UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

INDUÇÃO DE NOVA ONDA FOLICULAR COM 17ß-ESTRADIOL EM NOVILHAS DA RAÇA HOLANDESA

DIEGO JUNIOR BERGAMIN

CHAPECÓ, 2019

DIEGO JUNIOR BERGAMIN

INDUÇÃO DE NOVA ONDA FOLICULAR COM 17ß-ESTRADIOL EM NOVILHAS DA RAÇA HOLANDESA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração Ciência e Produção Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Zootecnia.**
Orientador: Rogério Ferreira
Co-orientador: Diego de Córdova Cucco

Chapecó, SC, Brasil

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da

Biblioteca Setorial do CEO/UDESC,

com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Bergamin, Diego Junior
INDUÇÃO DE NOVA ONDA FOLICULAR COM 17ß-ESTRADIOL EM NOVILHAS DA RAÇA HOLANDESA / Diego Junior Bergamin. -- 2019.
36 p.

Orientador: Rogério Ferreira
Coorientador: Diego de Córdova Cucco
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Chapecó, 2019.

1. Bovino. 2. Dinâmica folicular. 3. Estrógeno. 4. IATF. 5. Sincronização de estros. I. Ferreira, Rogério . II. Cucco, Diego de Córdova. III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

Universidade do Estado de Santa Catarina
UDESC Oeste
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

INDUÇÃO DE NOVA ONDA FOLICULAR COM 17ß-ESTRADIOL EM NOVILHAS DA RAÇA HOLANDESA

Elaborada por
Diego Junior Bergamin

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

Comissão Examinadora:

Dr. Rogério Ferreira (UDESC)

Lucas Carvalho Siqueira (UNICRUZ)

Monique Tomazele Rovani (IFFAR)

Chapecó, 25 de fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Estado de Santa Catarina pela oferta do curso de pós graduação.
Ao Fundo de Apoio à Manutenção e ao Desenvolvimento da Educação Superior - FUMDES, pela bolsa de estudos concedida para a realização do trabalho.
Ao meu orientador Prof. Dr. Rogério Ferreira, pela dedicação, comprometimento e profissionalismo.
As Bancas de Qualificação e Defesa pelas correções e sugestões que enriqueceram meu trabalho.
A minha família, em especial minha esposa Tais, pelo apoio incondicional e compreensão.
Em fim a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho e auxiliaram no término de mais uma fase da minha vida.

Muito Obrigado.

RESUMO
Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade do Estado de Santa Catarina

INDUÇÃO DE NOVA ONDA FOLICULAR COM 17ß-ESTRADIOL EM NOVILHAS DA RAÇA HOLANDESA

AUTOR: DIEGO JUNIOR BERGAMIN
ORIENTADOR: ROGÉRIO FERREIRA
Chapecó, 25 de fevereiro de 2019

A utilização de protocolos hormonais possibilita realizar inseminações artificiais em horário pré-determinado, ou seja, a IA é realizada em tempo fixo (IATF), sem a necessidade de detecção do cio. A IATF é umas das biotécnicas mais utilizadas nas últimas décadas, uma vez que o uso de progesterona favoreceu a sincronização do estro. Porém, uma das limitações ao utilizar exclusivamente a progesterona em protocolos hormonais, é a baixa fertilidade na ovulação. A partir disso, o desenvolvimento de protocolos e produtos de sincronização, principalmente com a associação de estrógenos e progesterona, tem sido o foco de pesquisas. Recentemente, foi lançado comercialmente um estradiol idêntico ao 17β fisiológico, para utilização em bovinos. Dessa forma, o presente estudo objetiva conhecer a dinâmica folicular de novilhas leiteiras cíclicas, após a aplicação de 17β estradiol associado a fontes de progesterona. Pela farmacocinética do 17β estradiol ser diferenciada dos demais ésteres, não se conhece o instante do início de nova onda folicular e, tampouco, o momento em que os folículos atingem o platô de crescimento. Portanto, foram utilizadas 10 novilhas da raça holandês submetidas a protocolo de inseminação artificial em tempo fixo, a base de progesterona, alocadas em dois grupos: grupo benzoato de estradiol-BE (n=5) e grupo 17β estradiol-17β (n=5). No dia da aplicação do implante de progesterona (definido como dia 0), os animais receberam uma administração intramuscular de benzoato de estradiol (BE) ou 17β estradiol, nos grupos BE e 17β respectivamente. O surgimento de nova onda folicular ocorreu em média 3,8±0,2 dias para o grupo BE, e 2,8±0,37 dias para o grupo 17β ($P \leq 0,05$), o tamanho médio folicular no dia anterior a inseminação, foi de 13,44±0,78mm para o grupo BE, e 13,98±0,79mm para o grupo 17β ($P \geq 0,05$). Portanto, a utilização de 17β estradiol antecipou em 1 dia o surgimento de nova onda folicular em novilhas, comparado ao BE, quando utilizado no início do protocolo de IATF associado a implante de progesterona. Porém, o tamanho folicular médio no dia anterior a IATF, não diferiu entre os grupos.

Palavras-chave: Bovino, Dinâmica folicular, Estrógeno, IATF, Sincronização de estros.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade do Estado de Santa Catarina

INDUCTION OF NEW FOLICULAR WAVE WITH 17ß-ESTRADIOL IN HOLSTEIN HEIFERS

AUTHOR: DIEGO JUNIOR BERGAMIN
ADVISER: ROGÉRIO FERREIRA

Chapecó-SC, february,25, 2019

The use of hormonal protocols allows to perform artificial inseminations at a predetermined time, ie, the AI is performed at fixed time (FTAI) without estrus detection. FTAI is one of the most used biotechnology in the last decades, since the use of progesterone further estrus synchronization. However, one of the limitations of using exclusively progesterone in hormonal protocols is the low fertility in ovulation. From this, this research has focused on the development of protocols and synchronization products, mainly with the association of estrogens and progesterone. Recently, an estradiol identical to physiological 17β has been commercially released for use in cattle. Thus, the present study aims to know the follicular dynamics of dairy heifers after application of 17β-estradiol associated with progesterone sources. Because the pharmacokinetics of 17β-estradiol differ from the other esters, the time at which the follicles reach the growth plateau is not known at the beginning of the new follicular wave. Therefore, 10 holstein heifers were submitted to a progesterone-based artificial insemination protocol and assigned to receive one estrogen source at beginning of protocol: estradiol benzoate (BE group; n=5) or 17β estradiol (17β group; n=5). On the day of placement of the progesterone implant (defined as day 0), heifers received intramuscular administration of BE or 17β estradiol. The onset of new follicular wave occurred 3.8 ± 0.2 and 2.8 ± 0.37 days after protocol onset, respectively for BE and 17β group ($P \leq 0.05$). The mean follicular size on day 9 was 13.44 ± 0.78 mm for the BE group, and 13.98 ± 0.79 mm for the 17β group ($P > 0.05$). Therefore, the use of 17β estradiol anticipated one day the appearance of new follicular wave in heifers, compared to estradiol benzoate when used at the beginning of FTAI protocol, however, the average follicular size at day 9 protocol did not differ between groups.

Keywords: Bovine, Estrogen, Estrus synchronization, Follicular dynamics, FTAI.

