D. P.; POHLER, K. G.;  
514 PEREIRA, M. H. C.; DAY, M. L.; VASCONCELOS, J. L. M. Effect of  
515 progesterone concentrations, follicle diameter, timing of artificial insemination,  
516 and ovulatory stimulus on pregnancy rate to synchronized artificial insemination  
517 in postpubertal Nellore heifers. **Theriogenology**, v. 81, p. 446-453, 2014.

- 518 MENEGHETTI FILHO , M.; O. G. S.; PERES, R. F. G.; LAMB, G. C.;
- 519 VASCONCELOS, J. L. M. Fixed-Time artificial insemination with estradiol and
- 520 progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols.
- 521 **Theriogenology**, v. 72, p. 179-189, 2009.
- 522 MESQUITA FS, PUGLIESI G, SCOLARI SC, FRANÇA MR, RAMOS RS,
- 523 OLIVEIRA M, PAPA PC, BRESSAN FF, MEIRELLES FV, SILVA LA,
- 524 NOGUEIRA GP, MEMBRIVE CM, BINELLI M. Manipulation of the periovulatory
- 525 sex steroidal milieu. Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e
- 526 TETF em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v.41, n.1, p.140-150, jan./mar.
- 527 2017.
- 528 MIYAMOTO A, SHIRASUNA K, HAYASHI KG, KAMADA D, AWASHIMA C,
- 529 KANEKO E, ACOSTA TJ, MATSUI M. A potential use of color ultrasound as a
- 530 tool for reproductive management: New observations using color ultrasound
- 531 scanning that were not possible with imaging only in black and white. **J Reprod**
- 532 **Dev**, v.52, p.153-160, 2006
- 533 MOTTA, I. G., ROCHA, C. C., BISINOTTO, D. Z., MELO, G. D., JÚNIOR, G. A.,
- 534 SILVA, A. G., MADUREIRA, E. H. Increased pregnancy rate in beef heifers
- 535 resynchronized with estradiol at 14 days after TAI. **Theriogenology**, v. 147, p.
- 536 62-70, 2020.
- 537 OCHOA, JC, PENAGARICANO, F., BAEZ, GM, MELO, LF, MOTTA, JC,
- 538 GARCIA-GUERRA, A., ... & WILTBANK, MC. Mecanismos de resgate do corpo
- 539 lúteo durante a gestação: expressão gênica no corpo lúteo bovino após pulsos

- 540 intrauterinos das prostaglandinas E1 e F2 $\alpha$ . **Biologia da Reprodução** , v. 98,  
541 n. 4, pág. 465-479, 2018.
- 542 PERES, R. F. G.; JÚNIOR, C.; FILHO, O. G. S.; NOGUEIRA, G. P.;  
543 VASCONCELOS, J. L. M. Strategies to improve fertility in *Bos indicus*  
544 postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial  
545 insemination. **Theriogenology**, v. 72, p. 681-689, 2009.
- 546 PUGLIESI, G., BISINOTTO, DZ, MELLO, BP, LAHR, FC, FERREIRA, CA,  
547 MELO, GD, ... & MADUREIRA, EH. Uma nova estratégia para  
548 ressincronização da ovulação em vacas Nelore usando progesterona injetável  
549 (P4) e dispositivos de liberação de P4 para realizar duas inseminações  
550 cronometradas em 22 dias. **Reprodução em Animais Domésticos** , v. 54,  
551 n. 8, pág. 1149-1154, 2019.
- 552 PUGLIESI, G., REZENDE, R. G., DA SILVA, J. C. B., LOPES, E., NISHIMURA,  
553 T. K., BARUSELLI, P.S., MADUREIRA, E. H., BINELLI, M. Uso da  
554 ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. **Revista**  
555 **Brasileira de Reprodução Animal**, v.41, n.1, p.140- 150, 2017.
- 556 RIBEIRO FILHO, A. L.; VALE FILHO, V. R. ; ANDRADE, V. J. ; CHALHOUB,  
557 Marcos ; QUIRINO, C. R. ; SALVADOR, D. F. ; NOGUEIRA, L. A. G. . Efeito da  
558 resincronização do estro de retorno sobre a taxa de prenhez em vacas zebus.  
559 **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n.3, p. 326-327, 2001.
- 560 RIBEIRO, E.S., BISINOTTO, R.S., FAVORETO, M.G., MARTINS, L.T., CERRI,  
561 R.L.A., SILVESTRE, F.T., GRECO, L.F., THATCHER, W.W., SANTOS, J.E.P.  
562 Fertility in dairy cows following presynchronization and administering twice the

563 luteolytic dose of prostaglandin F2 $\alpha$  as one or two injections in the 5-day timed  
564 artificial insemination protocol. **Theriogenology** 78, 273–284. 2012

565 RODRIGUES, A. S. SILVA, M. A., BRANDÃO, T. O., NASCIMENTO, A. B.,  
566 BITTENCOURT, R. F., CHALHOUB, M., ... & RIBEIRO, A. D. L. Eficácia da  
567 associação dupla dose PGF2 alfa-eCG no proestro de vacas leiteiras mestiças  
568 submetidas à IATF. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 1518-1527,  
569 2018.