LISTA DE ABREVIATURAS

17 ß-estradiol	**17 beta – estradiol**
E1	**Estrona**
E2	**Estradiol**
E3	**Estriol**
FSH	**Hormônio Folículo Estimulante**
FUMDES	**Fundo de Apoio à Manutenção e ao Desenvolvimento da Educação Superior**
GnRH	**Hormônio liberador de gonadotrofina**
IA	**Inseminação Artificial**
IATF	**Inseminação Artificial em Tempo Fixo**
IGF-1	**Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1**
LH	**Hormônio Luteinizante**
Mm	**Milímetro**
P4	**Progesterona**
Vs	**Versus**
Mm	**Micrometro**
Ng	**Nanograma**
Ml	**Mililitro**
Mg	**Miligrama**
Kg	**Quilograma**
N	**Número**
MHz	**MEGA-HERTZ**
G	**Grama**
IM	**Intramuscular**
D	**Dia**

LISTA DE SÍMBOLOS

ß	**letra grega beta**
%	**Porcentagem**
~	**Aproximadamente**
=	**Igual**
≤	**Menor ou igual**
≥	**Maior ou igual**
±	**Desvio padrão**
®	**Marca registrada**
ºC	**Graus Celsius**

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA 10
1.1 FISIOLOGIA REPRODUTIVA DO CICLO ESTRAL BOVINO 10
1.1.1 Dinâmica folicular ovariana 10
1.2 FATORES QUE INTERFEREM A EFICIÊNCIA REPRODUTIVA 12
1.3 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF) 13
1.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE PROGESTERONA E ESTRÓGENOS 14
1.5 OBJETIVOS 15
1.5.1 Objetivo geral 15
1.5.2 Objetivos específicos 15
1.6 HIPÓTESE 15
2. CAPÍTULO II: MANUSCRITO 16
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS 29
4. REFERÊNCIAS 30

1. CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA

1.1 FISIOLOGIA REPRODUTIVA DO CICLO ESTRAL BOVINO

O ciclo estral compreende o período entre dois cios consecutivos (VALLE, 1991), no qual, possui duração média de 21 dias (CARVALHO et al., 2010b). O cio ou estro caracteriza o dia zero do ciclo estral, em que a fêmea demonstra sinais de receptividade sexual, seguida de ovulação (VALLE, 1991). A duração média do cio é de, aproximadamente, 12 horas (VALLE, 1991) a 18 horas (VERDUZCO et al., 2006), e a ovulação ocorre entre 28 e 31 horas após o início do cio (STOCK; FORTUNE, 1993). No entanto, a duração do cio e o momento da ovulação, podem apresentar pequenas variações, influenciadas por fatores endógenos e exógenos (VALLE, 1991).

Esses eventos que ocorrem durante o ciclo estral, são regulados principalmente pela interação dos hormônios hipotalâmicos (hormônio liberador de gonadotrofinas - GnRH), hipofisários (hormônio luteinizante - LH e hormônio folículo estimulante - FSH) e gonadais (estradiol - E2 e progesterona - P4) (VALLE, 1991).

A partir da utilização da ultrassonografia, estudos relacionados à fisiologia do ciclo estral dos bovinos foram intensificados, no qual se constatou que o padrão de crescimento folicular do ciclo estral se dá através de duas (GINTHER et al., 1989) ou três (SIROIS; FORTUNE, 1988), ondas de crescimento folicular. Cada onda folicular tem duração aproximada de 10 dias, com variação entre 6 e 15 dias (WILTBANK et al., 2002).

1.1.1 Dinâmica folicular ovariana

A dinâmica folicular abrange o processo contínuo de crescimento e regressão dos folículos ovarianos, um dos quais se desenvolve até folículo pré-ovulatório, enquanto que o crescimento e atresia de folículos é denominado, onda de crescimento folicular (LUCY et al., 1992).

Na espécie bovina, o desenvolvimento folicular antral se divide em duas fases. A primeira fase, com crescimento lento, compreende um período de 30 dias a partir da formação do antro, com folículos de aproximadamente 300μm até 3 a 5mm de diâmetro, quando são caracterizados folículos pequenos. A segunda fase, com crescimento rápido, compreende um período de 5 a 7 dias (AERTS; BOLS, 2010), e abrange as ondas de crescimento folicular, subdivididas nas fases de recrutamento, seleção e dominância, seguida de ovulação ou atresia

do folículo ovulatório (LUCY et al., 1992), que são dependentes das gonadotrofinas hipofisárias FSH e LH (GINTHER et al., 2001a).

Dessa forma, o aumento das concentrações plasmáticas de FSH auxilia no recrutamento de um grupo de folículos antrais, com aproximadamente 4mm de diâmetro (fase de recrutamento) (ADAMS et al., 1992). A partir da emergência da onda folicular, um dos folículos é selecionado, não sofre atresia e potencialmente pode ovular (fase de seleção). Em consequência, ocorre a divergência folicular, que é caracterizada pela diferença de crescimento entre os dois maiores folículos da onda folicular (BARUSELLI et al., 2007). O folículo selecionado passa a exercer dominância sobre os demais folículos, e inibe o recrutamento de um novo grupo de folículos (fase de dominância) (GINTHER et al., 1989; Id.,1996; SIROIS; FORTUNE, 1990).

O folículo dominante (que está em fase de crescimento e produz quantidades crescentes de E2 sob influência do FSH) aumentará os níveis de E2, que suprimem a secreção de FSH por mecanismos de retroalimentação negativa sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário (GINTHER et al., 1996; Id., 1999). Durante a divergência folicular, o folículo dominante adquire receptores para LH, que mantém o crescimento e maturação folicular, enquanto que os folículos subordinados sofrem atresia por não possuírem esses receptores (BEG et al., 2001).

O LH secretado pela adeno-hipófise é regulado pela P4 e E2 ovarianos. A liberação do LH ocorre sob a forma de pulsos que variam em frequência e amplitude (RAHE et al., 1980). Uma vez que a concentração sérica de P4 diminui para concentrações inferiores a 1 ng/ml, em decorrência da destruição do corpo lúteo, aumenta a frequência dos pulsos de LH (GOODMAN; KARSH, 1980; WILTBANK et al., 2002). Com aumento da frequência de pulsos do LH, ocorre estímulo da maturação do folículo dominante, que passa a produzir altas quantidades de E2 (FORTUNE et al., 2001). O E2, em baixas concentrações de P4, estimula os picos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e consequentemente de LH, que possibilita a ovulação do folículo dominante (UILENBROEK; RICHARDS, 1979; GINTHER et al., 2001b). A disponibilidade de insulina e de IGF-1 circulantes também auxiliam no controle da produção de E2 por meio dos folículos, que estimula o pico pré-ovulatório de LH e a ovulação (BUTLER, 2003).

Entretanto, altas concentrações plasmáticas de P4 provocam diminuição na frequência de pulsos do LH (SIROIS; FORTUNE, 1990), ocasionam perda de dominância do folículo dominante. Com isso, não ocorre a ovulação, o folículo entra em atresia (GINTHER et al., 1989; LUCY et al., 1992), e inicia-se uma nova onda folicular (ADAMS et al., 1992). O recrutamento

de um novo grupo de folículos para a próxima onda folicular é realizado principalmente pelo FSH (AERTS; BOLS, 2010).

1.2 FATORES QUE INTERFEREM A EFICIÊNCIA REPRODUTIVA

A atividade leiteira no mundo tem se caracterizado pelo aumento da concentração geográfica da produção, uma vez que ocorreu uma redução no número de propriedades, aumento no número de vacas ordenhadas e aumento da produtividade individual das vacas (RUTTEN at al., 2013). Essa tendência mundial selecionou animais de elevada produtividade para o sistema produtivo. Entretanto, tem ocasionado diminuição da eficiência reprodutiva de vacas leiteiras (LOPEZ et al., 2004; WILTBANK et al., 2006). Essa diminuição pode estar associada às altas taxas de metabolização dos hormônios esteroides no fígado (SANGSRITAVONG et al., 2002), que ocasionam menores níveis circulantes de E2 e P4 (BUTLER et al., 2003) quando comparado a animais de baixa produção (LOPEZ et al., 2004), e animais não lactantes (SARTORI et al., 2002).

Dessa forma, as baixas concentrações de E2 circulante no dia do estro ocasionam estros curtos e de baixa intensidade (ROCHE, 2006). Assim como, vacas de alta produção de leite (entre 50 e 55kg/dia) apresentaram estro de curta duração (3 horas), quando comparadas a vacas com produção entre 25 e 30 kg/dia (15 horas) (LOPEZ et al., 2004). De modo igual, não foi observada correlação entre produção de leite (~7800 kg por 305 dias) e comportamento de estro de vacas holandesas (n=64) (VAN EERDENBURG et al., 2002). Similarmente, vacas holandesas (*Bos taurus*) de alta produção apresentaram estro de curta duração, uma vez que ocorreu diminuição do E2 circulante, decorrente do aumento do metabolismo hepático, e consequente, metabolização do E2 (WILTBANK et al., 2006).

Os sinais comportamentais do estro são identificados pela queda na produção de leite, diminuição do apetite, movimentação intensa, imobilidade durante a monta, inserção da cauda arrepiada, vulva edemaciada, e descarga de muco vaginal elástico (GONÇALVEZ et al., 2001). Estes sinais podem ser afetados pelo estresse, que por sua vez inibe a secreção de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) no hipotálamo, consequentemente suprime a liberação do hormônio luteinizante (LH) na hipófise, dessa forma, afeta as concentrações de E2 e P4 (WALKER et al., 2008). Além disso, a eficiência reprodutiva, o comportamento do estro e a intensidade de estro, podem ser afetados por fatores ambientais, como duração do dia (fotoperíodo), temperatura, chuvas e ventos (GALINA et al., 2007).