570 RODRIGUES, A. S., SILVA, M. A. A., BRANDÃO, T. O. , BITTENCOURT, R.  
571 F., CHALHOUB, M., & RIBEIRO FILHO, A. L. Diâmetro folicular e fertilidade de  
572 vacas mestiças leiteiras submetidas a protocolo de IATF com ajustes no  
573 proestro. **Arquivos de Ciências Veterinárias** , v. 22, n. 3, 2017.

574 SALES, J. N. S; CARVALHO, J. B.P.; CREPALDI, G. A.; SOARES, J. G. ;  
575 GIROTTO, R. W.; MAIO, J. R. G.; SOUZA, J. C.; BARUSELLI, P. S. Effect of  
576 circulating progesterone concentration during synchronization for fixed-time  
577 artificial insemination on ovulation and fertility in *Bos indicus* (Nelore) beef  
578 cows. **Theriogenology**, v. 83, p. 1093-1100, 2015.

579 SILVA, A.G., PINTO, L.M.F., SILVA, N.D.A, MATTOS, A.C.D., AMBRÓSIO,  
580 P.H., DUARTE, K.M.R., ... & PUGLIESI, G. Comparação de três doses de  
581 benzoato de estradiol para sincronização da emergência da onda folicular em  
582 vacas de corte *Bos indicus* amamentadas. **Reprodução Animal** , v. 18, 2021.

583 SILVA, M.A.A, RODRIGUES, A.S, BRANDÃO, T.O, CARÔSO, B.S.S,  
584 MAGGITT JR. L., BITTENCOUT, R.F., CHALHOUB, M.C.L, RIBEIRO FILHO,  
585 A.L. Avaliação morfofuncional do corpo lúteo para diagnóstico precoce de

- 586 gestação 20 dias após iatf em fêmeas bovinas mestiças leiteiras. **Pesquisa**  
587 **Veterinária Brasileira**, 2018.
- 588 SINGH, R., RANDHAWA, S.N.S., RANDHAWA, C.S. Body condition score and  
589 its correlation with ultrasonographic back fat thickness in transition crossbred  
590 cows. **Veterinary World** 8 (3), 290-294, 2015
- 591 VIANA J.H.M., ARASHIRO E.K.N., SIQUEIRA L.G.B., GHETTI A.M., AREAS  
592 V.S, GUIMARÃES C.R.B, PALHÃO M.P, CAMARGO L.S.A, FERNANDES  
593 C.A.C. Doppler ultrasonography as a tool for ovarian evaluation. **Proc XXVII**  
594 **Annu Meet Braz Embryo Transfer Soc (SBTE)**; v.10, p.215-222, 2013.

## REFERENCIAS GERAIS

AERTS, J.M.J; BOLS, P.E.J. Ovarian follicular dynamics: A review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.171-179, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES (ABIEC). **Sumário 2019**. Disponível em: <http://abiec.siteoficial.ws/images/upload/sumario-pt-010217.pdf>.

AZEREDO, D.M., ROCHA, D.C.; JOBIM, M.I.M. Estrous induction and synchronization in beef heifers and their effects on the pregnancy rate and at their performance on the second reproductive season. **Ciência Rural**. V.37, n.1, p. 201-205, 2007.

BARUSELLI, P. S., DE OLIVEIRA MARQUES, M., FERREIRA, R. M., DE SÁ FILHO, M. F., BATISTA, E. D. O. S., & MENDES, L. **Avanços conceituais aplicados à IATF em vacas de cria**. Jornada NESPRO, 8, 33-50, 2013.

BARUSELLI, P. S., FERREIRA, R.M., COLLI, M. H. A.; ELLIFF, F. M.; FREITAS, B. G. Timed artificial insemination: current challenges and recent conquests for improving the efficiency in the field. **Animal Reproduction**, v.14, n.3, p.558-571, 2017.

BARUSELLI, P.S., CATUSSI, B. L. C., DE ABREU, L. Â., ELLIFF, F. M., DA SILVA, L. G., BATISTA, E. S., CREPALDI, G. A. Evolução e perspectivas da inseminação artificial em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, n. 2, p. 308-314, 2019.

BAZER, F.W.; SPENCER, T.E.; OTT, T.L.; JOHNSON, H.M. Cytokines and pregnancy recognition. In: HUNT, JS. **Immunobiology of Reproduction**. New York: Springer-Verlag, p.37-56,1994.