Nos EUA a dificuldade de observação de estro em novilhas, e a possível demora na inseminação artificial trazem prejuízos econômicos para a indústria de laticínios, que é estimada em US$ 300 milhões de dólares/ano (SENGUER 1994). Apesar disso, a taxa média de concepção para novilhas é de 57% (KUHN, 2006), considerada boa em comparação à obtida com vacas em lactação (SKENADORE, 2017).

De outro ponto de vista, tem-se relatado que a redução da fertilidade está associada com o aumento do número de animais por fazenda e a baixa quantidade de mão de obra, ou seja, baixa relação homem:vaca, por consequência, há menor capacidade de detecção de estros e diagnóstico precoce de infecções uterinas, o que resulta em baixa eficiência reprodutiva (LEBLANC, 2010).

A partir do momento em que se tem redução da disponibilidade de mão de obra rural, bem como, o aumento do seu custo (RUTTEN et al., 2013), tem se utilizado ferramentas tecnológicas por meio de sensores eletrônicos, que registram a movimentação dos animais, consequentemente, auxilia na detecção do estro (RUTTEN et al., 2013; AUNGIER et al., 2015).

Além disso, as biotécnicas reprodutivas, como, a sincronização de estro, auxiliam no aumento da eficiência reprodutiva e econômica da pecuária (ODDE, 1990). A utilização de protocolos de sincronização do estro possibilita que sejam realizadas inseminações em horário pré-determinado, ou seja, a IA é realizada em tempo fixo (IATF), sem a necessidade de detecção do estro (TORRES-JÚNIOR et al., 2009).

1.3 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF)

A inseminação artificial (IA) é uma biotécnica reprodutiva que permite eficiente melhoramento genético, por meio da utilização do sêmen de reprodutores de maior mérito genético para as características que se deseja melhorar no rebanho, além de, permitir maior controle de paternidade e cruzamento alternado entre raças, bem como, evitar a transmissão de doenças pelo touro e doenças hereditárias (CARVALHO et al., 2010a). Contudo, a eficiência dos programas de IA é limitada pelas dificuldades associadas à observação do estro, e inadequado momento da inseminação (BARUSELLI et al., 2004).

No entanto, uma estratégia para melhorar a resposta da fertilidade de vacas inseminadas, é a utilização de protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), sem a necessidade de identificar estro (MONTEIRO et al., 2015; MELO et al., 2016). A IATF é umas das biotécnicas mais utilizadas nos últimos 40 anos (WILTBANK; PURLSEY, 2014), isso em

razão do uso de progesterona na sincronização do estro, que permitiu um grande avanço no controle reprodutivo da fase lútea e sincronização do crescimento folicular (MACMILLAN; BURKE, 1996).

Os programas hormonais são ferramentas que possibilitam a utilização da IA, com função de concentrar a mão de obra, sincronização e indução da ciclicidade dos animais, consequentemente melhorar a taxa de prenhez. Entretanto, o uso isolado de progestágenos em protocolos de IATF durante longos tratamentos (14 a 21 dias), demonstrou eficácia na sincronização do estro, porém, existe o inconveniente da ovulação ter baixa fertilidade, (MACMILLAN; PETERSON, 1993), uma vez que ocorre a ovulação de folículos persistentes (REVAH; BUTLER, 1996), e quase sempre seus oócitos são inférteis.

A utilização de estrógenos associado à progesterona, no início de protocolos de IATF, causa supressão da secreção tanto de FSH quanto de LH (MARTÍNEZ et al., 2005), e impossibilita a ovulação do folículo dominante, por causar atresia no folículo dominante (BÓ et al., 1995a). A partir disso, promove o recrutamento de folículos para nova onda folicular entre 36 a 72 horas a partir da administração do estrógeno (BÓ et al., 2000; MARTÍNEZ et al., 2005), com surgimento de nova onda folicular entre 4 a 5 dias após a aplicação (BÓ et al., 1995a; SIQUEIRA et al., 2009). Todavia, após a retirada do implante de progesterona, permite a sincronização da inseminação (MACMILLAN; BURKE, 1996).

Além disso, a associação de estrógenos e progesterona apresenta taxa de fertilidade aceitável, com aproximadamente 40% (MONTEIRO et al., 2015) a 50% de prenhez (BÓ et al., 1994; Id., 1995a).

1.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE PROGESTERONA E ESTRÓGENOS

Os estrógenos são hormônios derivados do colesterol, que são sintetizados nos ovários, testículos e glândulas adrenais. Os estrógenos endógenos incluem o 17 β-estradiol (E2), a estrona (E1) e o estriol (E3), a saber, o estradiol é o principal estrógeno secretado pelos ovários (GRUBER et al., 2002).

Existem diferentes ésteres de estradiol que podem ser utilizados em protocolos de sincronização de crescimento folicular e ovulação, dentre eles, valerato de estradiol (VE), cipionato de estradiol (CE), benzoato de estradiol (BE), 17β-estradiol (estrogênio idêntico ao fisiológico do animal) (REAMES et al., 2011). O VE (BÓ et al., 1995b) e o CE (VYNCKIER et al., 1990; COLAZO et al., 2003), possuem meia vida mais longa, e ocasiona atraso e dispersão do dia de emergência da onda de desenvolvimento folicular. Já o BE (VYNCKIER

et al., 1990) e o 17β-estradiol (BÓ et al., 1994; BÓ et al., 1995b) possuem meia vida mais curta, portanto, possibilita elevação rápida nos níveis de estradiol no plasma e induzem emergência da onda de crescimento folicular de forma sincronizada.

Assim como verificado em estudo que avaliou o pico de concentração de 17β estradiol plasmático após a aplicação do próprio 17β estradiol, do BE e CE. O pico de 17β estradiol no plasma após aplicação do 17β estradiol e do BE, ocorreu para os dois ésteres após 4 horas, bem como, o retorno à concentração basal ocorreu em 24 e 36 horas, respectivamente. Todavia, a aplicação do CE não alterou o nível fisiológico de 17β estradiol plasmático (SOUZA et al., 2005). Com isso, a diferença farmacocinética entre os ésteres pode provocar diferentes resultados nos protocolos de sincronização estabelecidos.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

Avaliar a combinação hormonal 17β estradiol associado à P4 injetável e implante de progesterona, comparado ao benzoato de estradiol e implante de progesterona, na indução de uma nova onda folicular em protocolos de IATF.

1.5.2 Objetivos específicos

- Verificar o momento do desenvolvimento de nova onda folicular;
- Identificar a curva de crescimento folicular;
- Determinar se existe efeito do tratamento no tamanho folicular pré-ovulatório, ou seja, no dia anterior a inseminação artificial.

1.6 HIPÓTESE

A nova formulação comercial constituída pelo hormônio 17β estradiol associada à P4 injetável, induz o surgimento de nova onda folicular anteriormente ao benzoato de estradiol e promove um maior tamanho folicular no dia em que antecede a IA, em protocolos de IATF à base de progesterona.

CAPÍTULO II: MANUSCRITO

Os resultados desta dissertação foram apresentados na forma de um manuscrito, com sua formatação de acordo com as orientações da revista Sêmina.

Characterization of the appearance of new follicular wave in heifers after 17β estradiol or estradiol benzoate

Caracterização do surgimento de nova onda folicular em novilhas após a utilização de 17β ou benzoato de estradiol

Demonstramos o perfil de crescimento folicular em novilhas submetidas a protocolo com implante de progesterona associado à administração de 17β estradiol e progesterona injetável.

A utilização da combinação 17β estradiol e progesterona injetável, quando comparado ao benzoato de estradiol, determina o mesmo perfil de crescimento folicular e tamanho pré-ovulatório.

A administração de 5,5mg de 17β estradiol ou 2mg de benzoato de estradiol, conforme recomendações de bula, determinam o mesmo perfil sérico de estradiol nos primeiros dias de protocolo.

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da utilização de dois ésteres de estradiol sobre o dia de surgimento de nova onda folicular e tamanho médio do folículo pré-ovulatório. Foram utilizadas 10 novilhas da raça holandês submetidas a protocolo de inseminação artificial em tempo fixo, a base de progesterona, alocadas em dois grupos: grupo benzoato de estradiol (BE) (n=5) e grupo 17β estradiol (17β) (n=5). No dia da introdução do implante de progesterona (definido como dia 0), os animais dos grupos BE e 17β receberam uma administração intramuscular de benzoato de estradiol (BE) ou 17β estradiol, respectivamente. O tamanho médio folicular no dia anterior a inseminação foi de 13,44±0,78mm para o grupo BE e 13,98±0,79mm para o grupo 17β (P>0,05). A dosagem de estradiol realizada nos primeiros 4 dias do protocolo, indica redução contínua entre os dias do protocolo (P<0,05), e de forma paralela sem diferença entre os grupos (P>0,05) e interação entre dia e grupo (P>0,05). Portanto, a utilização de 17β estradiol não antecipou a redução dos níveis séricos de estradiol e o consequente surgimento de nova onda folicular em novilhas, comparado ao benzoato de estradiol, quando utilizado no início do protocolo de IATF associado a implante de progesterona. Além disso, o tamanho do folículo pré-ovulatório não diferiu entre os grupos.

Palavras-chave: Bovino, Dinâmica folicular, Estrógeno, IATF, Sincronização de estros.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the effect of two estradiol esters on new follicular wave emergence and size of ovulatory follicle. Ten Holstein heifers were given a progesterone based timed artificial insemination (TAI) protocol and were randomly allocated to one from two groups: estradiol benzoate (EB; n=5) or 17β estradiol (17β; n=5). At day of device insert (day 0), estradiol benzoate or 17β estradiol was given IM to heifers of EB and 17β group, respectively. The ovulatory follicle size averaged 13.44±0.78mm to EB group and

13.98±0.79mm to 17β group (P>0.05). Serum estradiol concentration decreases over the first 4 days of protocol (P<0.05) in a parallel way, ie without group effect (P>0.05) or day-group interaction (P>0.05). Therefore, the 17β estradiol use did not anticipate serum estradiol decrease nor the new wave emergence in heifers, when contrasted with estradiol benzoate in a progesterone-based protocol. Moreover, the size of ovulatory follicle did not differ between groups.

Key words: Bovine, Estrogen, Estrus synchronization, Follicular dynamics, FTAI.

INTRODUÇÃO

O controle do surgimento de nova onda folicular e posterior ovulação impulsionou a utilização de protocolos de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), que se tornou uma das biotécnicas mais utilizadas nos últimos 40 anos, com inúmeras melhorias adicionadas (WILTBANK & PURLSEY, 2014). O uso de progesterona em protocolos de IATF foi um importante avanço, pois impede a ovulação do folículo dominante pela supressão do LH durante determinado período, e possibilita a sincronização da inseminação após a sua retirada (MACMILLAN & BURKE, 1996). Porém, somente com a utilização da progesterona muitos folículos ficam envelhecidos e ocasiona ovulação de oócitos de baixa qualidade, o que interfere nas taxas de concepção. Nesse contexto, o estrógeno foi empregado no início dos protocolos que utilizam progesterona, com a função de causar atresia do folículo dominante (BÓ et al., 1995a), e possibilitar o surgimento de nova onda folicular entre 4 a 5 dias após a aplicação (SIQUEIRA et al., 2009).

Como a inseminação artificial é realizada em tempo pré-determinado no protocolo de IATF, o surgimento da onda e consequentemente a ovulação deve ocorrer de forma sincronizada para alcançar elevada taxa de fertilidade (MARTÍNEZ et al., 2000). Esse motivo justifica a escolha maciça, até então, do benzoato de estradiol (BE) associado à progesterona no início dos protocolos de IATF. A utilização de protocolos baseados em BE e progesterona permitem a obtenção de taxas de concepção em torno de 40%, que são consideradas satisfatórias, mas necessitam ainda de melhorias na emergência de onda folicular, concentração de progesterona, luteólise bem-sucedida e alto percentual de ovulação (MONTEIRO et al., 2015).

Existem comercialmente 4 formulações de estradiol, com diferenças na constituição molecular, que podem ser utilizadas em protocolos de sincronização de crescimento folicular e ovulação em fêmeas bovinas: benzoato de estradiol (BE) ($C_{25}H_{28}O_3$), valerato de estradiol (VE) ($C_{23}H_{32}O_3$), cipionato de estradiol (CE) ($C_{26}H_{36}O_3$), além do 17ß estradiol ($C_{18}H_{24}O_2$) que é sintético, mas idêntico ao fisiológico (REAMES et al., 2011). O VE (BÓ et al., 1995b) e o CE (VYNCKIER et al., 1990; COLAZO et al., 2003) possuem meia vida mais longa, e ocasiona atraso e dispersão do dia de emergência da onda de desenvolvimento folicular. Já o benzoato de estradiol (VYNCKIER et al., 1990) e o 17β-estradiol (BÓ et al., 1994; BÓ et al., 1995b) possuem meia vida mais curta, portanto, possibilitam elevação rápida nos níveis de estradiol no plasma e induzem emergência da onda de crescimento folicular de forma sincronizada.

O que pode explicar a diferença entre a farmacocinética dos ésteres é o tamanho da cadeia do éster, ou seja, quanto maior o tamanho da cadeia, menor é a solubilidade em água, e consequentemente maior tempo

será necessário para ocorrer à absorção total. Portanto, a diferença de ação entre os ésteres está no tempo de absorção e não no seu metabolismo (MAPLETOFT et al., 2002).

Recentemente foi lançado comercialmente um estradiol idêntico ao 17β fisiológico, para utilização em bovinos. Existem alguns dados sobre a utilização do 17β estradiol na literatura, mas são antigos e com diferentes fontes de progesterona (BÓ et al., 1994; BÓ et al., 1995b). Além disso, essa nova formulação associa o 17β-estradiol com progesterona injetável, assim surge o interesse de conhecer seu comportamento na indução de nova onda folicular. Baseado nisso, o objetivo do presente estudo foi conhecer a dinâmica folicular de novilhas leiteiras após a aplicação de 17β estradiol associado à fonte de progesterona. Em consequência, será possível adequar os atuais protocolos para a utilização do 17β estradiol associado à progesterona.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no mês de agosto de 2018 em uma fazenda comercial de recria de novilhas leiteiras no município de Ipumirim, Santa Catarina, Brasil. Foram utilizadas 10 novilhas da raça holandês com presença de corpo lúteo no dia 0 do protocolo, com 350–400 kg de peso vivo, escore de condição corporal entre 3 e 4 (escala de 1 a 5, em que, 1 é magra, e 5 obesa), mantidas em pastagem de *Lolium multiflorum*, com água e sal mineral *Ad libitum*. As novilhas foram alocadas em dois grupos, 17β e BE, com 5 novilhas em cada grupo. No dia 0 do protocolo de IATF, os animais do grupo 17β receberam aplicação de 5,5 mg de 17β estradiol e 50 mg de progesterona por via intramuscular (IM), além da introdução de implante intravaginal de progesterona (0,78 mg). A utilização de progesterona IM no grupo 17β, ocorreu em virtude de o produto comercial possuir esta associação. No dia 8 foram retirados os implantes de progesterona e aplicado 530 µg de cloprostenol sódico IM, no dia 9 foi administrado 37,5 µg de Lecirelina IM (Figura 1a). Os animais do grupo BE recebeu 2 mg de benzoato de estradiol IM, e implante intravaginal de progesterona (0,78 mg), no dia 8 foram retirados os implantes de progesterona e aplicado 530 µg de cloprostenol sódico IM, no dia 9 foi administrado 37,5 µg de Lecirelina IM (Figura 1b). As dosagens utilizadas no experimento seguem as recomendações de bula de cada produto.

Foram realizadas avaliações diárias a partir do dia 0 do protocolo por ultrassonografia transretal (Mindray®, com transdutor linear 8 MHz), para acompanhar regressão folicular e surgimento de nova onda, conforme descrito por Siqueira et al. (2009). Resumidamente, durante cada exame, foram avaliadas diferentes seções transversais dos ovários e realizado 3 desenhos esquemáticos de cada ovário, que permite avaliar o diâmetro e a localização tridimensional do folículo dominante e demais estruturas presentes. Foram avaliadas as seguintes variáveis: diâmetro do maior folículo no momento do tratamento, diâmetro máximo atingido pelo maior folículo após o tratamento, intervalo do tratamento até o diâmetro máximo, diminuição progressiva no tamanho do maior folículo, primeiro dia em que iniciou a diminuição do tamanho folicular (regressão folicular), emergência de nova onda folicular (dia em que pelo menos um folículo em crescimento atingiu 5mm) e tamanho médio do folículo pré-ovulatório (tamanho no dia anterior a inseminação artificial).