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, p.135–152, 2010.

BERISHA, B.; SCHAMS, D.; RODLER, D.; PFAFFL, MW. Angiogênese no ovário - o evento regulador mais importante para o desenvolvimento e função do folículo e corpo lúteo em vacas - uma visão geral. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, 45(2), 124-130. 2016.

BERTAN, C.M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E.H.; TRALDI, A.S. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação de corpo lúteo e na luteólise – revisão de literatura. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v.43, p.824-840, 2006.

BINELLI, M; PORTELA, V. M; MURPHY, B. D. Dinâmica ovariana e eficiência reprodutiva: estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 6, p. 134-139, 2009.

BOLLWEIN H, HEPPELMANN M, LÜTTGENAU J. Ultrasonographic Doppler Use for Female Reproduction Management. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v.32, p.149-164, 2016.

BRITO, L.S., MAGITTI JUNIOR, L.D.P., FERRAZ, P.A., VASCONCELOS, I.C., DA SILVA CARVALHO, J.V.G., LOIOLA, M.V.G., RIBEIRO FILHO, A.L. Efeitos da gonadotrofina coriônica equina administrada através do ponto de acupuntura Baihui na dinâmica folicular ovariana e na função lútea de bovinos durante um regime de tratamento de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo. **Animal Reproduction Science**, v. 223, p. 106631, 2020.

BURKE, C. R.; DAY, M. L.; BUNT, C. R.; MACMILLAN, K. L. Use of a small dose of estradiol benzoate during diestrus to synchronize development of the ovulatory follicle in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 1, p. 145-151, 2000.

BURNS, G.; BROOKS, K.; WILDUNG, M.; NAVAKANITWORAKUL, R.; CHRISTENSON, L.K.; SPENCER, T.E. Extracellular vesicles in luminal fluid of the ovine uterus. **Plos One**, v.9, n.3, e90913, 2014.

CAMPANILE, G., BARUSELLI, PS, LIMONE, A., & MICHAEL, JD. Ação local de citocinas e células imunes na comunicação entre o concepto e o útero durante o período crítico do desenvolvimento embrionário inicial, fixação e implantação – Implicações para a sobrevivência do embrião em bovinos: Uma revisão. **Theriogenology** , v. 167, p. 1-12, 2021.

CAVALIERI, F. L. B., BURALI, P. H. B., MOROTTI, F., SENEDA, M. M., ANDREAZZI, M. A., & COLOMBO, A. H. B. Effects of a reusable progesterone device on conception rates and estrus cycle re-synchronization in Nelore cows. **Semina: Ciências Agrárias**, 40(6Supl3), 3501-3510, 2019

CAVALIERI, F. L. B., MOROTTI, F., SENEDA, M. M., COLOMBO, A. H. B., ANDREAZZI, M. A., EMANUELLI, I. P., & RIGOLON, L. P. Improvement of bovine in vitro embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. **Theriogenology**, 117, 57-60, 2018.

CLARO JUNIOR I, SA FILHO OG, RODRIGUES JUNIOR MM, VASCONCELOS JLM. Efeito da frequência de amamentação sobre a taxa de ovulação após tratamento com desmame temporário + GnRH, sobre a incidência de luteólise prematura no primeiro ciclo estral pós-parto e sobre o desempenho da progênie de vacas Nelore. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.62, p.281-288, 2010.

COLAZO M.G., KASTELIC J.P., MAINAR-JAIME R.C., GAVAGA Q.A., WHITTAKER R.R., SMALL J.A., MARTINEZ M.F., WILDE R.E., VEIRA D.M. & MAPLETOFT R.J. Resynchronization of previously timed-inseminated beef heifers with progestins. **Theriogenology**. 65(3): 557-572, 2006

CUTAIA L., TRIBULO R., TEGLI J., MORENO D. & BÓ G.A. The use of estradiol and progesterone inserts during mid-diestrus to synchronize return to estrus in beef cows and heifers. **Theriogenology**. 57(1): 373, 2002

DADARWAL, D.; MAPLETOFT, R. J.; ADAMS, G. P.; PFEIFER, L. F. M.; CREELMAN, C.; SINGH, J. Effect of progesterone concentration and duration of proestrus on fertility in beef cattle after fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v. 79, p. 859-866, 2013.

DEMMERS, K.J.; DERECKA, K.; FLINT, A. Trophoblast interferon and pregnancy. **Reproduction - Cambridge**, v.121, n.1, p.41-49, 2001.

DESTRO, F.C.; OCHOA, J.C.; TREVISOL, E.; FERREIRA, J.C.P. Atuação do Interferon-tau no reconhecimento materno da gestação. **Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v.9, n.2, p.338-347, 2014.