Foram realizadas coletas de sangue da veia coccígea nos dias 1, 2, 3 e 4 do protocolo para mensuração das concentrações séricas de estradiol. Após a separação do soro, a dosagem foi realizada por ELISA, sem extração por solventes, utilizando o kit comercial Estradiol Test System (Monobind Inc.), de acordo com as

recomendações do fabricante. Todas as amostras foram mensuradas em um único ensaio, com coeficiente de variação intra-ensaio de 8,94% e sensibilidade de 8,2pg/mL.

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos (BE e 17β) e 5 repetições (com uma unidade animal/repetição). Todas as análises foram realizadas com o pacote estatístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC) e adotado como nível de significância $P \leq 0,05$. Os efeitos de tratamento, tempo e a interação tratamento e tempo no desenvolvimento folicular (regressão do folículo e emergência da nova onda) e concentração sérica de estradiol foram determinados por modelos mistos para dados repetidos (PROC MIXED). Os efeitos dos tratamentos em um momento específico foram determinados pelo teste T de Student, utilizando médias corrigidas. As diferentes estruturas de covariância foram testadas, e utilizou-se a auto regressiva de primeira ordem por apresentar menor critério de informação de Akaike (AIC).

O efeito dos tratamentos sobre as demais variáveis contínuas (não repetidas no tempo) foi determinado por análise de variância (*one-way* ANOVA; PROC GLM). Todas as variáveis contínuas, assim como o resíduo de cada modelo estatístico foram testadas para normalidade utilizando o teste de *Shapiro Wilk* e normalizadas quando necessário de acordo com a distribuição dos dados.

Resultados e Discussão

O tamanho médio folicular da primeira onda a partir do dia 0 (início da avaliação) até dia 5 do protocolo de IATF (desaparecimento do folículo) em cada grupo é representado na Figura 2. Observa-se que houve um efeito de dia, pelo fato de ocorrer regressão contínua ao longo dos dias do protocolo. Por outro lado, não ocorreu diferença entre grupos e interação do dia do protocolo *versus* grupos avaliados, por haver ocorrido redução paralela de tamanho médio folicular entre os grupos.

O diâmetro do maior folículo no início do protocolo de IATF (dia 0) foi de 8,45 mm para o 17β, e de 10,5 mm para o BE. O diâmetro máximo atingido pelo folículo da primeira onda ao longo do protocolo de IATF foi de 7,96±0,4mm para o 17β e 9,47±1,47mm para o BE ($P<0,05$). Essa diferença encontrada entre os grupos pode ser explicada por uma possível diferença entre as fases do ciclo estral em que as novilhas se encontravam no momento do início da avaliação (Tabela 1). O intervalo entre o início do protocolo e o tamanho folicular máximo foi de 1,0±0,32 dias para o 17β, e 1,0±0 dias para o BE. Além disso, ocorreu diminuição progressiva no tamanho do maior folículo, e todos os animais apresentaram uma nova onda folicular e consequentemente ovulação do folículo da segunda onda, bem como a prenhez não diferenciou entre grupos.

O tamanho médio dos folículos da nova onda folicular, a partir do dia 02 (quando os folículos atingiram 5 mm) até dia 09 do protocolo de IATF (dia que antecede a inseminação artificial), em seus respectivos grupos, é representado na Figura 3. Pode-se observar que houve crescimento dos folículos ao longo dos dias do protocolo ($P<0,001$), mas este crescimento ocorreu de forma paralela, ou seja, não houve um efeito de tratamento ($P>0,05$). Assim também, no dia que antecedeu a IATF (dia 09), não houve diferença no tamanho médio folicular entre os grupos (13,98±0,79mm para o 17β e 13,44±0,78mm para o BE). Além disso, o tamanho folicular no dia que antecedeu a IA ficou dentro do parâmetro ideal estimado para obtenção de boa taxa de prenhez em novilhas, que fica entre 10,7 a 15,7 mm de diâmetro (PERRY et al., 2007).

A dosagem de estradiol está representada na Figura 4, em que, ocorreu redução contínua entre os dias do protocolo (P<0,05), e de forma paralela sem diferença entre os grupos (P>0,05) e interação entre dia e grupo (P>0,05). Esse resultado suporta o que foi demonstrado na Figura 3, em que não ocorreu diferença entre os grupos no surgimento e crescimento da nova onda.

O dia do surgimento de nova onda folicular não diferiu entre os grupos (P>0,05). De outro modo, foi relatado por BÓ et al. (1995b) o surgimento de nova onda em 4,3 dias ao utilizar associação de implante auricular de progesterona e 17β estradiol (5 mg) em novilhas, e menor que 5,4 dias quando realizada a administração de 5 mg de benzoato de estradiol (BÓ et al., 2000). Resultado similar foi encontrado por MARTÍNEZ et al. (2005), com emergência em 3 a 4 dias para animais tratados com 17β (5 mg), e 4 a 5 dias para animais tratados com BE (5 mg), assim, a diferença no surgimento de nova onda entre os ésteres, manteve-se próximo a um dia. Isso pode ter ocorrido pela diferença no tempo de absorção entre os ésteres, visto que, o 17β estradiol possui cadeia molecular mais curta, isso faz com que, sua absorção seja facilitada, e ocorre de forma mais rápida que os demais ésteres de estradiol (MAPLETOFT et al., 2002).

Além disso, o dia do surgimento de nova onda folicular pode ter influência da dosagem dos ésteres de estradiol. A partir da aplicação de 1 e 5 mg de benzoato de estradiol, e 5 mg de 17β estradiol, obteve-se surgimento de nova onda folicular em 3,6±0,5; 5,5±0,5 e 3,6±0,2 dias, respectivamente. Portanto, o surgimento de nova onda folicular foi similar entre os tratamentos, quando utilizada as dosagens de 1 mg de benzoato de estradiol e 5 mg de 17β estradiol (MARTÍNEZ et al., 2005).

Resposta semelhante no surgimento de nova onda, quando utilizado benzoato de estradiol na dosagem de 2 mg, foi obtido por BURKE et al. (2003) ao testarem diferentes doses de benzoato de estradiol (1, 2 e 4mg/500 kg de peso vivo), com nova onda folicular em 3,3±0,3; 4,0±0,6 e 4,4±0,4 dias, respectivamente. Com isso, sustenta a compreensão de que o surgimento de nova onda folicular sofre variação também pela dosagem utilizada.

Neste estudo não utilizamos progesterona IM para o grupo BE no dia 0 do protocolo de IATF, e obteve-se surgimento da nova onda semelhante a 4,4 dias relatado por KIM et al. (2007), ao utilizar implante de progesterona intravaginal (1,9 g) e 50 mg de progesterona IM, associado ao benzoato de estradiol (1 mg). Resultado semelhante foi verificado por CACCIA & BÓ (1998) ao aplicar 2,5 mg de benzoato de estradiol associado a implante de progesterona e 50 mg de progesterona IM, com sincronização de nova onda folicular em 4 dias. Dessa forma, a suplementação de progesterona IM em protocolos de IATF que utiliza implante de progesterona associado a benzoato de estradiol ou 17β estradiol não altera os dias de surgimento de nova onda. O pressuposto é de que a suplementação de progesterona IM não altera as concentrações de FSH, consequentemente, não modifica o surgimento de nova onda folicular. Também foi verificado que a utilização de 4 diferentes doses (0, 25, 50 e 100 mg) de progesterona IM no dia 0 do protocolo, que ao utilizar implante de progesterona associado a 5 mg de 17ß estradiol, não houve diferença na concentração de FSH (MARTÍNEZ et al., 2005).

Além disso, SIQUEIRA et al. (2009), ao utilizarem benzoato de estradiol (2 mg) associado com dispositivo de medroxiprogesterona (MPA; 250mg), ou MPA mais progesterona injetável (100mg), ou implante de progesterona intravaginal (1g), obtiveram surgimento de nova onda em 4,1±0,23; 5,3±0,33 e

4,9±0,35 dias, respectivamente. Todavia, não foi encontrada diferença no surgimento de nova onda folicular com suplementação de progesterona IM.

Conclusões

A utilização de 17β estradiol associado à progesterona injetável não alterou o surgimento de nova onda folicular em novilhas, comparado ao benzoato de estradiol, quando utilizado no início do protocolo de IATF associado ao implante de progesterona. O tamanho folicular médio no dia anterior a inseminação artificial não diferiu.

Agradecimento

Ao Fundo de Apoio à Manutenção e ao Desenvolvimento da Educação Superior- FUMDES, pela bolsa de estudos concedida para a realização deste estudo. Agradecemos também à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Referências

CACCIA, M.; BÓ, G.A (1998). Follicle wave emergence following treatment of CIDR-b implanted beef cows with estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology*. doi: 10.1016/S0093-691X(98)90694-X.

BURKE, C.R.; MUSSARD, M.L.; GASSERA, C.L.; GRUM, D.E.; DAY, M.L (2003). Estradiol benzoate delays new follicular wave emergence in a dose-dependent manner after ablation of the dominant ovarian follicle in cattle. *Theriogenology*, v.60, p.647-658. doi: 10.1016/S0093-691X(03)00078-5.

BÓ, G.A.; BERGFELT, D.R.; BROGLIATTI, G.M.; PIERSON, R.A.; ADAMS, G.P.; MANPLETOFT, R.J (2000). Local versus systemic effects of exogenous estradiol-17b on ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen implants. *Animal Reproduction Science*, v.59, p.141-157. doi: 10.1016/S0378-4320(00)00140-8

BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A. TRIBULO, H.E.; CACIA, M.; MAPLETOFT,R.J (1994). Follicular wave dynamics after estradiol 17- beta treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology*. 41:1555–1569. doi: 10.1016/0093-691X(94)90821-Y

BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J (1995a). Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science*, v.39, n.3, p.193-204. doi: 10.1016/0378-4320(95)01389-H

BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J (1995 b). Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*, v. 43, p.31–40. doi: 10.1016/0093-691X(94)00010-R

COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J (2003). Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. *Theriogenology*, v. 60, p. 855-865. doi: 10.1016/S0093-691X(03)00091-8

KIM, U. H.; SUH, G.H.; HUR, T.Y.; KANG, S.J; KANG, H.G, PARK, S.B.; KIM, H.S; KIM, I.H (2007). Comparasion of two types of CIDR-Based Timed Artificial Insemination Protocols for repeat breeder Dairy Cows. *Journal of Reproduction and Development*, v.53, n3. doi: 10.1262/jrd.18147

MACMILLAN, K.L.; BURKE, C.R (1996). Effects of oestrous cycle control on reproductive efficiency. *Animal Reproduction Science*, v.42, p.307-320. doi: 10.1016/0378-4320(96)01512-6.

MONTEIRO JR., P.L.J.; BORSATO, M.; SILVA, F.L.M.; PRATA, A.B.; WILTBANK, M.C.; SARTORI, R (2015). Increasing estradiol benzoate, pretreatment with gonadotropin-releasing hormone, and impediments for successful estradiol-based fixed-time artificial insemination protocols in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v.98, p.3826-3839. doi: 10.3168/jds.2014-9040.

MAPLETOFT, R.J; COLAZO, M.G.; MARTINEZ, M.F.; KASTELIC, J.P (2002). Estrogen esters to synchronizefollicular wave emergence and ovulation in CIDR-treated cattle. Anais na Annual convention of the american embryotransfer association, p.27-38.

MARTÍNEZ, M.F.; ADAMS, G.P.; KASTELIC, J.P.; BERGFELT, D.R.; MAPLETOFT, R.J (2000). Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. *Theriogenology,* v.54, p.757-769. doi: 10.1016/S0093-691X(00)00388-5

MARTÍNEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; BÓ, G.A.; CACCIA, M.; MAPLETOFT R.J (2005). Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v.86, p.37-52. doi: 10.1016/j.anireprosci.2004.06.005.

PERRY, G.A. SMITH, M.F.; ROBERTS, A.J; MACNEIL, M.D.; GEARY, T.W (2007). Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *Journal Animal Science*, v.85, p.684-689. doi: 10.2527/jas.2006-519

REAMES, P.S.; HATLER, T.B.; HAYES, S.H.; RAY D.L.; SILVIAL W.J (2011). Differential regulation of estrous behavior and luteinizing hormone secretion by estradiol-17 in ovariectomized dairy cows. *Theriogenology*, v.75, p.233–240. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.08.009.

SIQUEIRA, L.C.; OLIVEIRA, J.F.; ROVANI, M.T.; FERREIRA, R.; BORGES, L.F.; GONÇALVES, P.B (2009). Effects of estradiol and progestins on follicular regression before, during, and after follicular deviation in postpartum beef cows. *Theriogenology*, v.7, p.614-619. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.024

VYNCKIER, L.; DEBACKERE, M.; KRUIF, A. DE; CORYN, M (1990). Plasma estradiol- 17ß concentrations in the cow during induced estrus and after injection of estradiol- 17ß benzoate and estradiol-17ß cypionate - a preliminary study. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.13, p.36-42. doi: 10.1111/j.1365-2885.1990.tb00745.x

WILTBANK, M.C; PURSLEY, J.R (2014). The cow as an induced ovulator: Timed AI after synchronization of ovulation. *Theriogenology*, v.81, p.170–185. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.017.

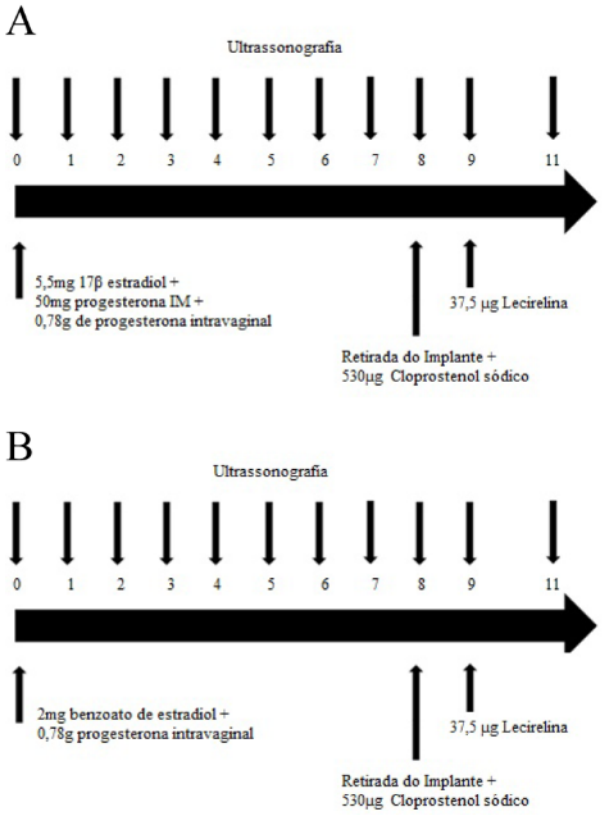

Figura 1. A) Protocolo de IATF utilizado no grupo BE, com benzoato de estradiol associado a implante de progesterona intravaginal. B) Protocolo de IATF utilizado no grupo 17 ß, com 17 ß estradiol associado a progesterona IM e implante de progesterona intravaginal.