DORNIK P, BAZER FW & SPENCER TE. Physiology and Endocrinology Symposium: biological role of interferon tau in endometrial function and conceptus elongation. **Journal of Animal Science**, v.91, p.1627–1638, 2013.

EL-ZARKOUNY S.Z. & STEVENSON J.S. Resynchronizing estrus with progesterone or progesterone plus estrogen in cows of unknown pregnancy status. **Journal of Dairy Science**. 87(10): 3306-3321, 2004

FANCHIN, R., MENDEZ LOZANO, DH, FRYDMAN, N., GOUGEON, A., DI CLEMENTE, N., FRYDMAN, R., & TAIEB, J. As concentrações de hormônio anti-mulleriano no fluido folicular do folículo pré-ovulatório são preditivas do potencial de implantação do embrião resultante obtido por fertilização in vitro. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, n. 5, pág. 1796-1802, 2007.

FERRAZ P.A., SILVA M.A.A., CARÔSO B.S.S., ARAUJO E.A.B., BITTENCOURT T.C.B.S.C., CHALHOUB M., BITTENCOURT R.F. & RIBEIRO FILHO A.L. Effect of eCG on the follicular dynamics and vascularization of crossbred cows with different circulating progesterone concentrations during

synchronization of ovulation in an FTAI protocol. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 39(5):324-331. 2019

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

FLECHON, J.E.; GUILLOMOT, M.; CHARLIER, M.; FLECHON, B.; MARTAL, J. Experimental studies on the elongation of the ewe blastocyst. **Reproduction Nutrition Development**, v.26, p.1017-1024, 1986.

FORTUNE, J.E.; KITO, S.; WANDJI, S.A.; SRSEN, V. Activation of bovine and baboon primordial follicles in vitro. **Theriogenology**, v.49, p.441–449, 1998.

GRAY, C.A.; BURGHARDT, R.C.; JOHNSON, G.A.; BAZER, F.W.; SPENCER, T.E. Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. **Reproduction**, v.124, p.289- 300, 2002.

GUILLOMOT, M. Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. **Journal of Reproduction and Fertility**, (Supplement) v. 49, p.39-51, 1995.

HUE, I.; DEGRELLE, S.A.; TURENNE, N. Conceptus elongation in cattle: Genes, models and questions. **Animal Reproduction Science**, v.134, p.19–28, 2012.

HUTT, K.J.; MCLAUGHLIN, E.A.; HOLLAND, M.K. Kit ligand and c-Kit have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. **Molecular Human Reproduction**, v.12, n.2, p. 61-69, 2006.

INGMAN, WV, & JONES, RL. Nocautes de citocinas na reprodução: o uso da ablação gênica para dissecar os papéis das citocinas na biologia reprodutiva. **Atualização em reprodução humana**, v. 14, n. 2, pág. 179-192, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Sistema de Recuperação Automática (SIDRA). **Efetivo do rebanho brasileiro**, 2018. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>.

JIANG, J. Y., MACCHIARELLI, G., TSANG, B. K., & SATO, E. Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles. **Reproduction**, v.125(2), p.211-223, 2003

JIN, X.; HAN, C.S.; YU, F.Q.; WEI, P.; HU, Z.Y.; LIU, Y.X. Anti-apoptotic action of stem cell factor on oocytes in primordial follicles and its signal transduction. **Molecular Reproduction and Development**, v.70, n.1, p.82-90, 2005.

KERBLER, T.L.; BUHR, M.M.; JORDAN, L.T.; LESLIE, K.E.; WALTON, J.S. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. **Theriogenology**, v.47, n.3, p.703- 714, 1997.

KNICKERBOCKER, J.J.; WILTBANK, M.C.; NISWENDER, G.D. Mechanisms of luteolysis in domestic livestock. **Domestic Animal Endocrinology**, v.5, p.91–107, 1988.

KOBAYASHI S, BERISHA B, AMSELGRUBER WM, SCHAMS D, MIYAMOTO A: Production and localisation of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandina F2a. **Journal Endocrinology** v.170, p.369–380, 2001.

LEE J, MCCRACKEN JA, BANU SK, AROSH JÁ. Intrauterine Inhibition of Prostaglandin Transporter Protein Blocks Release of Luteolytic PGF2alpha Pulses Without Suppressing Endometrial Expression of Estradiol or Oxytocin Receptor in Ruminants. **Biol Reprod**, v.89, p.1-27, 2013.

LEYVA, C.; AGUILAR, D.; MORALES, J. L.; PÉREZ-LÓPEZ, S.; VÉLIZ, F. G.; SOTODOMÍNGUEZ, A.; MARTÍNEZ, J. M. Effects of small dose estradiol cypionate after artificial insemination on reproductive performance in Holstein cows. **Journal of Applied Animal Research**, v. 44, n. 1, p. 24-26, 2016.

LIMA, I. M. T.; SOUZA, A. L. Desenvolvimento e Sobrevivência de Embriões no Período de Pré-implantação: Enfoque em Ruminante. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.194-202, 2009.

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

MARQUES, M. O., RIBEIRO JÚNIOR, M., SILVA, R. C. P., SÁ FILHO, M. F., VIEIRA, L. M., BARUSELLI, P.S. Ressincronização em bovinos de corte. In: **5o Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada (SIRAA)**, 2012, Londrina, PR, Brazil. Londrina: UEL. p.82-92, 2012.

MARTINS, T.; PERES, R. F. G.; RODRIGUES, A. D. P.; POHLER, K. G.; PEREIRA, M. H. C.; DAY, M. L.; VASCONCELOS, J. L. M. Effect of progesterone concentrations, follicle diameter, timing of artificial insemination, and ovulatory stimulus on pregnancy rate to synchronized artificial insemination in postpubertal Nellore heifers. **Theriogenology**, v. 81, p. 446-453, 2014.

MCNATTY, K.P.; HUDSON, N.L.; WHITING, L.; READER, K.L.; LUN, S.; WESTERN, A.; HEATH, D.A.; SMITH, P.; MOORE, L.G.; JUENGEL, J.L. The effects of immunizing sheep with different BMP15 or GDF9 peptide sequences

on ovarian follicular activity and ovulation rate. **Biology of Reproduction**, v.76, p.552-560, 2007.

MELLO, R.R.C; FERREIRA, J.E; SILVA, A.P.T. B; MELLO, M.R.B; PALHANO, H.B. Desenvolvimento folicular inicial em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.37, p.328-333, 2013.

MENEGHETTI FILHO , M.; 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, p. 179-189, 2009.

MESQUITA FS, PUGLIESI G, SCOLARI SC, FRANÇA MR, RAMOS RS, OLIVEIRA M, PAPA PC, BRESSAN FF, MEIRELLES FV, SILVA LA, NOGUEIRA GP, MEMBRIVE CM, BINELLI M. Manipulation of the periovulatory sex steroidal milieu. Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v.41, n.1, p.140-150. 2017.

MICHAEL, A.E.; PAPAGEORGHIOU, A.T. Potential significance of physiological and pharmacological glucocorticoids in early pregnancy. **Human Reproduction Update**, v.14, p.497–517, 2008.

MIYAMOTO A, SHIRASUNA K, HAYASHI KG, KAMADA D, AWASHIMA C, KANEKO E, ACOSTA TJ, MATSUI M. A potential use of color ultrasound as a tool for reproductive management: New observations using color ultrasound scanning that were not possible with imaging only in black and white. **J Reprod Dev**, v.52, p.153-160, 2006

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K. Luteolysis in the cow: a novel concept of vasoactive molecules. **Animal Reproduction**, v.6, p.47-59, 2009.

MOTTA, I. G., ROCHA, C. C., BISINOTTO, D. Z., MELO, G. D., JÚNIOR, G. A., SILVA, A. G., MADUREIRA, E. H. Increased pregnancy rate in beef heifers resynchronized with estradiol at 14 days after TAI. **Theriogenology**, v. 147, p. 62-70, 2020.

MOTTA, IG, ROCHA, CC, BISINOTTO, DZ, MELO, GD, JÚNIOR, GAA, NISHIMURA, TK, & PUGLIESI. Efeitos de tratamentos com estradiol na liberação de PGF2 $\alpha$  em novilhas de corte submetidas à resincronização estral 14 dias após a IA-cronometrada. **Domestic Animal Endocrinology** , v. 76, p. 106625, 2021.

NAGAOKA, K.; SAKAI, A.; NOJIMA, H.; SUDA, Y.; YOKOMIZO, Y.; IMAKAWA, K. A chemokine, interferon (IFN)-gamma-inducible protein 10kDa, is stimulated

by IFN-tau and recruits immune cells in the ovine endometrium. **Biology of Reproduction**, v.68, p.1413-1421, 2003.

OCHOA, JC, PENAGARICANO, F., BAEZ, GM, MELO, LF, MOTTA, JC, GARCIA-GUERRA, A., ... & WILTBANK, MC. Mecanismos de resgate do corpo lúteo durante a gestação: expressão gênica no corpo lúteo bovino após pulsos intrauterinos das prostaglandinas E1 e F2 $\alpha$ . *Biologia da Reprodução*, v. 98, n. 4, pág. 465-479, 2018.

OKTEM, O.; OKTAY, K. The ovary: anatomy and function throughout human life. *Ann N Y Acad Sci* 1127, 1–9, 2008.

PERES, R. F. G.; JÚNIOR, 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, p. 681-689, 2009.

PUGLIESI, G., BISINOTTO, DZ, MELLO, BP, LAHR, FC, FERREIRA, CA, MELO, GD, & MADUREIRA, EH. Uma nova estratégia para ressincronização da ovulação em vacas Nelore usando progesterona injetável (P4) e dispositivos de liberação de P4 para realizar duas inseminações cronometradas em 22 dias. **Reprodução em Animais Domésticos**, v. 54, n. 8, pág. 1149-1154, 2019.

PUGLIESI, G., DE MELO, G. D., ATAÍDE, G. A., PELLEGRINO, C. A. G., SILVA, J. B., ROCHA, C, BINELLI, M. Use of Doppler ultrasonography in embryo transfer programs: feasibility and field results. **Animal Reproduction**, 15, 239–246., 2018

PUGLIESI, G., KHAN, F. A., HANNAN, M. A., BEG, M. A., CARVALHO, G. R., GINTHER, O. J. Inhibition of prostaglandin biosynthesis during postluteolysis and effects on CL regression, prolactin, and ovulation in heifers. **Theriogenology**, v.78, p. 443-54, 2012

PUGLIESI, G., REZENDE, R. G., DA SILVA, J. C. B., LOPES, E., NISHIMURA, T. K., BARUSELLI, P.S., MADUREIRA, E. H., BINELLI, M. Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.41, n.1, p.140- 150, 2017.

QUITES A. A.; ERNANI, H. L.; COELHO, O. J. F e HOSS, H. T. Função do interferon-tau durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes. **Ciência Rural**, v. 41, n.1, 2011

RIBEIRO FILHO, A. L.; VALE FILHO, V. R. ; ANDRADE, V. J. ; CHALHOUB, Marcos ; QUIRINO, C. R. ; SALVADOR, D. F. ; NOGUEIRA, L. A. G.Efeito da resincronização do estro de retorno sobre a taxa de prenhez em vacas zebus.

**Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte**, v. 25, n.3, p. 326-327, 2001.

RIBEIRO, E.S., BISINOTTO, R.S., FAVORETO, M.G., MARTINS, L.T., CERRI, R.L.A., SILVESTRE, F.T., GRECO, L.F., THATCHER, W.W., SANTOS, J.E.P. Fertility in dairy cows following presynchronization and administering twice the luteolytic dose of prostaglandin F<sub>2α</sub> as one or two injections in the 5-day timed artificial insemination protocol. **Theriogenology** 78, 273–284. 2012

RODRIGUES, A. S. SILVA, M. A., BRANDÃO, T. O., NASCIMENTO, A. B., BITTENCOURT, R. F., CHALHOUB, M., ... & RIBEIRO, A. D. L. Eficácia da associação dupla dose PGF<sub>2</sub> alfa-eCG no proestro de vacas leiteiras mestiças submetidas à IATF. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 1518-1527, 2018.

RODRIGUES, A. S., SILVA, M. A. A., BRANDÃO, T. O. , BITTENCOURT, R. F., CHALHOUB, M., & RIBEIRO FILHO, A. L. Diâmetro folicular e fertilidade de vacas mestiças leiteiras submetidas a protocolo de IATF com ajustes no proestro. **Arquivos de Ciências Veterinárias** , v. 22, n. 3, 2017.

SÁ FILHO, M. F., MARQUES, M. O., GIROTTO, R., SANTOS, F. A., SALA, R. V., BARBUIO, J. P., BARUSELLI, P. S. Resynchronization with unknown pregnancy status using progestin-based timed artificial insemination protocol in beef cattle. **Theriogenology**, v.81, p.284-290, 2014.

SALES, J. N. S; CARVALHO, J. B.P.; CREPALDI, G. A.; SOARES, J. G.; GIROTTO, R. W.; MAIO, J. R. G.; SOUZA, J. C.; BARUSELLI, P. S. Effect of circulating progesterone concentration during synchronization for fixed-time artificial insemination on ovulation and fertility in *Bos indicus* (Nelore) beef cows. **Theriogenology**, v. 83, p. 1093-1100, 2015.

SAVIO, J.D.; KEENAN, L.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.83, p.663–671, 1988.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of corpus luteum function in cattle—an overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v.39, n.4, p.241-251, 2004.

SENGER, P.L. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. 2nd Ed. Washington: Current Conceptions Inc. 368p, 2003.

SESHAGIRI, PB, VANI, V., & MADHULIKA, P. Ecloração de citocinas e blastocistos. **American Journal of Reproductive Immunology** , v. 75, n. 3, pág. 208-217, 2016.

SILVA L.A., GINTHER O.J. Local effect of the conceptus on uterine vascular perfusion during early pregnancy in heifers. **Reproduction**, v.139, p.453-463, 2010.

SILVA, A.G., PINTO, L.M.F., SILVA, N.D.A., MATTOS, A.C.D., AMBRÓSIO, P.H., DUARTE, K.M.R., ... & PUGLIESI, G. Comparação de três doses de benzoato de estradiol para sincronização da emergência da onda folicular em vacas de corte *Bos indicus* amamentadas. **Reprodução Animal**, v. 18, 2021.

SILVA, M.A.A, RODRIGUES, A.S, BRANDÃO, T.O, CARÔSO, B.S.S, MAGGITT JR. L., BITTENCOUT, R.F., CHALHOUB, M.C.L, RIBEIRO FILHO, A.L. Avaliação morfofuncional do corpo lúteo para diagnóstico precoce de gestação 20 dias após iatf em fêmeas bovinas mestiças leiteiras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2018.

SPENCER, T.E.; FORDE, N.; LONERGAN, P. The role of progesterone and conceptus-derived factors in uterine biology during early pregnancy in ruminants. **Journal of Dairy Science**, v.99, p.5941- 5950, 2015.

SPENCER, T.E.; OTT, T.L.; MAYES, J.S.; BECKER, W.C.; WATSON, G.H.; MIRANDO, M.A.; BAZER, F.W. Intrauterine injection of ovine interferon-tau (oIFN-r) alters oestrogen and oxytocin receptor expression in the endometrium of cyclic ewes. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.15, p.203-220, 1995.

TREVISOL, E.; ACKERMANN, C.L.; DESTRO, F.C.; AMARAL, J.B. Luteólise em bovinos: revisão. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.37, p.29-36, 2013.

VAN WEZEL, I.L.; RODGERS, R.J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. **Biology of Reproduction**, v.55, p,1003–1011, 1996.

VIANA JHM, ARASHIRO EKN, SIQUEIRA LGB, GHETTI AM, AREAS VS, GUIMARÃES CRB, PALHÃO MP, CAMARGO LSA, FERNANDES CAC. Doppler ultrasonography as a tool for ovarian evaluation. **Proc XXVII Annu Meet Braz Embryo Transfer Soc (SBTE)** 2013; v.10, p.215-222, 2013.

VIEIRA, L. M., SÁ FILHO, M. F., PUGLIESI, G., GUERREIRO, B. M., CRISTALDO, M. A., BATISTA, E. O. S., BARUSELLI P. S. Resynchronization in dairy cows 13 days after TAI followed by pregnancy diagnosis based on corpus luteum vascularization by color doppler. **Animal Reproduction**, 11, 378, 2014

WAITE, A.L.; HOLTAN, D.W.; STORMSHAK, F. Changes in bovine luteal progesterone metabolism in response to exogenous prostaglandin F2alfa. **Domestic Animal Endocrinology**, v.28, p.162-171. 2005.

WANDJI, S.A.; SRSEN, V.; NATHANIELSZ, P.W.; EPPIG, J.J.; FORTUNE, J.E. Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. **Biology of Reproduction**, v.55, p.942-948, 1996.

WANG, J.; GUILLOMOT, M.; HUE, I. Cellular organization of the trophoblastic epithelium in elongating conceptuses of ruminants. **Comptes Rendus Biology**, v.332, p.986–997, 2009b.

WANG, L.M.; FENG, H.L.; MA, Y.; CANG, M.; LI, H.J.; YAN, Z.; ZHOU, P.; WEN, J.X.; BOU, S.; LIU, D.J. Expression of IGF receptors and its ligands in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Animal Reproduction Science**, v.114, n.1-3, p.99-108, 2009a.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G.; ARMSTRONG, D.G. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, v.82, p. E63–E74, 2004.

WILTBANK, M.C.; BAEZ, G.M.; GARCIA-GUERRA, A.; TOLEDO, M.Z.; MONTEIRO, P.L.; MELO, L.F.; OCHOA, J.C.; SANTOS, J.E.; SARTORI, R. Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.86, p.239-253, 2016.

YOSHIDA, H.; TAKAKURA, N.; KATAOKA, H.; KUNISADA, T.; OKAMURA, H.; NISHIKAWA, S.I. Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. **Developmental Biology**, v.184, p.122-137, 1997.

ZHENG, J.; FRICKE, P.M.; REYNOLDS, L.P.; REDMER, D.A. Evaluation of growth, cell proliferation, and cell death in bovine corpora lutea throughout the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v.51, p.623-632, 1994.

## ANEXO I



# ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE

An International Journal

## AUTHOR INFORMATION PACK

### TABLE OF

### CONTENTS

- Description p.1
- Audience p.1
- Impact Factor p.2
- Abstracting and Indexing p.2
- Editorial Board p.2
- Guide for Authors p.4



ISSN: 0378-4320

### DESCRIPTION

*Animal Reproduction Science* publishes results from studies relating to **reproduction** and **fertility** in **animals**. This includes both fundamental research and applied studies, including management practices that increase our understanding of the **biology** and **manipulation** of reproduction. Manuscripts should go into depth in the mechanisms involved in the research reported, rather than give a mere description of findings. Results and conclusions should contribute to improving the management of an animal species or population, with regard to its fertility or reproductive efficiency. Results and conclusions should contribute to improving the management of an animal species or population, with regard to its fertility or reproductive efficiency. The focus is on animals that are useful to humans including food- and fibre-producing; companion/recreational; captive; and endangered species including zoo animals, but excluding laboratory animals unless the results of the study provide new information that impacts the basic understanding of the biology or manipulation of reproduction.

The journal's scope includes the study of reproductive physiology and endocrinology, reproductive cycles, natural and artificial control of reproduction, preservation and use of

gametes and embryos, pregnancy and parturition, infertility and sterility, diagnostic and therapeutic techniques.

The Editorial Board of *Animal Reproduction Science* has decided not to publish papers in which there is an exclusive examination of the *in vitro* development of oocytes and embryos; however, there will be consideration of papers that include *in vitro* studies where the source of the oocytes and/or development of the embryos beyond the blastocyst stage is part of the experimental design.

Submission is encouraged of manuscripts that are focused on reproduction in aquatic animals. Manuscripts focused on reproduction in insects, however, do not fit the scope of the Journal and will be rejected without peer review.

Authors with any concerns are encouraged to contact the Editor-in-Chief to enquire about the suitability of the content of their paper for [submission](#). There are no page charges for manuscripts published in *Animal Reproduction Science* and publication of papers only takes place after rigorous peer review.

## AUDIENCE

---

Research Workers in Animal and Human Reproduction, Animal Health Workers.

## IMPACT FACTOR

---

2020: 2.145 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2021

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

Biological Abstracts

Current Awareness in Biological Sciences

PubMed/Medline

Animal Breeding Abstracts

Bibliography of Reproduction

Current Contents - Agriculture, Biology & Environmental Sciences

Scopus

Elsevier BIOBASE

Science Citation Index

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### INTRODUCTION

#### 1.1.1. Types of Paper

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles

For *Original Research Papers (Regular Papers)*, a reporting of research results that comprise one or a series of experiments is required. The paper should contribute to increasing understanding of the biology and/or manipulation of reproduction in animals. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form. *Original Research Papers* should not be longer than 8,000 words (including Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion and Conclusions). Figures and Tables should not exceed eight items. The authors may provide additional data, especially with regard to a detailed methods section, and large datasets as supplementary materials.

*Review Articles* should fit within the scope for the journal and be of current interest in the realm of animal reproduction in those species on which the journal focuses. Submission of Review Manuscripts to *Animal Reproduction Science* is encouraged. The manuscripts may be submitted without invitation or be invited reviews and should be submitted using the same process as that for Original Research manuscripts. *Review Articles* developed by conducting a systematic research review including those resulting from meta-analyses are encouraged; however, high quality review articles developed not using this approach will also be considered for publication. *Review Articles* should be no longer than 10,000 words and contain no more than eight Figures and Tables. The use of illustrations explaining the mechanisms referred to in the Review is strongly encouraged.

All manuscripts must be written in proper English. Attention must be given not only to correct spelling and grammar, but also to the narrative, which should be appropriate for a scientific article. Manuscripts not fulfilling this requirement will be immediately rejected without peer review.

#### 1.1.2. Contact details for submission

For queries concerning the submission process or journal procedures please visit the [Elsevier Support Center](#). Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

### 1.1.3. Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

#### *Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)*

*Supplemental files (where applicable)*

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

#### **Multiple Corresponding Authors:**

Please note that only one Corresponding Author can be responsible for the submission in Editorial Manager. If your article is accepted, however, multiple Corresponding Authors can be listed on the final published article. If multiple Corresponding Authors are required, please include this in your corrections at author proof stage.

#### 1.1.4. Submission checklist

All authors should complete and include in their submission the [ANIREP Submission Checklist](#).

PLEASE NOTE: This is a mandatory file for all submissions to *Animal Reproduction Science*.

***Important formatting to which all manuscripts should adhere***

1. Only the first letter of the manuscript title should be capitalized unless there are specific words that should be capitalized (e.g., breed names, species)
2. The abbreviation "et al." in the text of the manuscript should be in regular font and never be italicized
3. The letter "n" indicating number and letter "g" representing relative centrifugal force should always be lower case and italicized and the letter "P" indicating probability values needs to be upper case and italicized throughout the manuscript.
4. There should be indentation of the first line of all paragraphs except for the Abstract of the manuscript
5. There should not be a line spacing between paragraphs
6. Proper *Animal Reproduction Science* format has been used for all headings and subheadings throughout the manuscript

#### BEFORE YOU BEGIN

##### ***Ethics in publishing***

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

#### 1.1.5. Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out i5ty