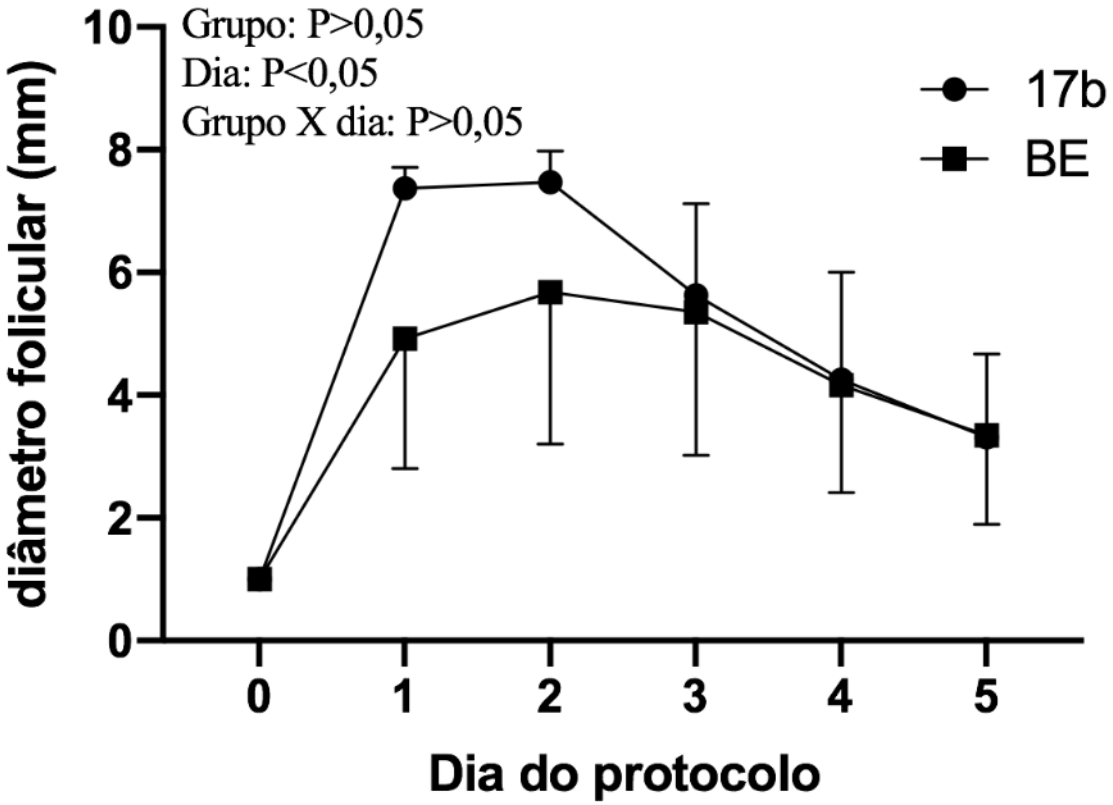

Figura 2. Tamanho médio dos folículos da primeira onda durante os dias do protocolo de IATF, em seus respectivos tratamentos.

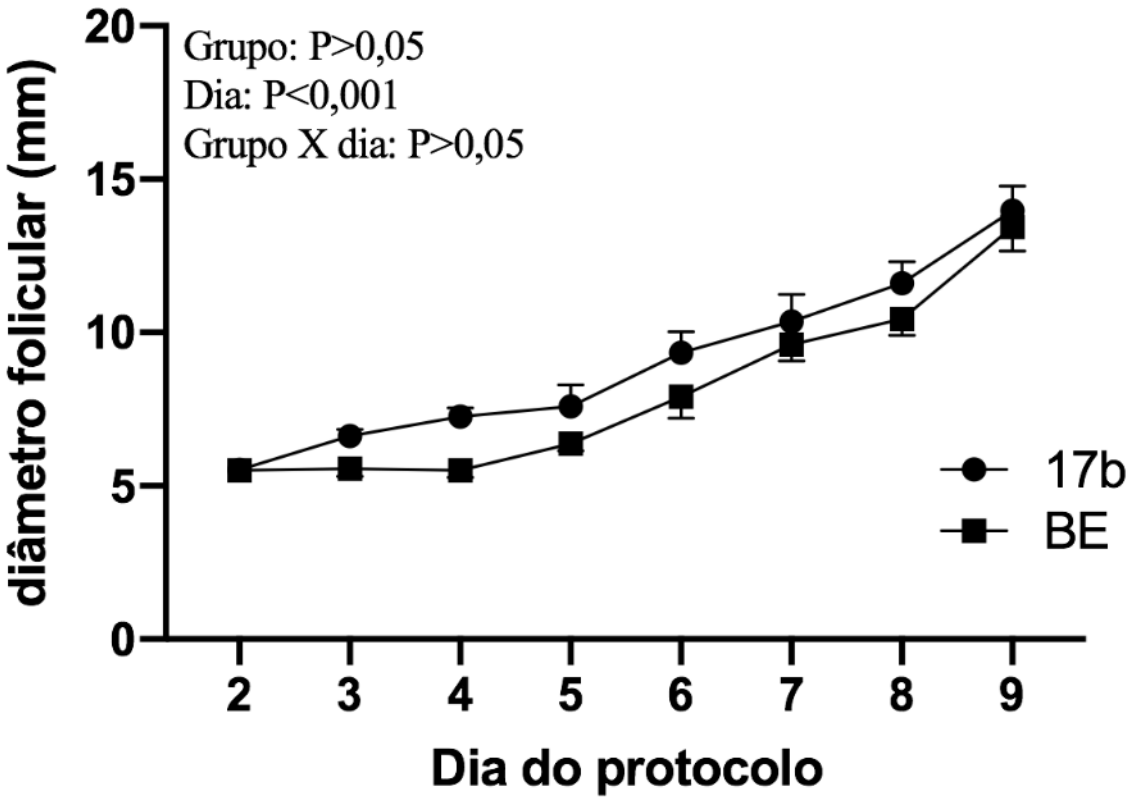

Figura 3. Tamanho médio dos folículos da nova onda durante os dias do protocolo de IATF, em seus respectivos tratamentos.

Tabela 1. Tamanho folicular médio em diversos dias do protocolo de IATF.

	17β	BE
Diâmetro do maior folículo no início do protocolo	8,45	10,5
Diâmetro máximo após o início do protocolo (média)	7,96±0,4a	9,47±1,47b
Intervalo entre início do protocolo e tamanho máximo (dias)	1,0±0,32a	1,0±0a
Tamanho do folículo pré-ovulatório (média)	13,98±0,79a	13,44±0,78ª

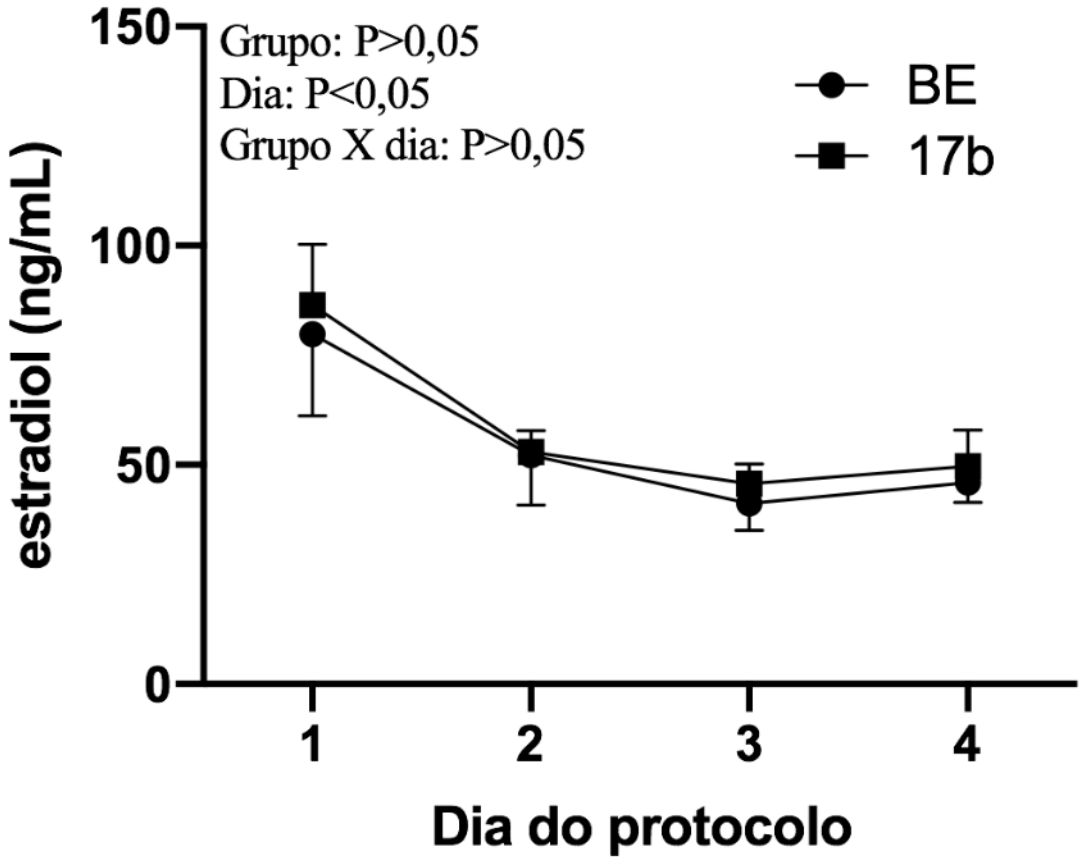

Figura 4. Dosagem de estradiol até o dia 4 do protocolo entre os grupos.

2. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados na presente pesquisa permitem entender melhor a utilização da combinação 17β estradiol e progesterona no início de protocolos de IATF, e nos instiga a repensar doses hormonais e tempo de manutenção de fonte externa de progesterona, bem como, o momento adequado da aplicação de eCG, FSH e outros indutores de ovulação em protocolos de IATF e superovulação. Com isso, pode ser sugestivo de melhorias em protocolos de IATF, TE e FIV que utilizem essa associação.

3. REFERÊNCIAS

ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; GINTHER, O.J. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.95, p.627–640, 1992.

AERTS, J.M.J.; BOLS, P.E.J. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.180–187, 2010.

AUNGIER, S. P. M. et al. The relationship between activity clusters detected by an automatic activity monitor and endocrine changes during the periestrous period in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.1666–1684, 2015.

BARUSELLI, P.S. et al. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, 82–83, p.479–486, 2004.

BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.205–211, 2007.

BEG, M.A. et al. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction**, v.64, p.432–441, 2001.

BÓ, G.A. et al. Follicular wave dynamics after estradiol 17- beta treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, 41:1555–1569. 1994.

BÓ, G.A. et al. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science,** v.39, n.3, p.193–204, 1995a.

BÓ, G.A. et al. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology,** v. 43, p. 31–40, 1995b.

BUTLER, W.R. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. **Livestock Production Science**, v.83, p.211–218, 2003.

CARVALHO, B. C. et al. Biotécnicas. In: Auad, A.M. et al. **Manual de Bovinocultura de Leite**. Brasília: LK Editora; Belo Horizonte: Senar-AR/MG; Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite. p.123–182, 2010a.

CARVALHO, B. C. et al. Manejo Reprodutivo. In: Auad, A.M. et al. **Manual de Bovinocultura de Leite**. Brasília: LK Editora; Belo Horizonte: Senar-AR/MG; Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite. p.85–121, 2010b.

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

FORTUNE, J.E. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v.65, p.648–654, 2001.

GALINA, C.S.; ORIHUELA, A. The detection of estrus in cattle raised under tropical conditions: What we know and what we need to know. **Hormones and Behavior**, v.52, p.32–38, 2007.

GINTHER, O.J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, p.223–230, 1989.

GINTHER, O.J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1187–1194, 1996.

GINTHER, O.J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of fsh concentrations. **Theriogenology**, v.52, p.1079–1093, 1999.

GINTHER, O.J. et al. Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction**, v.65, p.638–647, 2001a.

GINTHER, O.J. et al. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v.64, p.197–205, 2001b.

GOODMAN, R.L.; KARSCH, F.J. Pulsatile Secretion of Luteinizing Hormone: Differential Suppression by Ovarian Steroids. **Endocrinology**, v.107, n. 5, 1980.

GRUBER, C.J. et al. Production and actions of estrogens. **New England Journal of Medicine**, v.346, n.5, p.340–352, 2002.

KUHN, M.T; HUTCHISON, J.L.; WIGGANS, G.R. Characterization of holstein heifer fertily in the Unites States. **Journal of Dairy Science**, v.89, n.12, p.4907–4920, 2006.

LEBLANC, S. Assessing the association of the level of milk production with reproductive performance in dairy cattle. **Journal of Reproduction and Development**, v.56, p.S1–S7, 2010.

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

LUCY, M.C. et al. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal Animal Science**, v.70, p.3615–3626, 1992.

MACMILLAN, K.L.; BURKE, C.R. Effects of oestrous cycle control on reproductive efficiency. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.307–320, 1996.

MACMILLAN, K.L., PETERSON, A.J. A new intravaginal progesterone realising device for cattle (CIDR - B) for estrous synchronization, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anestrous. **Animal Reproduction Science**, v.33, p.1–25, 1993.

MARTÍNEZ, M.F. et al. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v.86, p.37–52, 2005.

MELO, L.F. et al. Progesterone-based fixed-time artificial insemination protocols for dairy cows: Gonadotropin-releasing hormone versus estradiol benzoate at initiation and estradiol cypionate versus estradiol benzoate at the end. **Journal Dairy Science**. v.99, p.1–11, 2016.

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

ODDE, K.G. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. **Journal of Animal Science**, v.68, p.317–830, 1990.

RAHE, C.H. et al. Pattern of Plasma Luteinizing Hormone in the Cyclic Cow: Dependence upon the Period of the Cycle. **Endocrinology**, v.107, n.2, 1980.

REAMES, P.S. et al. Differential regulation of estrous behavior and luteinizing hormone secretion by estradiol-17 in ovariectomized dairy cows. **Theriogenology**, v.75, p.233–240, 2011.

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

ROCHE, J.F. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. **Animal Reproduction Science**, v.96, p.282–296, 2006.

RUTTEN, C.J. et al. Invited review: Sensors to support health management on dairy farms. **Biology of reproduction**, v.64, p.197–205, 2001.

SANGSRITAVONG, S. et al. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17ß in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.2831–2842, 2002.

SARTORI, R.;ROSA, G.J.M.; WILTBANK, M.C. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.2813–2822, 2002.

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

SIQUEIRA, L.C. et al. Effects of estradiol and progestins on follicular regression before, during, and after follicular deviation in postpartum beef cows. **Theriogenology**, v.7, p.614–619, 2009.

SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrus cycle in heifers monitored by Real-Time Ultrasonography. **Biology of reproduction**, v.39, p.308–317, 1988.

SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Lengthening the bovine estrus cycle with low concentrations of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicle dominance. **Endocrinology**, v.127, p.916–925, 1990.

SKENANDORE, C.S.; CARDOSO, F.C. The effect of tail paint formulation and heifer behavior on estrus detection. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**. v.5, n.2, p. 113–120, 2017.

STOCK, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dominance in cattle: relatoship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. **Endocrinology**, v.132, p.1108–1116, 1993.

TORRES-JÚNIOR, J. et al. Considerações técnicas e econômicas sobre reprodução assistida em gado de corte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.1, p.53–58, 2009.

UILENBROEK, J.Th.J.; RICHARDS, J.S. Ovarian Follicular Development during the Rat Estrous Cycle: Gonadotropin Receptors and Follicular Responsiveness. **Biology of reproduction**, v.20, p.1159–1165,1979.

VALLE, E.R.do. **O ciclo estral de bovinos e métodos de controle.** Campo Grande : EMBRAPA-CNPGC, 1991. 24p. (EMBRAPA-CNPGC. Documentos, 48).

VAN EERDENBURG, F.J.C.M. et al. The relationship between estrous behavioral score and time of ovulation in dairy cattle. **Journal of Dairy Science,** v.58, p.1150–1156, 2002.

VERDUZCO, A. et al. Average response to estrus and timing of ovulation in Bos indicus cattle synchronized alternatively with a synthetic progestagen**. Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.5, n.11, p.924–929, 2006.

VYNCKIER, L. et al. Plasma estradiol- 17ß concentrations in the cow during induced estrus and after injection of estradiol- 17ß benzoate and estradiol- 17ß cypionate - a preliminary study. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v.13, p.36–42, 1990.

WALKER, S.L. et al. Chronic stress, hormone profiles and estrus intensity in dairy cattle. **Hormones and Behavior**, v.53, p.493–501, 2008.

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

WILTBANK, M.C. et al. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, v.65, n.1, p.17–29, 2006.

WILTBANK, M.C.; PURSLEY, J.R. The cow as an induced ovulator: Timed AI after synchronization of ovulation. **Theriogenology**, v.81, p.170–185, 2014.

UDESC UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA | LAGES CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização da emergência de nova folicular em vacas submetidas a protocolo baseado em progesterona e 17? estradiol", protocolada sob o CEUA nº 6129060218 (ID 000530), sob a responsabilidade de **Rogério Ferreira** *e equipe; Diego Junior Bergamin* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) na reunião de 07/03/2018.

We certify that the proposal "Follicular wave emergence on progesterone and 17? estradiol -treated cows", utilizing 10 Bovines (10 females), protocol number CEUA 6129060218 (ID 000530), under the responsibility of **Rogério Ferreira** *and team; Diego Junior Bergamin* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of Santa Catarina State (CEUA/UDESC) in the meeting of 03/07/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 01/2018 a 05/2018 Área: Zootecnia

Origem:	Animais de proprietários						
Espécie:	Bovinos	sexo:	Fêmeas	idade:	2 a 6 anos	N:	10
Linhagem:	Holandês			Peso:	600 a 700 kg		

Local do experimento: Propriedade comercial em Chapecó.

Lages, 30 de novembro de 2018

Marcia Regina Pfuetzenreiter
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina

Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina