

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

Relação entre o diâmetro folicular, momento da ovulação e taxa de prenhez de bovinos submetidos a protocolo de IATF convencional ou em blocos

Bruna Mion

Pelotas, 2018

Bruna Mion

Relação entre o diâmetro folicular, momento da ovulação e taxa de prenhez de bovinos submetidos a protocolo de IATF convencional ou em blocos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Augusto Schneider

Coorientadores: Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro

Jorgea Pradiée

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M669r Mion, Bruna

Relação entre o diâmetro folicular, momento da ovulação e taxa de prenhez de bovinos submetidos a protocolo de IATF convencional ou em blocos / Bruna Mion ; Augusto Schneider, orientador ; Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro, Jorgea Pradiee, coorientadores. — Pelotas, 2018.

53 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Diâmetro folicular. 2. Inseminação artificial. 3. IATF em blocos. 4. Momento da ovulação. 5. Volume corpo lúteo. I. Schneider, Augusto, orient. II. Pegoraro, Lígia Margareth Cantarelli, coorient. III. Pradiee, Jorgea, coorient. IV. Título.

CDD : 636.2

Bruna Mion

Relação entre o diâmetro folicular, momento da ovulação e taxa de prenhez de bovinos submetidos a protocolo de IATF convencional ou em blocos

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 23/02/2018

Banca examinadora:

Prof. Dr. Augusto Schneider (Orientador)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Arnaldo Diniz Vieira
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Cássio Cassal Brauner
Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Luiz Francisco Machado Pfeifer
Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico esse trabalho aos meus pais, irmã e noivo.

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais e irmã pelo amor, apoio incondicional e por serem incentivadores na realização do mestrado. Gostaria de agradecer ao Pablo, por ser sempre o meu melhor amigo, pelo companheirismo e compreensão nos momentos de nervosismo.

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Augusto Schneider, por sempre estar presente (mesmo quando fora do país), por sempre incentivar as novas ideias e por todo auxílio prestado nesses dois anos.

Gostaria de agradecer as minhas coorientadoras, Lígia Pegoraro e Jorgea Pradiee, por serem exemplo de retidão, pela compreensão e paciência dedicadas a mim e por sempre me orientarem e aconselharem nos caminhos a serem tomados.

À Patrícia Gindri e ao Giovani Vieira, pela amizade, companheirismo e por sempre estarem presentes na realização dos experimentos, nas horas boas e ruins (literalmente), permitindo que esse trabalho fosse possível.

Aos colaboradores do Laboratório de Reprodução da Embrapa: Joao, Monique, Janaína, Letícia, Pamela, Diego, Mathias, Ronaldo, Caren, Jéssica, pelas conversas, mates e por serem mais que colegas de trabalho, amigos.

Ao CAVG e Embrapa, por permitirem a realização do trabalho nas suas dependências, disponibilizando as instalações, animais e recursos humanos que foram indispensáveis na realização dos experimentos. À Ana Bonotto, ao Felipe Pappen e ao Lucas Hax pela colaboração e compreensão.

Às vacas, fonte dos resultados presentes nesse estudo e de aprendizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos.

À todos que de alguma forma auxiliaram no desenvolvimento do meu mestrado e no amadurecimento profissional adquirido durante esse período.

Muito obrigada!

“O segredo da existência não consiste somente em viver, mas em saber para que se vive”.
Fiódor Mikhailovitch Dostoiévski

Resumo

MION, Bruna. **Relação entre o diâmetro folicular, momento da ovulação e taxa de prenhez de bovinos submetidos a protocolo de IATF convencional ou em blocos.** 2018. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

O objetivo do estudo 1 foi avaliar a relação do diâmetro folicular (DF) e momento da ovulação em fêmeas *Bos taurus*. Dados de 138 fêmeas bovinas de 4 protocolos de sincronização foram utilizados. Os animais receberam dispositivo intravaginal de progesterona (P4) e 2 mg de Benzoato de Estradiol (BE) no D0. No D8, a P4 foi retirada e as fêmeas foram divididas aleatoriamente em 4 grupos: Cipionato de Estradiol (ECP; n=76), administrado na retirada da P4; BE (n=19), administrado 24 horas após; GnRH (n=28), administrado 60 horas após; ou Controle (n=15). Foram realizadas avaliações ultrassonográficas de 12 em 12 horas a partir do D8 para a mensuração do DF e detecção da ovulação. No grupo ECP, vacas com maior DF, apresentam ovulação mais precoce ($R^2=0,96$, $P<0,0001$). O estudo 2 foi realizado para avaliar relação do DF, volume do corpo lúteo (CL) e prenhez. Foi realizada inseminação artificial (IA) em 30 fêmeas leiteiras do grupo ECP do estudo 1 e em 83 fêmeas de corte sincronizadas conforme descrito no grupo BE. Dados de avaliações ultrassonográficas no momento da IA, 7 e 30 dias após a IA foram utilizados. Vacas com DF >14 mm apresentaram maior prenhez/IA (P/IA) do que vacas com DF <10mm ou < 11mm (leite e corte, respectivamente; $P<0,05$). O DF foi correlacionado com o volume do CL ($R^2=0,71$) e maiores CLs apresentaram maior P/IA ($P<0,05$). O objetivo do estudo 3 foi avaliar as concentrações séricas de E2 e P4 nos animais do grupo ECP. Avaliações séricas de 14 animais do Estudo 1 foram utilizadas nessa avaliação. Vacas com maiores DF apresentaram maior concentração de P4 no momento da ovulação. O objetivo do Experimento 2 foi avaliar se a alteração do momento da IA de acordo com o DF aumenta a P/IA de bovinos. Foram utilizadas 65 fêmeas leiteiras e 90 de corte sincronizadas conforme descrito para o grupo ECP. Fêmeas de corte receberam 350 UI de eCG no D8. Avaliação ultrassonográfica foi realizada no momento da IA e as fêmeas foram divididas de acordo com o DF em dois grupos ($\leq 10,4$ mm ou $\geq 10,5$ mm) e após divididas aleatoriamente em grupo controle (IATF convencional) e bloco 1 ($\geq 10,5$ mm): IA 48 horas após remoção da P4; ou bloco 2 ($\leq 10,4$ mm): IA 65 horas após remoção da P4). Não houve diferença na P/IA das fêmeas submetidas a IATF convencional ou em blocos. A menor taxa de prenhez encontrada nas fêmeas com menores folículos possivelmente não foi atribuída a assincronia entre momento da IA e ovulação.

Palavras-chave: Diâmetro folicular; inseminação artificial; IATF em Blocos; momento da ovulação; volume corpo lúteo.

Abstract

MION, Bruna. **Relationship between follicular size, ovulation time and pregnancy rate of cattle submitted to conventional or in block FTAI.** 2018. 53f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

The aim of study 1 was to evaluate the relationship between follicular size (FS) and moment of ovulation in *Bos taurus* cows. Data of 138 cows from 4 protocol of estrus synchronization were used. Cows received an intravaginal progesterone-releasing device plus 2 mg of Estradiol Benzoate (EB) on D0. On D8, device was removed and cows were randomized in four groups: Estradiol cypionate (ECP, n=76), administrated 48 hours after device removal; EB (n=19) administrated after 24 hours; GnRH (n=28) administrated after 60 hours; or Control (no inductor; n=15). Ultrasonography evaluations were performed each 12 hours after device removal to measure FS and to detect ovulation. In ECP group, cows with larger FS had earlier ovulation ($R^2=0.96$, $P<0.0001$). The study 2 was performed to evaluate the relationship between FS, luteal size and pregnancy rate. Artificial insemination (AI) was performed in 30 dairy cows of ECP group on study 1 and 83 beef cows synchronized as described for EB group. Data of ultrasonography evaluations at AI and 7 and 30 days after AI were used. Cows with FS > 14 mm demonstrated higher pregnancy per AI (P/IA) than cows with FS <10 mm or < 11 mm (dairy and beef cows, respectively; $P<0.05$). The FS was correlated to luteal size ($R^2=0.71$) and cows with larger corpus luteum had higher P/AI ($P<0.05$). The aim of study 3 was to evaluate serum estradiol and progesterone concentrations. Serum samples of 14 cows from Study 1 were used. Cows with larger LS had lower serum progesterone at ovulation. The aim of Experiment 2 was to evaluate whether changing AI time according FS would improve P/AI. Dairy (n=65) and beef cows (n=90) were synchronized as described for ECP group. Beef cows received 350 IU of eCG on D8. Ultrasonography evaluation was performed at AI and cows were divided according FS in two groups (≤ 10.4 mm or ≥ 10.5 mm) and after randomized in control group (Conventional FTAI), Block 1 (≥ 10.5 mm): AI 48 hours after device removal; or Block 2 (≤ 10.4 mm): AI 65 hours after device removal. No differences were observed between Conventional and blocks FTAI. Lower pregnancy rate observed in cows with smaller follicles possibly was not attributed with asynchrony between AI and moment of ovulation.

Keywords: Artificial insemination; corpus luteum size; FTAI in Blocks; follicular size; ovulation time.

Lista de Figuras

Figura 1	Desenho experimental utilizado nas fêmeas do Experimento 1.....	23
Figura 2	Desenho experimental utilizado nas fêmeas do Experimento 2.....	26
Figura 3	Distribuição das ovulações de acordo com o indutor de ovulação utilizado.....	29
Figura 4	Momento da ovulação depois de protocolo de sincronização de estro de acordo com o diâmetro do folículo pré-ovulatório dos grupos controle, ECP, BE e GnRH.....	30
Figura 5	Crescimento folicular após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona de acordo com o tamanho do folículo ovulatório cujo indutor de ovulação foi o ECP.....	31
Figura 6	Relação entre o diâmetro folicular e o volume do corpo lúteo formado após a ovulação.....	33

Lista de Tabelas

Tabela 1	Descrição da divisão dos grupos utilizadas no estudo 1 do Experimento 1.....	22
Tabela 2	Diâmetro ovulatório, momento da ovulação e taxa ovulatória de acordo com o grupo com ou sem indutor de ovulação	28
Tabela 3	Momento ideal da IA de acordo com o diâmetro folicular das vacas submetidas a protocolo de IATF com ECP como indutor de ovulação.....	31
Tabela 4	Concentração sérica de estradiol e progesterona, de acordo com o grupo, no momento da retirada do dispositivo, momento da ovulação e sete dias após a ovulação de acordo com os diferentes diâmetros foliculares.....	32
Tabela 5	Relação entre o diâmetro folicular a taxa de prenhez, de acordo com a aptidão, de bovinos submetidos a protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo.....	32
Tabela 6	Crescimento folicular entre 0 e 48 horas após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona de cada categoria de folículos, de acordo com a aptidão.....	33
Tabela 7	Relação do volume do corpo lúteo formado após a ovulação e a taxa de prenhez de bovinos submetidos a Inseminação Artificial em Tempo Fixo cujo indutor de ovulação foi o ECP.....	34
Tabela 8	Relação da taxa de prenhez de acordo com o momento da inseminação e o tamanho do folículo dominante em vacas leiteiras.....	34
Tabela 9	Relação da taxa de prenhez de acordo com o momento da inseminação e o tamanho do folículo dominante em vacas de corte.....	34

Tabela 10	Crescimento folicular entre 0 e 48 horas após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona de cada grupo de acordo com a aptidão.....	35
-----------	---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

A	Área
BE	Benzoato de Estradiol
C	Circunferência
CAVG	Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça
CL	Corpo Lúteo
E2	Estradiol
ECC	Escore de Condição Corporal
eCG	Gonadotrofina Coriônica Equina
ECP	Cipionato de Estradiol
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
g	Gramas
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
IGF-I	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IM	Intramuscular
LH	Hormônio Luteinizante
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
P/IA	Prenhez/Inseminação Artificial
P4	Progesterona
PGF	Prostaglandina F2 α
R	Raio
Rpm	Rotação por minuto
SISPEL	Sistema de Pesquisa e Desenvolvimento em Pecuária Leiteira
V	Volume

Sumário

1 Introdução.....	13
2 Objetivos.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 Metodologia.....	20
3.1 Experimento 1.....	20
3.1.1 Estudo 1.....	20
3.1.2 Estudo 2.....	24
3.1.3 Estudo 3.....	24
3.2 Experimento 2.....	25
3.3 Análise estatística.....	26
4 Resultados.....	28
4.1 Relação entre o diâmetro ovulatório e o momento da ovulação.....	28
4.2 Relação entre o diâmetro folicular, volume do corpo lúteo e a taxa de prenhez.....	32
4.3 Avaliação da alteração do momento da IA de acordo com o diâmetro do folículo dominante.....	34
5 Discussão.....	36
5.1 Relação entre o diâmetro folicular e momento da ovulação de bovinos submetidos à IATF.....	36
5.2 Relação entre o diâmetro folicular, tamanho do CL e a taxa de prenhez de bovinos submetidos à IATF.....	38
5.3 Avaliação da alteração do momento da IA de acordo com o diâmetro do folículo dominante em bovinos submetidos à IATF.....	40
6 Considerações finais.....	42
Referências bibliográficas.....	43
Anexos.....	52

1 Introdução

A IA em bovinos é uma biotécnica reprodutiva que facilita a disseminação do potencial genético no rebanho (VISHWANATH, 2003). Os avanços no entendimento da dinâmica do ciclo estral bovino permitiram o desenvolvimento de protocolos hormonais que manipulam o ciclo e controlam o momento da ovulação (BÓ et al., 1994; PURSLEY et al., 1995). Dessa forma, facilitando o uso da IA (XU & BURTON, 1999) e aumentando a eficiência reprodutiva dos rebanhos (SÁ FILHO et al., 2010a). Assim a IATF é utilizada para manejo reprodutivo em várias partes do mundo (PEREIRA et al., 2014) por sua habilidade em aumentar o número de fêmeas inseminadas sem a necessidade de detecção de estro (CAVALIERI et al., 2004; SÁ FILHO et al., 2011), minimizando tempo e custos com mão-de-obra.

Atualmente, o mercado de IATF no Brasil tem movimentado aproximadamente R\$ 567 milhões/ano, com uma média de 3.500 veterinários envolvidos com essa atividade (BARUSELLI et al., 2017). Esse montante é decorrente do aumento do uso dessa biotécnica nos rebanhos brasileiros. Em 2002, somente 5-6% das novilhas e vacas eram inseminadas artificialmente no Brasil, representando aproximadamente 7 milhões de IAs e destas, apenas 1% foram realizadas através do uso de protocolos de IATF (SARTORI et al., 2016a). Todavia, em 2015, o uso da IA aumentou consideravelmente, sendo realizada em 13 milhões de fêmeas, das quais 77% foram submetidas a protocolos de IATF (SARTORI et al., 2016a). Estudos mais recentes (BARUSELLI et al., 2017) demonstraram que no ano de 2016, 11 milhões de animais foram inseminados através de protocolos de IATF, representando 85% de todas as IAs realizadas no Brasil.

O aumento da utilização da IATF no Brasil deve-se ao fato dessa biotécnica aumentar a eficiência reprodutiva (SÁ FILHO et al., 2010a). Além disso, nos rebanhos de corte, os protocolos de sincronização têm o potencial de reduzir as estações de monta e parição, resultando em maior uniformidade de bezerras (ODDE, 1990). Enquanto que em rebanhos leiteiros, a IATF auxilia no controle da primeira IA pós-parto, além de minimizar os efeitos limitantes da

baixa eficiência da detecção de estro (TENHAGEN et al., 2004). Esses resultados são alcançados pela capacidade dos protocolos hormonais em sincronizar a emergência de uma nova onda folicular, controlar a função folicular e luteal e sincronizar o momento da ovulação (BÓ et al., 2002).

Nos bovinos, a emergência folicular é caracterizada por dois estágios: o primeiro independente de gonadotrofinas e o segundo dependente de gonadotrofinas, caracterizado por aumento nas concentrações circulantes de FSH e surgimento de um pool de 5 a 20 folículos de diâmetro ≥ 5 mm (FORDE et al., 2011). Após o recrutamento dos folículos ocorre a seleção folicular, caracterizada pela redução do número dos folículos recrutados e posteriormente, ocorre a fase de dominância folicular, em que ocorre o desenvolvimento do folículo selecionado (KOJIMA, 2003). A liberação de FSH da hipófise anterior é suprimida através do mecanismo de feedback negativo do E2 e o folículo passa a aumentar a responsividade ao LH (GINTHER et al., 2000). A fase folicular possui duração de 4-6 dias e é caracterizada pelo período entre a luteólise e ovulação (FORDE et al., 2011). Essa fase é caracterizada por diminuição na concentração circulante de P4, em resposta à regressão do corpo lúteo, e aumento nas concentrações circulantes de E2, derivado da rápida proliferação do folículo pré-ovulatório. Essa variação hormonal induz a onda de GnRH e o pico de LH, essenciais para a ocorrência da ovulação, e permite a demonstração do comportamento estral durante a receptividade sexual (FORDE et al., 2011). A fase luteal inicia após a ovulação e tem duração de 14-18 dias (FORDE et al., 2011). Essa fase é caracterizada pela presença de CL, originado através da luteinização das células do folículo (FORDE et al., 2011). A função do CL é produzir P4, que prepara o endométrio para o início da gestação (KOJIMA, 2003). Se após aproximadamente 16 dias, o reconhecimento materno da gestação não ocorreu, por ausência de fecundação ou mortalidade embrionária precoce, PGF é secretada e o CL sofre luteólise (FORDE et al., 2011).

Existem basicamente dois tipos de protocolos utilizados para controlar o ciclo estral bovino: baseados em GnRH e baseados em estradiol E2 e P4. Os protocolos baseados em GnRH iniciaram com o protocolo Ovsynch, no qual realiza-se a administração de GnRH no dia 0, prostaglandina F2 α (PGF) no dia 7 e GnRH no dia 9 (PURSLEY et al., 1995). O objetivo do primeiro GnRH é promover a ovulação de um folículo maior do que 10 mm e induzir a formação de uma nova onda folicular (PURSLEY et al., 1995). Se a ovulação ocorre, em 5 dias o corpo lúteo (CL) formado

estará funcional e responsivo a PGF. O segundo GnRH é responsável por sincronizar a ovulação, que ocorre entre 24 e 32 horas após a administração do hormônio (PURSLEY et al., 1995). Esses protocolos tendem a ser mais utilizados na América do Norte, Europa e Nova Zelândia, locais onde não é permitida a utilização de E2 (BÓ et al., 2016).

Na América do Sul, os principais protocolos utilizados são aqueles baseados em E2 e P4. Esses protocolos normalmente iniciam com a administração de BE no dia 0 e com a inserção de um dispositivo intravaginal liberador de P4 (BÓ et al., 1995). Após 24 horas da administração de BE e P4, as concentrações de FSH são suprimidas (CIPRIANO et al., 2011), resultando na emergência de uma nova onda em 3,9 dias (SOUZA et al., 2009). A duração do tratamento com P4 varia entre 5 e 9 dias e a PGF é administrada na retirada do dispositivo. Entre 24 e 72 horas após, realiza-se tratamento com LH, GnRH ou E2 para induzir a ovulação (MAPLETOFT et al., 2003). O momento da IA é dependente do agente ovulatório utilizado, pois o pico de LH ocorre após 2 horas quando é realizada a administração de GnRH (CHENAULT et al., 1990), 20 horas após a aplicação de BE e 50 horas após a administração de Cipionato de Estradiol (ECP) (SALES et al., 2012). Dessa forma, a IA é realizada no momento da administração do GnRH, 24 horas após a administração de BE ou 48 horas após a administração de ECP (SÁ FILHO et al., 2011). No entanto, a resposta a cada indutor é variada e depende também de outros fatores, como o tamanho do folículo ovariano no momento da retirada do dispositivo de P4 e da eficiência da PGF em promover a luteólise.

Os protocolos baseados em E2 e P4 são capazes de induzir a emergência da onda folicular independentemente da fase do ciclo em que a fêmea se encontra no início do protocolo (MONTEIRO JR et al., 2015), sendo uma vantagem em relação aos protocolos baseados em GnRH. Além disso, apresentam menor taxa de perda de prenhez entre 32-60 dias em relação a protocolos a base de GnRH (VASCONCELOS et al., 2013). Existe uma variação do protocolo normalmente realizada em fêmeas em anestro pós-parto e/ou com baixa condição corporal (BÓ et al., 2013) que é a de eCG no momento da retirada da P4. O maior efeito da administração de eCG é a estimulação do crescimento do folículo dominante e, conseqüentemente, o aumento da taxa ovulatória (SÁ FILHO et al., 2010b) e da taxa de prenhez (TORTORELLA et al., 2013).

O sucesso desses protocolos depende da correta manipulação dos processos fisiológicos, como o recrutamento de uma nova onda folicular, controle da dominância folicular (CERRI et al., 2009), duração do proestro (BRIDGES et al., 2008) e intervalo entre a indução da ovulação e a IA (PURSLEY et al., 1995). Embora os resultados obtidos atualmente sejam mais consistentes do que quando os protocolos foram desenvolvidos, a média de prenhez/IA (P/IA) permanece em torno de 50% (BÓ et al., 2016). A falha em atingir melhores resultados pode ser causa pela diferença do tamanho do folículo no momento da IA entre as vacas sincronizadas pelo protocolo (BÓ et al., 2003). O diâmetro folicular pode ser considerado um indicador da capacidade funcional do folículo (VAN EERDENBURG et al., 2002) e está relacionado com a maturidade folicular (PERRY et al., 2007), a taxa ovulatória (SÁ FILHO et al., 2010a), a taxa de concepção e P/IA (SÁ FILHO et al., 2010a; VASCONCELOS et al., 2001). A porcentagem de fêmeas que ovulam quando o folículo possui > 10 mm de diâmetro é de 90%, contudo a porcentagem cai para 33% quando o folículo possui entre 7-8,4 mm (GIMENES et al., 2008). Além disso, o tamanho do folículo está relacionado com a concentração de E2 no momento da IA, em que folículos maiores produzem maior quantidade desse hormônio e isso afeta positivamente a taxa de prenhez na IATF (LOPES et al., 2007).

A produção de estradiol ocorre através das células da granulosa e da teca, através da estimulação de FSH e LH (FORDE et al., 2011). A ligação de LH às células da teca coordena a conversão do colesterol em testosterona, através de uma série de reações catalíticas (FORDE et al., 2011). Durante a fase folicular, o aumento das concentrações circulantes de FSH leva a aumento na atividade da enzima aromatase nas células da granulosa (FORDE et al., 2011). O colesterol produzido pelas células da teca é convertido em estrógenos nas células da granulosa, através da aromatase (FORDE et al., 2011). Após o pico de LH, as células da granulosa diferenciam-se em células luteais grandes, tendo diminuída sua proliferação a partir do início do processo de diferenciação (MEIDAN et al., 1990), não havendo aumento da quantidade de células luteais durante a fase luteal (FARIN et al., 1986). Folículos menores possuem menores quantidades de células da granulosa e geram um CL subfuncional (MURDOCH & VAN KIRK, 1998). Dessa forma, o diâmetro folicular está relacionado com o tamanho do CL formado após a ovulação (DADARWAL et al., 2013; PFEIFER et al., 2009). Além disso, o tamanho

do CL formado está diretamente relacionado com a produção de P4 após a IA (DADARWAL et al., 2013; PFEIFER et al., 2009), o que afeta positivamente a probabilidade de concepção (VASCONCELOS et al., 2001).

Alguns fatores estão relacionados com o diâmetro do folículo dominante. Menor disponibilidade de nutrientes, caracterizada pela diminuição do ECC ou pelo balanço energético negativo, resulta em menor crescimento do folículo ovariano (BEAM & BUTLER, 1999; RHODES et al., 1995). O aumento na concentração de energia na alimentação fornecida resulta em maior crescimento folicular (ARMSTRONG et al., 2001). Esse efeito pode ser causado pela variação nas concentrações circulantes de insulina e IGF-I durante o período de menor disponibilidade de nutrientes (ARMSTRONG et al., 2001). Além disso, a concentração de hormônios esteroides durante o crescimento folicular também influenciam o diâmetro ovulatório. Menores concentrações de P4 resultam em maior pulsatilidade de LH e, conseqüentemente, em maior crescimento folicular (PFEIFER et al., 2009). A indução da ovulação através de protocolos de sincronização hormonal resulta em ovulação de folículos com menor diâmetro (MOHKTARI et al., 2016) e o indutor de ovulação escolhido também pode ter efeito sobre essa variável. A utilização de GnRH como indutor de ovulação em protocolos de IATF é relacionada com maior diâmetro folicular (SÁ FILHO et al., 2011). Além disso, fatores ambientais também podem estar relacionados com o diâmetro do folículo. Aumento nos índices de umidade e temperatura resultam em menor diâmetro folicular, possivelmente pelo estresse térmico (SCHULLER et al., 2017).

Um dos efeitos mais importantes do diâmetro do folículo dominante nos protocolos de IATF é sua influência no momento da ovulação. As vacas com folículos menores no momento da IATF ovulam mais tarde do que as vacas com folículos maiores (PFEIFER et al., 2015). O tempo de ovulação médio de vacas submetidas a protocolo de IATF com ECP como indutor de ovulação é aproximadamente 66 horas após a retirada do dispositivo intravaginal de P4 (USLENGHI et al., 2014). Contudo há trabalhos que mostram uma variação muito grande de acordo com o diâmetro: vacas com folículos de 15 mm ovulam após aproximadamente 26 horas da sua detecção, enquanto que as vacas com folículos de 8 mm ovulam após 96 horas (PFEIFER et al., 2015). Como nos protocolos de IATF o momento da IA é fixo para todas as fêmeas, pode ocorrer uma assincronia entre a IA e a ovulação em algumas fêmeas. Se a IA é realizada muito antes do

momento da ovulação, os espermatozoides permanecem um período prolongado no trato reprodutivo feminino até a fecundação. Esse período prolongado leva a danos ao DNA do espermatozoide e, apesar de não afetar a taxa de fecundação, afeta o desenvolvimento embrionário inicial (ROELOFS et al., 2006). Se a IA for realizada muito perto do momento da ovulação, as taxas de concepção podem ser comprometidas, já que são necessárias oito horas para o espermatozoide completar o processo de capacitação e atingir o oviduto (HUNTER & WILMUT, 1983). Além disso, um prolongado período entre a ovulação e a fecundação resulta em danos ao ócito, como instabilidade do núcleo e das organelas citoplasmáticas, diminuindo a taxa de fecundação e a qualidade do embrião (ROELOFS et al., 2006).

O ideal é a realização da IA entre 12 e 24 horas antes da ovulação (ROELOFS et al., 2006) e essa variação existente no momento da ovulação entre as vacas prejudica a escolha do melhor momento para a IA. A decisão do momento da IA baseado no diâmetro folicular resulta em melhorias na taxa de prenhez em vacas *Bos indicus*. Nesse protocolo (IATF em Blocos), as vacas com folículos menores, por apresentarem ovulação mais tardia, são inseminadas em um intervalo maior de tempo em relação às vacas de folículos grandes, que apresentam ovulação mais precoce (PFEIFER et al., 2015). Contudo, essa metodologia não pode ser completamente extrapolada para fêmeas *Bos taurus*, já que os animais zebuínos apresentam diferenças na fisiologia reprodutiva quando comparados aos taurinos. Fêmeas zebuínas possuem maior contagem de folículos antrais e maior concentração circulante de hormônio anti-mülleriano (BALDRIGHI et al., 2014). As concentrações circulantes de insulina e IGF-I são maiores nas fêmeas zebuínas (ALVAREZ et al., 2000), refletindo em maiores concentrações circulantes de E2 e P4 (SARTORI et al., 2016b). Maior concentração de P4 durante o crescimento folicular é associada com menor secreção de LH e, conseqüentemente, menor crescimento do folículo ovulatório (PFEIFER et al., 2009). Dessa forma, fêmeas zebuínas apresentam menor diâmetro folicular ovulatório e menor CL no ciclo subsequente (SARTORI et al., 2016b). Além disso, os folículos ovarianos de fêmeas zebuínas adquirem capacidade ovulatória com um diâmetro inferior em relação as fêmeas taurinas (GIMENES et al., 2008; SARTORI et al., 2001). Essas diferenças fisiológicas podem estar relacionadas com diferentes momentos da ovulação entre fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus*, tornando necessário realizar mais estudos para

esclarecer o efeito do diâmetro folicular sobre o momento da ovulação e adequar o protocolo de IATF em blocos para fêmeas de origem taurina.

A hipótese desse estudo é que, similar ao encontrado em fêmeas zebuínas, a alteração do momento da IA de acordo com o diâmetro folicular pode aumentar a taxa de prenhez em fêmeas taurinas.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a relação entre o diâmetro folicular e a taxa de prenhez de fêmeas bovinas (*Bos taurus*) submetidos a IATF convencional ou em blocos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a relação entre o diâmetro folicular e o momento da ovulação em fêmeas bovinas (*Bos taurus*) submetidas a protocolo de IATF.
- Avaliar a relação entre o diâmetro do folículo dominante e o volume do corpo lúteo com a taxa de prenhez de fêmeas bovinas (*Bos taurus*) submetidas a protocolos de IATF.
- Avaliar se a alteração do momento da IA de acordo com o diâmetro do folículo dominante (IATF em blocos) aumenta a taxa de prenhez em fêmeas bovinas (*Bos taurus*).

3 Metodologia

Os experimentos conduzidos foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade Federal de Pelotas sob o número de protocolo 5324-2017 (Anexo 1). O estudo foi dividido em dois experimentos: o Experimento 1 foi realizado para determinar a relação entre diâmetro folicular, níveis hormonais e momento da ovulação; e o Experimento 2 foi realizado para avaliar a relação do diâmetro folicular, volume do corpo lúteo e taxa de prenhez e o efeito da alteração do momento da IA de acordo com o diâmetro folicular sobre o resultado de protocolos de IATF.

3.1 Experimento 1

3.1.1 Estudo 1

Dados de quatro protocolos de sincronização foram utilizados no Estudo 1. Os protocolos foram realizados em 138 fêmeas bovinas não lactantes das raças Holandês, Jersey e Angus, com escore de condição corporal (ECC) de $3,09 \pm 0,38$. Os animais foram provenientes de duas propriedades: CAVG (Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul Rio-Grandense), no município de Pelotas; e SISPEL (Sistema de Pesquisa e Desenvolvimento em Pecuária Leiteira da Embrapa Clima Temperado, Estação Terras Baixas), no município de Capão do Leão. Treze animais passaram por dois protocolos de sincronização com intervalo de 65 dias, das quais nove pertenciam primeiramente ao grupo GnRH e depois foram alocadas no grupo ECP, e 5 foram sincronizadas com dois protocolos cujo indutor de ovulação foi o ECP. As fêmeas foram alocadas em sistema extensivo de criação, com acesso a campo nativo, pastagem cultivada e água *ad libitum*. A distribuição dos animais de acordo com a raça, localidade e protocolo utilizado está descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Descrição da divisão dos grupos utilizadas no estudo 1 do Experimento 1.

Protocolo	Controle	ECP	BE	GnRH
Nº de animais	15	76	19	28
Raça	Jersey	Holandês, Jersey e Angus	Jersey	Holandês e Jersey
Localidade	SISPEL	CAVG	SISPEL	CAVG e SISPEL

Todas as fêmeas receberam um dispositivo intravaginal de P4 (1 g, Primer®, Agener União, São Paulo/SP) e 2 mg de BE (RIC-BE®, Agener União) por via intramuscular (IM) no dia 0. No dia 8, o dispositivo intravaginal de P4 foi removido e foi administrado 0,150 mg de *d*-Cloprostenol (Prolise®, Agener União) IM. Os animais do grupo ECP receberam 1 mg de ECP (ECP®, Zoetis, NJ, USA) IM, no momento da retirada do dispositivo intravaginal. Os animais do grupo BE receberam 1 mg de BE (RIC-BE®) IM 24 horas após a remoção do dispositivo intravaginal. Os animais do grupo GnRH receberam 0,05 mg de Acetato de Gonadorelina (Gestran Plus®, Agener União) IM 60 horas após a remoção do dispositivo intravaginal. Os animais no grupo Controle não receberam indutor de ovulação. O desenho experimental está descrito na Figura 1.

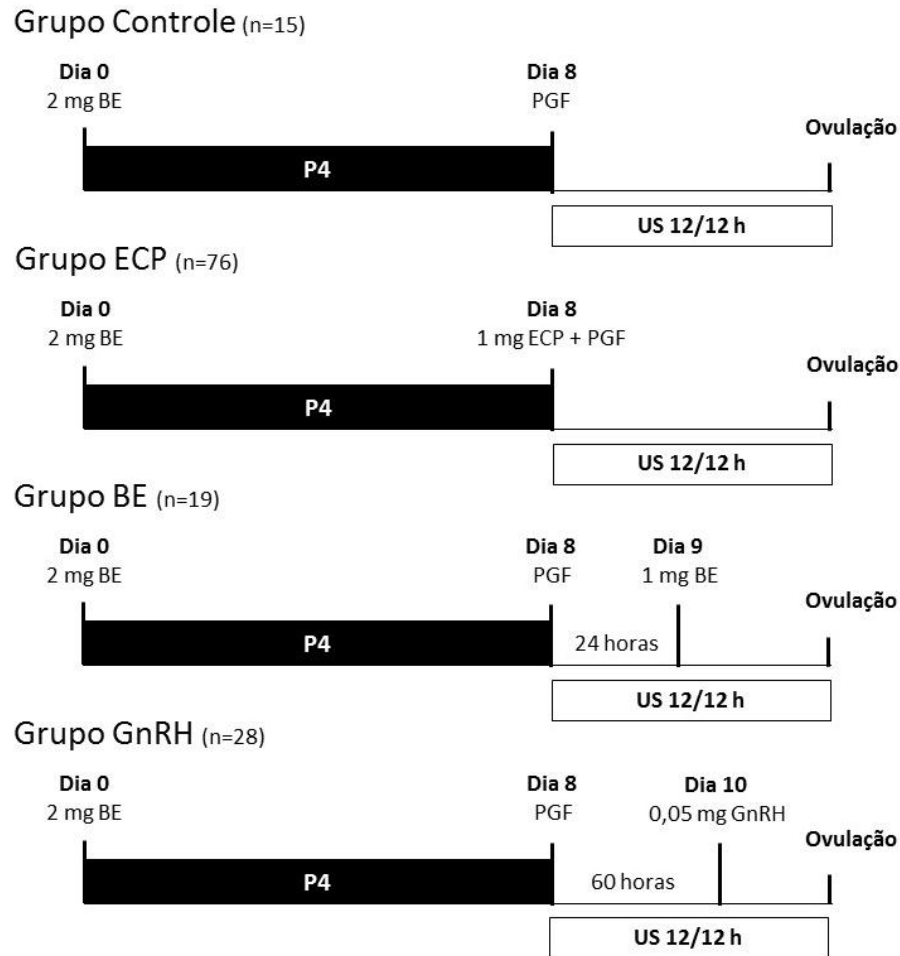


Figura 1 – Desenho experimental utilizado nas fêmeas do Experimento 1. BE: Benzoato de estradiol; ECP: Cipionato de estradiol; GnRH: Acetato de gonadorelina; P4: Dispositivo intravaginal de progesterona; PGF: Prostaglandina; US: Ultrassonografia.

Todos os animais foram avaliados por ultrassonografia a cada 12 horas, a partir da retirada do dispositivo intravaginal, para mensuração do folículo dominante e detecção da ovulação. A ovulação foi definida pelo desaparecimento do folículo dominante identificado nas avaliações anteriores (MARTÍNEZ et al., 2005). Considerou-se o momento da ovulação como o intervalo médio das últimas duas avaliações ultrassonográficas (6 horas). Os resultados relacionados ao diâmetro ovulatório e ao momento da ovulação foram utilizados para o cálculo de momento ideal da IA e desenho experimental do experimento 2.

3.1.2 Estudo 2

Esse estudo foi desenvolvido para avaliação da concentração sérica de E2 e P4 no protocolo de IATF com ECP como indutor de ovulação. Amostras de sangue foram coletadas de um subgrupo de animais utilizados no Estudo 1. As coletas foram realizadas a cada 12 horas a partir da retirada do dispositivo intravaginal de P4 até a ovulação e 7 dias após a ovulação. As coletas foram realizadas através de punção da veia coccígea em tubos Vacutainer®, que foram centrifugados (Centrífuga Presvac 16-RV) a 10.000 rpm por 5 minutos para a separação do soro. O soro foi armazenado em tubos do tipo Eppendorf® em alíquotas de 2 mL, em temperatura de -20°C até avaliação. Foram escolhidas amostras de 14 animais (7 com folículo ≤ 11 mm e 7 com folículo ≥ 11 mm) de três diferentes momentos: retirada do dispositivo intravaginal de P4, no momento da ovulação e 7 dias após a ovulação. As análises foram em laboratório comercial (Laboratório Pasin, Santa Maria/RS) através do método de quimioluminescência.

3.1.3 Estudo 3

O estudo 3 foi desenvolvido para avaliar os fatores que interferem na fertilidade dos protocolos ECP e BE. Nesse estudo, 30 animais do grupo ECP do Estudo 1, além das avaliações descritas, passaram por IA 48 horas após a remoção do dispositivo intravaginal de progesterona, com doses de sêmen comercial com fertilidade conhecida. Esses animais passaram por avaliação ultrassonográfica 7 dias após a ovulação para a mensuração da circunferência e da área do CL formado. Esses dados foram convertidos em volume através da fórmula: $V = \frac{4}{3} \times \pi \times R^3$ (VASCONCELOS et al., 2001), cujo valor de raio (R) foi considerado como a média do R obtido nas seguintes fórmulas: $C = 2\pi R$ e $A = \pi R^2$. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a IA.

Um grupo de 83 fêmeas (ECC: $2,83 \pm 0,24$, das quais 32 vacas não lactantes e 51 novilhas) provenientes de propriedade comercial no município de Capão do Leão passaram por protocolo de sincronização hormonal cujo indutor de ovulação foi o BE, conforme descrito no Estudo 1. As fêmeas foram inseminadas 24 horas após a administração do BE e foram realizadas avaliações ultrassonográficas apenas no

início do protocolo, no momento da retirada do dispositivo intravaginal de P4 e no momento da IA.

Além disso, foram coletadas amostras sangue de 14 animais do grupo ECP do Estudo 1. As coletas foram realizadas a cada 12 horas a partir da retirada do dispositivo intravaginal de P4 até a ovulação e 7 dias após a ovulação. As coletas foram realizadas através de punção da veia coccígea em tubos Vacutainer®, que foram centrifugados (Centrífuga Presvac 16-RV) a 10.000 rpm por 5 minutos para a separação do soro. O soro foi armazenado em tubos do tipo Eppendorf® em alíquotas de 2 mL, em temperatura de -20°C até avaliação. Foram avaliadas concentrações séricas de progesterona e estradiol em laboratório comercial (Laboratório Pasin, Santa Maria/RS) através do método de quimioluminescência (Bossaert et al., 2008).

3.2 Experimento 2

O experimento 2 foi realizado em 62 fêmeas de aptidão leiteira e 90 de corte. As fêmeas de aptidão leiteira foram das raças Holandês e Jersey provenientes de duas propriedades CAVG (n=31, ECC: $2,83 \pm 0,29$, das quais 17 lactantes, seis não-lactantes e oito novilhas) e SISPEL (n=34, ECC: $2,86 \pm 0,29$, das quais 12 lactantes, 15 não-lactantes e sete novilhas). Os animais foram avaliados por ultrassonografia (Aquila pro, Esaote São Paulo/SP, equipado com probe retal 6 MHz) e as fêmeas receberam um dispositivo intravaginal de P4 (1 g, Primer®) e 2 mg de BE (RIC-BE®) IM no dia 0. No dia 8, o dispositivo intravaginal de P4 foi removido e foi administrado 0,150 mg de *d*-Cloprostenol (Prolise®) IM e 1 mg de ECP (ECP®) IM. Os animais de corte foram raça Angus, provenientes de propriedade comercial localizada no município de Santiago/RS (n=90, ECC: $2,90 \pm 0,23$, lactantes com aproximadamente 45 dias pós-parto) receberam um dispositivo intravaginal de P4 (1 g, Sincrogest®, Ouro Fino, Cravinhos/SP) e 2 mg de BE (Sincrodiol®, Ouro Fino) IM no dia 0. No dia 8, o dispositivo intravaginal de P4 foi removido e foi administrado 0,526 mg de Cloprostenol Sódico (Sincrocio®, Ouro Fino) IM, 1 mg de ECP (SincroCP®, Ouro Fino) IM e 350 UI de eCG (SincroECG®, Ouro Fino) IM.

No dia 10, os animais foram avaliados por ultrassonografia e foram divididos de acordo com o diâmetro do folículo dominante em 2 grupos: vacas com folículos ovarianos ≤ 10.4 mm ou vacas com folículos ovarianos ≥ 10.5 mm. O diâmetro

folicular utilizado como critério para a divisão dos grupos foi definido de acordo com os resultados do Experimento 1. Após a divisão de acordo com o diâmetro, as vacas foram aleatoriamente divididas em grupo controle e grupo blocos. As fêmeas do grupo controle e do bloco 1 foram inseminadas 48 horas após a remoção do dispositivo intravaginal de P4 e as fêmeas do bloco 2 foram inseminadas 65 horas após a remoção do dispositivo. A IA foi realizada por quatro profissionais capacitados e foram utilizadas doses de sêmen comercial com fertilidade conhecida. O diagnóstico de gestação foi realizado através de ultrassonografia 30 dias após a inseminação. O desenho experimental está descrito na Figura 2.

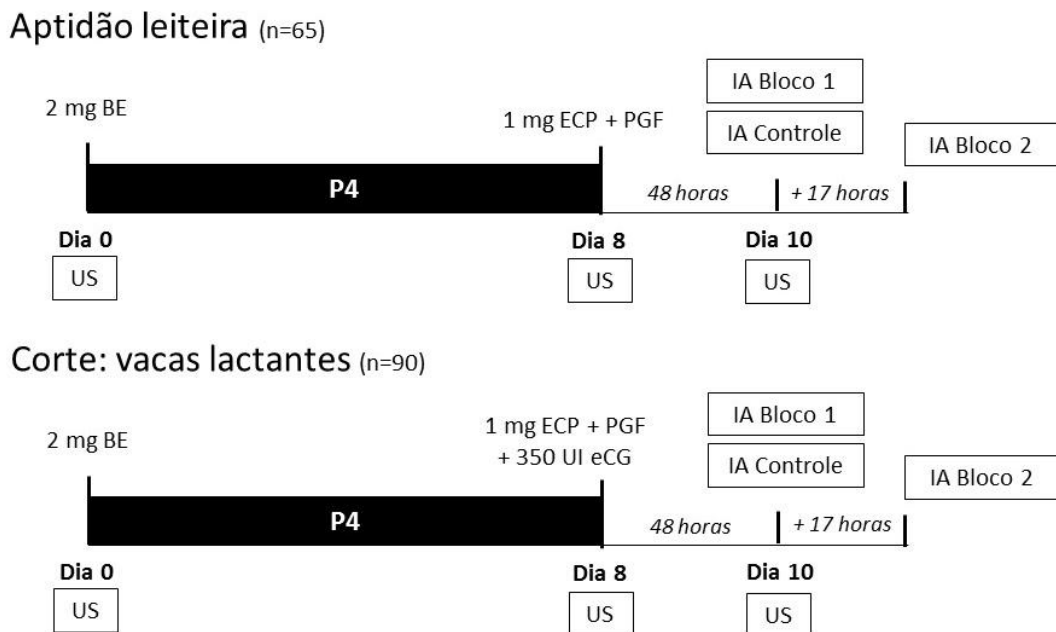


Figura 2 – Desenho experimental utilizado nas fêmeas do Experimento 2. BE: Benzoato de estradiol; ECP: Cipionato de estradiol; IA: Inseminação artificial; P4: Dispositivo Intravaginal de Progesterona; PGF: Prostaglandina; US: Ultrassonografia.

3.3 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através dos softwares GraphPad® 6.01 (GraphPad software, Inc., CA, USA) e SAS 9.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA).

As variáveis de diâmetro folicular, momento da ovulação e crescimento folicular entre 0 e 48 horas após a remoção do dispositivo intravaginal de P4 foram avaliadas através do teste de Shapiro-Wilk, para determinar se os dados tinham

distribuição normal. Para os dados sem distribuição normal, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis para determinar se havia diferença entre os grupos avaliados e, quando significativa, os grupos foram confrontados pelo teste de Mann-Whitney. Para dados com distribuição normal, utilizou-se o teste *One-way* ANOVA para determinar se havia diferença entre os grupos avaliados e, quando significativa, os grupos foram confrontados pelo teste t de Student. As concentrações de E2 e P4 foram avaliadas pelo teste t de Student.

As variáveis categóricas e contínuas (ECC, localidade, raça, categoria, presença de CL no início do protocolo, grupo controle ou indutor de ovulação utilizado) foram incluídas no modelo de regressão logística, cuja variável resposta foi a prenhez. Essas variáveis não apresentaram efeito significativo e foram retiradas do modelo.

A taxa ovulatória, a taxa de prenhez de acordo com os diferentes diâmetros foliculares, a taxa de prenhez de acordo com os diferentes volumes luteais e a taxa de prenhez resultante da IATF convencional ou em blocos foram avaliadas pelo teste de qui-quadrado.

A relação entre o diâmetro folicular e o momento da ovulação e a relação entre o diâmetro folicular e o volume do CL foram avaliadas pelo teste de correlação de Pearson e foi realizada análise de regressão. Primeiramente, foi testada a regressão linear e posteriormente, a regressão quadrática que obteve maior coeficiente de determinação e portanto foi a escolhida. O crescimento folicular ao longo do tempo foi avaliado através do teste de ANOVA para medidas repetidas e médias individuais foram comparadas pelo teste *post-hoc* de Tukey.

4 Resultados

4.1 Relação entre o diâmetro ovulatório e o momento da ovulação

O diâmetro ovulatório das vacas do Estudo 1 não diferiu de acordo com os diferentes indutores de ovulação utilizados, conforme demonstrado na Tabela 2. O grupo ECP e o grupo GnRH apresentaram taxa ovulatória superior ao grupo Controle. O grupo BE apresentou a ovulação mais próxima do momento da retirada do dispositivo intravaginal de P4. O diâmetro folicular 48 horas após a retirada do dispositivo diferiu ($P < 0,05$) entre as vacas que ovularam e aquelas que não ovularam, exceto nas fêmeas do grupo ECP.

Tabela 2 – Diâmetro ovulatório, momento da ovulação e taxa ovulatória de acordo com o grupo com ou sem indutor de ovulação.

Parâmetro	Tratamento			
	Controle	ECP	BE	GnRH
Diâmetro ovulatório (mm)	13,8 ± 2,3	13,0 ± 1,6	13,2 ± 2,7	13,3 ± 1,5
Taxa ovulatória (%)	53,3 (8/15) ^b	85,5 (65/76) ^a	78,9 (15/19) ^{ab}	82,1 (23/28) ^a
Momento da ovulação (h)	76,5 ± 16,3 ^{bc}	71,2 ± 12,9 ^{ab}	66,8 ± 3,1 ^a	78,5 ± 10,5 ^c

^{a, b, c} Valores com letras diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$). Média ± Desvio Padrão. ECP: Cipionato de Estradiol; GnRH: Hormônio Liberador de Gonadotrofinas; BE: Benzoato de Estradiol.

As ovulações ocorreram em um intervalo de 54 horas no grupo ECP, 36 horas no grupo Controle, 24 horas no grupo GnRH e 12 horas no grupo BE, conforme demonstrado na Figura 3.

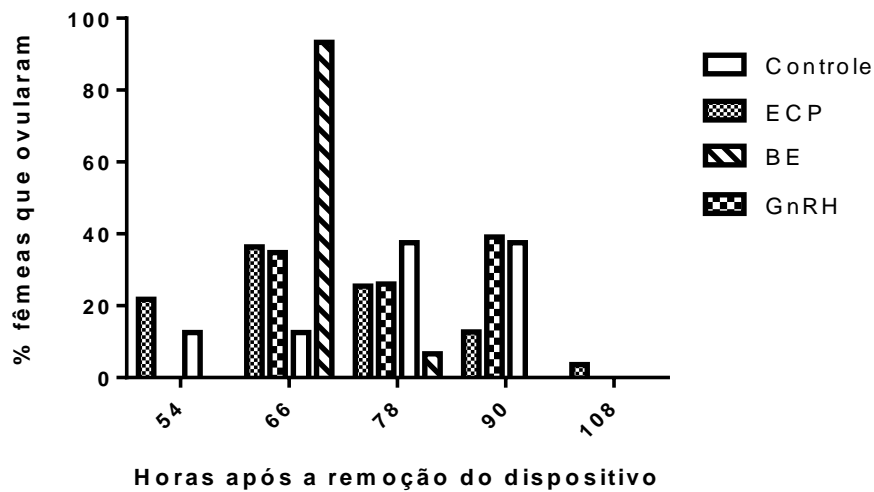


Figura 3 – Distribuição das ovulações de acordo com o indutor de ovulação utilizado. BE: Benzoato de estradiol; ECP: Cipionato de estradiol; GnRH: Acetato de gonadorelina.

O diâmetro folicular foi organizado em categorias e correlacionado com o momento da ovulação. O grupo ECP apresentou correlação ($R^2=0,84$, $P=0,0014$, Figura 4A) entre o momento da ovulação e o diâmetro folicular 48 horas após a remoção do dispositivo intravaginal de P4, sendo que os folículos maiores tiveram ovulação mais precoce do que os folículos menores. Nos grupos Controle, BE, GnRH não houve correlação entre o momento da ovulação e o diâmetro ovulatório ($P>0,05$) (Figura 4B, C, D, respectivamente).

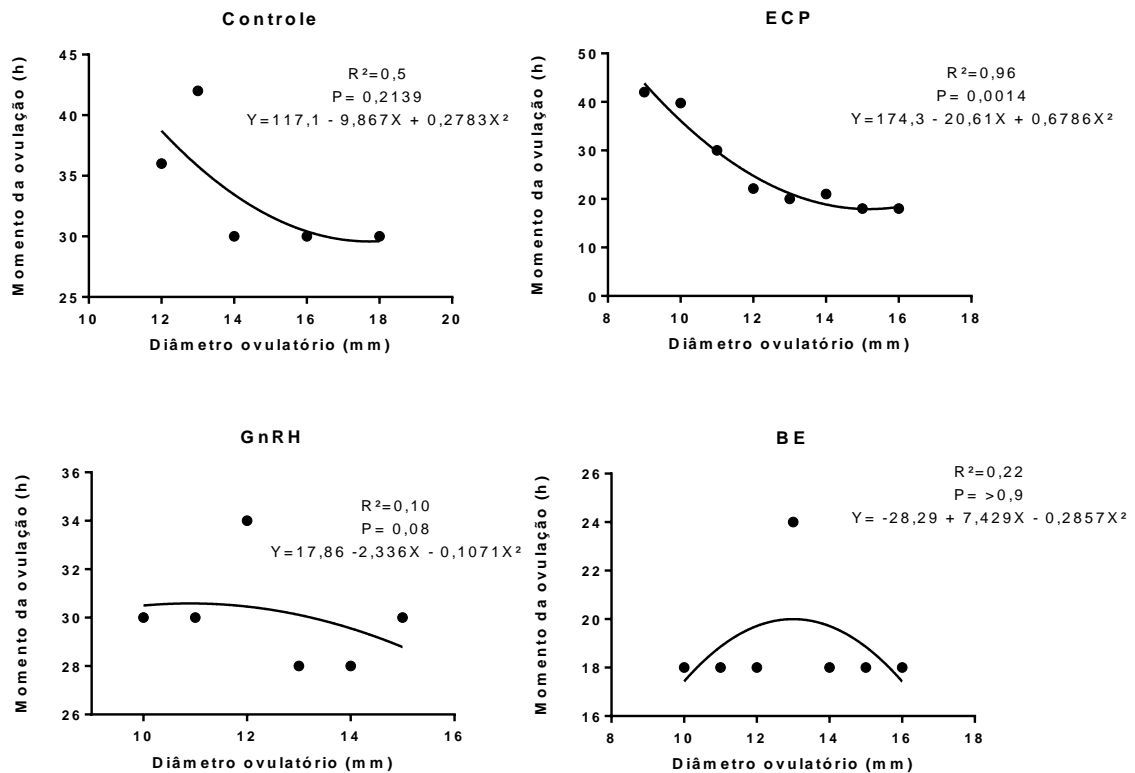


Figura 4 – Momento da ovulação depois de protocolo de sincronização de estro de acordo com o diâmetro do folículo pré-ovulatório dos grupos controle, ECP, BE e GnRH. BE: Benzoato de Estradiol; ECP: Cipionato de Estradiol; GnRH: Hormônio Liberador de Gonadotrofinas; Y: momento da ovulação; X: diâmetro do folículo pré-ovulatório.

Por apresentar correlação entre o diâmetro ovulatório e o momento da ovulação, o protocolo utilizando o ECP como indutor de ovulação foi selecionado na condução de comparações na taxa de prenhez quando alterado o momento da inseminação. Dessa forma, o diâmetro ovulatório foi organizado em categorias e o momento ideal da IA foi considerado 24 horas antes do momento da ovulação (SAACKE, 2008) conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 – Momento ideal da IA de acordo com o diâmetro folicular das vacas submetidas a protocolo de IATF com o ECP como indutor de ovulação.

Diâmetro folicular	N	Momento da ovulação (h)	Momento ideal da IA (h)	Grupo
9 ($\leq 9,4$ mm)	2	90	66	Pequenos
10 (9,5-10,4 mm)	10	87,75	63,75	
11 (10,5-11,4 mm)	15	78	54	
12 (11,5-12,4 mm)	16	70,15	46,15	
13 (12,5-13,4 mm)	13	68	44	Grandes
14 (13,5-14,4 mm)	5	69	45	
15 (14,5-15,4 mm)	1	66	42	
16 ($\geq 15,5$ mm)	3	66	42	

Como demonstrado na Tabela 3, a avaliação do momento ideal da IA demonstra a separação de dois grupos de folículos, os folículos com diâmetro $\leq 10,4$ mm, cujo o momento ideal da IA é $64,9 \pm 1,6$ h após a retirada do dispositivo intravaginal de P4; e os folículos com diâmetro $\geq 10,5$ mm, cujo momento ideal da IA é $45,5 \pm 4,5$ h após a retirada do dispositivo.

O diâmetro folicular a partir do momento da retirada do dispositivo intravaginal até o momento da ovulação, no protocolo com ECP, foi comparado entre as vacas que apresentaram diâmetro ovulatório pequeno ($\leq 10,4$ mm) e grande ($\geq 10,5$ mm) e foi observado que o mesmo foi diferente entre os grupos ao longo do tempo, de acordo com o demonstrado na Figura 5.

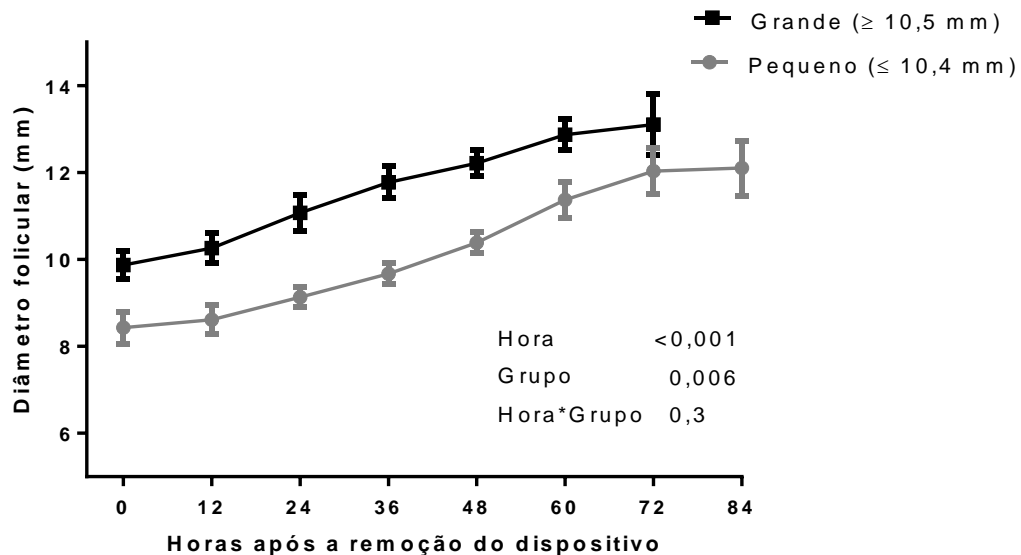


Figura 5 – Crescimento folicular após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona de acordo com o tamanho do folículo ovulatório no grupo cujo indutor de ovulação foi o ECP.

Não houve diferença ($P>0,05$) na concentração de E2 entre as vacas classificadas com folículo ovulatório pequeno ($\leq 10,4$ mm) ou grande ($\geq 10,5$ mm) no momento da retirada do dispositivo e no momento da ovulação. A concentração de P4 não diferiu ($P>0,05$) entre os grupos no momento da retirada do dispositivo e sete dias após a ovulação. Contudo, o grupo de vacas com folículos ovulatórios grandes apresentou menor concentração de P4 circulante no momento da ovulação comparadas às vacas com folículos pequenos ($P=0,03$), conforme demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4 – Concentração sérica de estradiol e progesterona, de acordo com o grupo, no momento da retirada do dispositivo, momento da ovulação e sete dias depois da ovulação de acordo com os diferentes diâmetros foliculares.

Momento	Estradiol (pg/mL)		Progesterona (ng/mL)	
	$\leq 10,4$ mm	$\geq 10,5$ mm	$\leq 10,4$ mm	$\geq 10,5$ mm
Retirada do dispositivo	33,62 \pm 4,77	33,69 \pm 5,4	4,99 \pm 1,43	2,94 \pm 0,33
Ovulação	44,79 \pm 5,73	40,13 \pm 5,46	0,475 \pm 0,05 ^a	0,321 \pm 0,03 ^b
7 dias após ovulação	-	-	8,203 \pm 0,75	7,71 \pm 0,65

^{a, b} Valores com letras diferentes diferem estatisticamente ($P\leq 0,05$). Média \pm Desvio Padrão.

4.2 Relação entre o diâmetro folicular, volume do corpo lúteo e a taxa de prenhez

Para essa avaliação foram utilizados os resultados do Estudo 2 e dos animais do grupo controle do Experimento 2. O diâmetro folicular 48 horas após a retirada do dispositivo apresentou efeito ($P=0,03$) sobre a taxa de prenhez nos bovinos de corte, contudo essa variável não apresentou efeito significativo nos bovinos leiteiros ($P=0,12$). A comparação da taxa de prenhez obtida, de acordo com o diâmetro folicular categorizado individualmente, está descrita na Tabela 5.

Tabela 5 – Relação entre o diâmetro folicular e a taxa de prenhez, de acordo com a aptidão, de bovinos submetidos a protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo.

Leite		Corte	
Diâmetro folicular	Taxa de prenhez	Diâmetro folicular	Taxa de prenhez
< 10 mm	38,46% (5/13) ^A	< 10 mm	20% (2/10) ^{AB}
11 mm	41,66% (5/12) ^{AB}	11 mm	20% (6/30) ^A
12-13 mm	54,84% (17/31) ^{AB}	12-13 mm	28,57% (20/70) ^{AB}
> 14 mm	75% (12/16) ^B	> 14 mm	42,22% (19/45) ^B

^{A, B} Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($P\leq 0,05$).

Quando os folículos foram avaliados de acordo com os resultados do Experimento 1 em diâmetro ovulatório pequeno ($\leq 11,0$ mm) e grande ($\geq 11,1$ mm), houve uma tendência ($P=0,07$) de os folículos menores apresentaram menor taxa de

preñez (40%; 10/25) do que os folículos grandes (61,7%; 29/47), nas fêmeas leiteiras. Nos bovinos de corte, a mesma tendência foi observada, sendo a taxa de preñez dos folículos pequenos (20%; 8/40) menor que a das fêmeas com folículos maiores (33,9%; 39/115) ($P=0,09$).

As fêmeas de corte com folículo ovulatório > 14 mm apresentaram o maior crescimento folicular entre 0 e 48 horas após a retirada do dispositivo ($P<0,05$), não havendo diferença para as fêmeas leiteiras ($P>0,05$), conforme demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6 – Crescimento folicular entre 0 e 48 horas da retirada do dispositivo intravaginal de progesterona de cada categoria de folículos, de acordo com a aptidão.

Leite		Corte	
Diâmetro folicular	Crescimento entre 0 e 48 horas	Diâmetro folicular	Crescimento entre 0 e 48 horas
< 10 mm	1,74 ± 0,7 mm	< 10 mm	1,83 ± 1,0 mm ^{AB}
11 mm	1,93 ± 1,77 mm	11 mm	1,53 ± 1,17 mm ^A
12-13 mm	2,05 ± 1,3 mm	12-13 mm	2,42 ± 1,47 mm ^B
> 14 mm	3,09 ± 2,29 mm	> 14 mm	3,73 ± 2,62 mm ^C

A, B, C Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($P\leq 0,05$). Média ± Desvio Padrão.

O diâmetro do folículo dominante foi correlacionado com o volume do CL formado após a ovulação, conforme demonstrado na Figura 6.

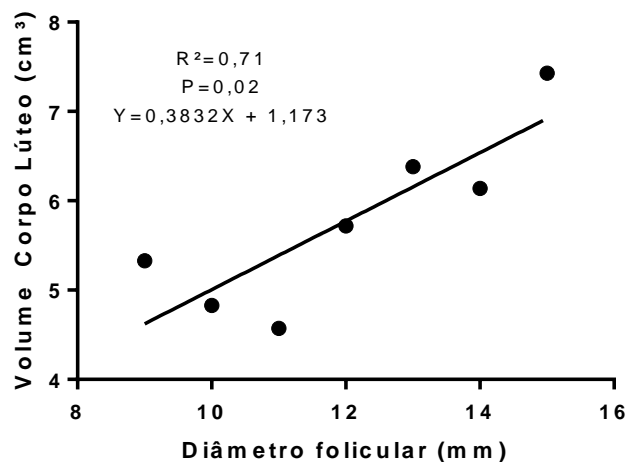


Figura 6 – Relação entre o diâmetro folicular e o volume do corpo lúteo formado após a ovulação. Y: Volume do corpo lúteo; X: Diâmetro folicular.

Conforme demonstrado na Tabela 7, a presença de CL de maior volume após a ovulação está relacionada com maior taxa de prenhez.

Tabela 7 – Relação do volume do corpo lúteo formado após a ovulação e a taxa de prenhez de bovinos submetidos à Inseminação Artificial em Tempo Fixo cujo indutor de ovulação foi o ECP.

Volume do Corpo Lúteo	Taxa de prenhez
≤ 5,4 cm ³	41,6% (5/12) ^B
5,5-8,4 cm ³	63,0% (7/13) ^B
≥ 8,5 cm ³	100% (5/5) ^A

^{A, B} Valores com letras diferentes diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$).

4.3 Avaliação da alteração do momento da IA de acordo com o diâmetro do folículo dominante

Nas vacas leiteiras, a taxa de prenhez não diferiu ($P=0,23$) entre os animais que foram submetidos a IATF convencional (controle) (62,96%; 17/27) ou se o momento da IA foi alterado de acordo com o diâmetro do folículo dominante (blocos) (48,57%; 17/35). Esse resultado foi similar nas vacas de corte, em que a taxa de prenhez das fêmeas da IATF convencional (controle) foi de 29,41% (10/34) e a taxa de prenhez dos animais inseminados de acordo com o diâmetro (blocos) foi de 29,5% (13/44) ($P=0,71$). A taxa de prenhez de acordo com o diâmetro folicular e os respectivos grupos está demonstrada nas Tabela 8 e 9, para as vacas de leiteiras e de corte, respectivamente.

Tabela 8 – Relação da taxa de prenhez de acordo com o momento da inseminação e o tamanho do folículo dominante em vacas leiteiras.

Tamanho do folículo	Controle	Bloco
≤ 10,4 mm	37,50% (3/8) ^A	28,57% (2/7)
≥ 10,5 mm	73,68% (14/19) ^B	53,57% (15/28)

^{A, B} Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($P < 0,05$); Bloco < 11 mm: Bloco 2; Bloco > 11 mm: Bloco 1.

Tabela 9 – Relação da taxa de prenhez de acordo com o momento da inseminação e o tamanho do folículo dominante em vacas de corte.

Tamanho do folículo	Controle	Bloco
≤ 10,4 mm	16,00% (1/6)	0,00% (0/18) ^A
≥ 10,5 mm	32,14% (9/28)	50,00% (13/26) ^B

^{A, B} Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($P < 0,001$); Bloco < 11 mm: Bloco 2; Bloco > 11 mm: Bloco 1.

Não houve diferença no crescimento folicular após a retirada do dispositivo entre os grupos das fêmeas bovinas de aptidão leiteira. Contudo, nas fêmeas de corte, os folículos ≥ 10,5 mm dos grupos controle e bloco 1 apresentaram maior

crescimento entre 0 e 48 horas após a retirada do dispositivo intravaginal de P4 do que as fêmeas com folículos $\leq 10,4$ mm, conforme demonstrado na Tabela 10.

Tabela 10 – Crescimento folicular entre 0 e 48 horas após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona de cada grupo de acordo com a aptidão.

Leite		Corte	
Grupo	Crescimento entre 0 e 48 horas	Diâmetro ovulatório	Crescimento entre 0 e 48 horas
Controle ($\leq 10,4$ mm)	1,11 \pm 1,07 mm	Controle ($\leq 10,4$ mm)	1,96 \pm 0,99 mm ^A
Controle ($\geq 10,5$ mm)	2,4 \pm 2,19 mm	Controle ($\geq 10,5$ mm)	3,87 \pm 1,87 mm ^B
Bloco 1	2,31 \pm 1,78 mm	Bloco 1	3,48 \pm 1,96 mm ^B
Bloco 2	1,61 \pm 0,75 mm	Bloco 2	2,34 \pm 1,4 mm ^A

^{A, B} Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$). Média \pm Desvio Padrão.

5 Discussão

5.1 Relação entre diâmetro folicular e momento da ovulação em bovinos submetidos à IATF

A fertilidade dos bovinos tem sido positivamente associada com o diâmetro do folículo ovulatório (VASCONCELOS et al., 2001). Estudos têm demonstrado que existe uma variação no diâmetro do folículo de acordo com o indutor de ovulação utilizado no protocolo de IATF. Vacas que são induzidas a ovular com GnRH tem folículo de maior diâmetro do que aquelas induzidas a ovular com ésteres de E2 (SÁ FILHO et al., 2011), não havendo diferença no diâmetro de acordo com o éster escolhido (SÁ FILHO et al., 2011; TORRES-JÚNIOR et al., 2014). Nossos resultados também demonstraram não haver diferença no diâmetro das vacas induzidas a ovular com BE ou ECP, contudo, as vacas induzidas a ovular com GnRH não apresentaram diferenças no diâmetro folicular quando comparadas aos outros indutores de ovulação, ao contrário do observado na literatura (SÁ FILHO et al., 2011). A utilização de GnRH ou BE como indutor de ovulação não interfere na concentração de LH liberada (CIPRIANO et al., 2011), justificando a similaridade das taxas ovulatórias encontradas nos grupos ECP, GnRH e BE. O grupo Controle apresentou a menor proporção de vacas que tiveram ovulação. Sabe-se que o diâmetro do folículo pode afetar a taxa ovulatória (GIMENES et al., 2008). Contudo, a capacidade de ovulação só é adquirida quando o folículo atinge um diâmetro de aproximadamente 10 mm (SARTORI et al., 2001). No grupo Controle, 48 horas após a retirada do dispositivo, metade das vacas possuía um folículo menor do que 10 mm, sugerindo a reduzida taxa ovulatória observada nesse grupo.

As diferenças no momento da ovulação entre os indutores eram esperadas, já que os hormônios utilizados possuem diferentes padrões de metabolização e provocam o pico de LH em momentos diferentes (CHENAULT et al., 1990; SALES et al., 2012). Os resultados encontrados na literatura são controversos, enquanto alguns trabalhos concordam com os nossos resultados demonstrando não haver diferença no momento da ovulação quando utilizado BE ou ECP (SALES et al.,

2012), outros demonstram que o BE promove uma ovulação mais precoce do que o ECP (TORRES-JÚNIOR et al., 2014). Além disso, ao contrário do observado no nosso estudo, há trabalhos que demonstram não haver diferença no momento da ovulação quando utilizado BE ou GnRH (SOUZA et al., 2009). Contudo, no trabalho realizado por SOUZA et al. (2009), a administração do GnRH ocorreu 48 horas após a remoção do dispositivo de P4, enquanto no nosso estudo a administração do GnRH ocorreu 60 horas após a remoção do dispositivo. Nossos resultados concordam com os encontrados por PFEIFER et al. (2014), em que vacas induzidas a ovular com BE apresentam ovulações mais precoces do que quando não é utilizado indutor de ovulação. Contudo, era esperado que o momento da ovulação do grupo Controle fosse mais tardio, uma vez que em um estudo realizado por MARTÍNEZ et al. (2000) a ovulação ocorreu entre 60 e 132 horas após a remoção do dispositivo quando o indutor de ovulação não foi utilizado. O baixo número de animais que apresentaram ovulação nesse grupo pode ter contribuído para o resultado encontrado ser diferente do reportado na literatura.

Nossos resultados demonstraram haver diferenças na distribuição do momento da ovulação de acordo com o indutor de ovulação utilizado. O grupo BE apresentou ovulações mais sincronizadas, enquanto o grupo ECP apresentou ovulações mais dispersas, concordando os resultados encontrados por USLENGHI et al. (2014). O ECP é um éster de E2 com baixa solubilidade em água e liberação lenta do local da administração, prolongando as concentrações plasmáticas de E2 por um maior tempo após a administração (VYNCKIER et al., 1990). Essa diferença na metabolização interfere na liberação de LH, enquanto o ECP promove uma onda de LH com duração de 16,5 horas, o BE promove uma onda mais curta com 8,6 horas de duração (SALES et al., 2012).

O protocolo com ECP foi o único que demonstrou uma forte correlação entre o diâmetro folicular e o momento da ovulação, resultado também encontrado por PFEIFER et al. (2015). No grupo BE, 90% das fêmeas ovularam entre 60 e 72 horas da remoção do dispositivo; de forma similar, no grupo GnRH todas as vacas ovularam em um intervalo de apenas 24 horas. Portanto, nesses dois grupos, o momento da ovulação pode ter sido mais relacionado com o mecanismo de ação dos indutores de ovulação, do que com o diâmetro folicular propriamente dito. Nestes casos, merece ainda ser elucidado como a modificação do momento da aplicação do indutor pode afetar o diâmetro do folículo ovulatório e como isso irá

afetar a taxa de prenhez. Já no grupo Controle, houve grande variação no diâmetro ovulatório e no momento da ovulação, sendo demonstrada pelo desvio padrão, enfraquecendo o poder do teste de correlação.

5.2 Relação entre o diâmetro folicular, tamanho do CL e taxa de prenhez em bovinos submetidos à IATF

O diâmetro do folículo dominante no momento da inseminação afetou a taxa de prenhez de bovinos de origem europeia submetidos a protocolo de IATF, concordando com estudos prévios (LOPES et al., 2007; PERRY et al., 2005; SÁ FILHO et al., 2010a). Além disso, nossos resultados demonstraram que nos bovinos de corte, o crescimento folicular entre 0 e 48 horas após a retirada do dispositivo de P4 foi maior nas fêmeas que apresentaram folículos maiores no momento da IA. É sugerido que os folículos dominantes não só são os maiores, mas também aqueles que crescem mais rápido (GINTHER et al., 2001), isso ocorre por mudanças no padrão de expressão gênica das células foliculares (MATTI et al., 2010). O motivo pelo qual folículos de diferentes tamanhos apresentam diferentes crescimentos ao longo do tempo ainda não é completamente entendido, contudo GINTHER et al. (2001) sugerem que folículos com diferentes diâmetros respondem de forma diferente às gonadotrofinas, o que pode contribuir para essas variações.

A maior taxa de prenhez observada nos folículos maiores pode ter ocorrido porque o diâmetro folicular é indicador da capacidade funcional do folículo (VAN EERDENBURG et al., 2002) e afeta a qualidade oocitária, através da sua influência no ambiente folicular (SIRARD et al., 2006). A composição do fluido folicular varia de acordo com o diâmetro do folículo dominante, sendo demonstrado variações nas concentrações de uréia, aspartato aminotransferase, colesterol, P4 e E2 de acordo com o tamanho folicular (ALLER et al., 2013). Além disso, considerando que o folículo adquire capacidade ovulatória com um diâmetro relativamente baixo (< 10 mm, SARTORI et al., 2001), folículos que ainda estão em crescimento podem ser induzidos a ovular sem que tenha ocorrido todos os processos para a aquisição de competência oocitária (SIRARD et al., 2006). Dessa forma, o diâmetro folicular pode interferir na qualidade do embrião desenvolvido após a fecundação (SIRARD et al., 2006) e, conseqüentemente, na taxa de concepção em bovinos induzidos a ovular por tratamentos hormonais (PERRY et al., 2005).

A indução da ovulação de folículos com diâmetro inferior está relacionada com maior taxa de mortalidade embrionária e isso pode ser atribuído a um ambiente uterino menos adequado (PERRY et al., 2005) ou ao ambiente do oviduto. O ambiente do oviduto é afetado indiretamente pelo diâmetro do folículo ovulatório. Os folículos maiores levam a mudanças no oviduto que incluem alteração da proliferação celular e mudança na secreção de fatores de crescimento e no transporte de íons e metais, podendo melhorar o desenvolvimento e sobrevivência embrionária (GONELLA-DIAZA et al., 2015). Contudo, variações no ambiente uterino estão mais relacionadas as concentrações circulantes de E2 e P4 durante o proestro (CERRI et al., 2011; MANN & LAMMING, 2000).

Quando avaliados de acordo com o diâmetro ($\leq 10,4$ mm e $\geq 10,5$ mm), as vacas com diferentes diâmetros foliculares pré-ovulatórios, não apresentaram diferenças nas concentrações de E2 48 horas após a remoção do dispositivo e na última avaliação antes da ovulação. Resultados presentes na literatura demonstraram que o tamanho do folículo está relacionado com a concentração de E2 circulante (LOPES et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2001), já que folículos de maior diâmetro possuem maior quantidade de células da granulosa e, possivelmente, maior capacidade de produção de E2 (KHAN et al., 2012). Contudo, assim como no nosso estudo, outros trabalhos (LÜTTGENAU et al., 2011; MOKHTARI et al., 2016) também não encontraram essa relação. Em contrapartida, a concentração de P4 foi menor nas fêmeas com maiores folículos no momento da ovulação. Menores concentrações de P4 estão associadas com a presença de folículos pré-ovulatórios com maior diâmetro (LÜTTGENAU et al., 2011; PFEIFER et al., 2009), isso ocorre porque vacas com menores concentrações de P4 apresentam maior secreção de LH, que pode ser responsável pelo maior crescimento do folículo dominante (PFEIFER et al., 2009). Portanto, estas diferenças no diâmetro do folículo pré-ovulatório e momento da ovulação, podem estar relacionadas a presença de CL no início do protocolo, diferentes taxas de metabolização da P4 circulante após a remoção do dispositivo intravaginal ou eficiência da luteólise quando a PGF é administrada.

O diâmetro do folículo ovulatório também tem sido positivamente associado com a P4 circulante na fase subsequente (DADARWAL et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2001), possivelmente porque esses folículos darão origem a corpos lúteos maiores (PFEIFER et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2001), o que

afeta positivamente a prenhez (DEMETRIO et al., 2007, VASCONCELOS et al., 2001). Apesar de nossos resultados terem indicado uma correlação entre o diâmetro ovulatório e o volume do CL e uma melhoria na taxa de prenhez de acordo com o aumento do volume luteal, a concentração de P4 sete dias após a ovulação não diferiu entre as vacas com folículos $\leq 10,4$ mm ou $\geq 10,5$ mm. Contudo, a mensuração da P4 foi realizada em um pequeno grupo de animais que não foram submetidos a IA, portanto a comparação da concentração de P4 com a taxa de prenhez não pode ser realizada. Além disso, a mensuração de P4 foi realizada sete dias após a ovulação e estudos têm demonstrado que a diferença nas concentrações de P4 entre as vacas prenhas e não prenhas inicia a partir do dia 9 após a inseminação (PERRY et al., 2005).

A diferença na taxa de prenhez de acordo com o diâmetro folicular poderia ser atribuída a uma assincronia entre ovulação e IA, como sugerido anteriormente (PFEIFER et al., 2015). Nossos resultados demonstraram variação no momento da ovulação de acordo com o diâmetro. Dessa forma, a realização da IA de acordo com o diâmetro folicular poderia melhorar o resultado obtido nos protocolos de IATF de bovinos de origem europeia.

5.3 Avaliação da alteração do momento da IA de acordo com o diâmetro do folículo dominante em bovinos submetidos à IATF

Como o grupo ECP apresentou correlação entre o diâmetro e o momento da ovulação foi selecionado para avaliar se a alteração do momento da IA de acordo com o diâmetro folicular poderia melhorar a taxa de prenhez de bovinos submetidos à IATF. Contudo, apesar dos resultados encontrados na literatura mostrarem um efeito benéfico do atraso no momento da IATF em vacas zebuínas com folículos menores (PFEIFER et al., 2015), nossos resultados indicaram não haver diferença entre os bovinos taurinos submetidos a IATF convencional e aqueles inseminados de acordo com o diâmetro do folículo ovulatório, tanto nos de aptidão leiteira, quanto nos de aptidão para carne. Essa diferença entre os nossos resultados e os de PFEIFER et al. (2015) pode ser pelas particularidades de cada origem (*Bos indicus* x *Bos taurus*). É sugerido que a metabolização do BE no início do protocolo de IATF ocorre de forma mais lenta nas fêmeas *Bos indicus* (SARTORI et al., 2016b). Isso poderia afetar o momento da seleção de uma nova onda folicular, resultando na

presença de menores folículos no momento da IA (SARTORI et al., 2016b). Associado a presença de menores folículos, as fêmeas *Bos indicus* possuem maiores concentrações circulantes de P4 e menores concentrações e um pico mais baixo de LH em comparação com fêmeas *Bos taurus* (BATISTA et al., 2017). Essas diferenças podem interferir no momento da ovulação. Enquanto no trabalho de PFEIFER et al. (2015), foi possível definir 4 blocos com momento ideal da IA variando em 30 horas, nesse estudo foi possível definir apenas 2, com uma variação de 17 horas. Dessa forma, no trabalho realizado por PFEIFER et al. (2015), as fêmeas apresentaram diferentes diâmetros e, portanto, um intervalo maior nos momentos da ovulação, justificando a necessidade de adequar o momento da IA e portanto maior benefício quando na aplicação dos blocos. Contudo, nesse trabalho, a menor variação do momento da ovulação de acordo com o diâmetro folicular resultou em uma ausência de diferença na taxa de prenhez quando comparados os momentos da inseminação. Dessa forma, alterar o momento da IA não afetou a taxa de concepção, uma vez que possivelmente, o resultado obtido não foi dependente da assincronia IA e ovulação.

O resultado obtido nas fêmeas de corte foi mais baixo do que o esperado em protocolos de IATF (SÁ FILHO et al., 2010a; SÁ FILHO et al., 2011). Esses animais encontravam-se com 45 pós-parto e a amamentação e o balanço energético negativo após o parto são os dois maiores fatores que aumentam o período de anestro devido a seu efeito negativo na pulsatilidade de LH e desenvolvimento folicular (WILTBANK et al., 2002). Além disso, existe uma grande variação de resultados de acordo com o touro utilizado na IATF (SÁ FILHO et al., 2009) e como usamos apenas um touro em cada local, um efeito negativo pode ter sido pronunciado. Apesar disso, os resultados desse estudo, assim como demonstrado no Experimento 1, mostram menor taxa de prenhez nas vacas do grupo controle com diâmetro ≤ 10.4 mm. Esse resultado nos permite questionar a necessidade de inseminar vacas com diâmetros foliculares inferiores, como sugerido por PFEIFER et al. (2015), uma vez que esses animais possuem menor taxa ovulatória e, conseqüentemente, menor taxa de prenhez. Contudo, mais estudos são necessários para esclarecer essa hipótese.

6 Considerações Finais

Conforme os resultados obtidos nesse estudo, podemos concluir que há uma correlação entre o diâmetro folicular e o momento da ovulação em fêmeas bovinas (*Bos taurus*) somente quando utilizado protocolo de IATF cujo indutor de ovulação é o Cipionato de Estradiol. O diâmetro ovulatório é correlacionado com o volume do corpo lúteo formado após a ovulação e o tamanho de ambos é relacionado positivamente com a taxa de prenhez de fêmeas bovinas (*Bos taurus*) submetidas a IATF. A menor taxa de prenhez encontrada nas fêmeas com menores folículos dominantes no momento da IA não é relacionada com uma assincronia entre o momento da IA e ovulação, já que o resultado da alteração do momento da IA de acordo com o diâmetro do folículo não diferiu dos resultados obtidos na IATF convencional.

Referências

ALLER, J. F.; CALLEJAS, S. S.; ALBERIO, R. H. Biochemical and steroid concentrations in follicular fluid and blood plasma in different follicular waves of the estrous cycle from normal and superovulated beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 142, p. 113-120, 2013.

ALVAREZ, P.; SPICER, L. J.; CHASE JR, C. C.; PAYTON, M. E.; HAMILTON, T. D.; STEWART, R. E.; HAMMOND, A. C.; OLSON, T. A.; WETTEMANN, R. P. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman and Senepol cows in subtropical environment. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 1291-1302, 2000.

ARMSTRONG, D. G.; MCEVOY, T. G.; BAXTER, G.; ROBINSON, J. J.; HOGG, C. O.; WOAD, K. J.; WEBB, R.; SINCLAIR, K. D. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1624-1632, 2001.

BALDRIGHI, J. M.; SÁ FILHO, M. F.; BATISTA, E. O.; LOPES, R. N.; VISINTIN, J. A.; BARUSELLI, P. S.; ASSUMPÇÃO, M. E. Anti-Mullerian hormone concentration and antral ovarian follicle population in Murrah heifers compared to Holstein and Gyr kept under the same management. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 6, p. 1015-1020, 2014.

BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; COLLI, M. H. A.; ELLIFF, F. M.; SÁ FILHO, M. F.; VIEIRA, L.; FREITAS, B. G. Timed artificial insemination: current challenges and recent advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 558-571, 2017.

BATISTA, E. O. S.; DEL VALLE, T. A.; ORTOLAN, M. D. D. V.; RENNÓ, F. P.; NOGUEIRA, G. P.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. The effect of circulating progesterone on magnitude of the GnRH-induced LH surge: Are there any differences between *Bos indicus* and *Bos taurus* heifers? **Theriogenology**, v. 104, p. 43-48, 2017.

BEAM, S. W.; BUTLER, W. R. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 411-424, 1999.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v. 43, p. 31-40, 1995.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; TRÍBULO, H.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R. J. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progesterone implant. **Theriogenology**, v. 41, p. 1555-1569, 1994.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MAPLETOFT, R. J. Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 137-142, 2013.

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

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

BÓ, G. A.; de la MATA, J. J.; BARUSELLI, P. S.; MENCHACA, A. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. **Theriogenology**, v. 86, p. 388-396, 2016.

BOSSAERT, P.; LEROY, J. L. M. R.; DE VliegHER, S.; OPSOMER, G. Interrelations between glucose-induced insulin response, metabolic indicators, and time of first ovulation in high-yielding dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 91, 3363-3371, 2008.

BRIDGES, G. A.; HELSER, L. A.; GRUM, D. E.; MUSSARD, M. L.; GASSER, C. L.; DAY, M. L. Decreasing the interval between GnRH and PGF_{2 α} from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. **Theriogenology**, v. 69, p. 843-851, 2008.

CAVALIERI, J.; HEPWORTH, G.; MACMILLAN, K. L. Ovarian follicular development in Holstein cows following synchronization of oestrus with oestradiol benzoate and an intravaginal progesterone releasing insert for 5-9 days and duration of the oestrus

cycle and concentrations of progesterone following ovulation. **Animal Reproduction Science**, v. 81, p. 177-193, 2004.

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

CERRI, R. L. A.; RUTIGLIANO, H. M.; CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E. P. Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows. **Reproduction**, v. 137, p. 813-823, 2009.

CHENAULT, J. R.; KRATZER, D. D.; RZEPKOWSKI, R. A.; GOODWIN, M. C. LH and FSH response of Holstein heifers to fertirelin acetate, gonadorelin and buserelin. **Theriogenology**, v.34, p. 81-98, 1990.

CIPRIANO, R. S.; CARVALHO, B. A.; MARANGONI, N. R.; NOGUEIRA, G. P. LH and FSH concentration and follicular development in Nellore heifers submitted to fixed-time artificial insemination protocols with different progesterone concentrations. **Animal Reproduction Science**, v. 127, p. 16-22, 2011.

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.

DEMETRIO, D. G. B.; SANTOS, R. M.; DEMETRIO, C. G. B.; VASCONCELOS, J. L. M. Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows. **Journal Dairy Science**, v. 90, n. 11, p. 5073-5082, 2007.

FARIN, C. E.; MOELLER, C. L.; SAWYER, H. R.; GAMBONI, F.; NISWENDER, G. D. Morphometric analysis of cell types in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 35, p. 1299-1308, 1986.

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

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

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; KOT, K. Follicle selection in cattle: relationships among growth rate, diameter ranking, and capacity for dominance. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 2, p. 345-350, 2001.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 383-389, 2000.

GONELLA-DIAZA, A. M.; ANDRADE, S. C. S.; SPONCHIADO, M.; PUGLIESI, G.; MESQUITA, F. S.; HOECK, V. V.; STREFEZZI, R. F.; GASPARIN, G. R.; COUTINHO, L. L.; BINELLI, M. Size of the ovulatory follicle dictated spatial differences in the oviductal transcriptome in cattle. **Plos One**, v. 10, n. 12, p. 1-24, 2015.

HUNTER, R. H. F.; WILMUT, I. The rate of functional sperm transport into the oviducts of mated cows. **Animal Reproduction Science**, v. 5, p. 167-173, 1983.

KHAN, F. A.; DAS, G. K.; PANDE, M.; SARKAR, M.; MAHAPATRA, R. K.; SHANKAR, U. Alterations in follicular fluid estradiol, progesterone and insulin concentrations during ovarian acyclicity in water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal Reproduction Science**, v. 130, p. 27-32, 2012.

KOJIMA, F. N. The estrous cycle in cattle: physiology, endocrinology, and follicular waves. **The professional animal scientist**, v. 19, p. 83-95, 2003.

LOPES, A. S.; BUTLER, S. T.; GILBERT, R. O.; BUTLER, W. R. Relationship of the pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 34-43, 2007.

LÜTTGENAU, J.; BEINDORFF, N.; ULBRICH, S. E.; KASTELIC, J. P.; BOLLWEIN, H. Low plasma progesterone concentrations are accompanied by reduced luteal blood flow and increased size of the dominant follicle in dairy cows. **Theriogenology**, v. 76, p. 12-22, 2011.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrus cycle in the cow. **Animal Reproduction Science**, v. 65, n. 3-4, p. 171-180, 2000.

MAPLETOFT, R. J.; MARTÍNEZ, M. F.; COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P. The use of controlled internal drug release devices for the regulation of bovine reproduction. **Journal Animal Science**, v. 81 (E. Suppl. 2):E28-E36, 2003.

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

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

MATTI, N.; IRVING-RODGERS, H. F.; HATZIRODOS, N.; SULLIVAN, T. R.; RODGERS, R. J. Differential expression of follicular and steroidogenic enzymes before size deviation during waves of follicular development in bovine ovarian follicles. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 321, p. 207-214, 2010.

MEIDAN, R.; GIRSH, E.; BLUM, O.; ABERDAM, E. In vitro differentiation of bovine theca and granulosa cells into small and large luteal-like cells: morphological and functional characteristics. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 913-921, 1990.

MOKHTARI, A.; KAFI, M.; ZAMIRI, M. J.; AKBARI, R. Factors affecting the size of ovulatory follicle and conception rate in high-yielding dairy cows. **Theriogenology**, v. 85, p. 747-753, 2016.

MONTEIRO JR, P. L. J.; BORSATO, M.; SILVA, F. L. M.; PRATA, A. B.; WILTBANK, M. C.; SARTORI, R. 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, 3826-3839, 2015.

MURDOCH, W. J.; VAN KIRK, E. A. Luteal dysfunction in ewes induced to ovulate early in the follicular phase. **Endocrinology**, v. 139, n. 8, p. 3480-3484, 1998.

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

PEREIRA, M. H. C.; RODRIGUES, A. D. P.; CARVALHO, R. J.; WILTBANK, M. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Increasing length of an estradiol and progesterone timed artificial insemination protocol decreases pregnancy losses in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 1454-1464, 2014.

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

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

PFEIFER, L. F. M.; CASTRO, N. A.; MELO, V. T. O.; NEVES, P. M. A.; CESTARO, J. P.; SCHNEIDER, A. Timed artificial insemination in blocks: A new alternative to improve fertility in lactating beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 163, p. 89-96, 2015.

PFEIFER, L. F. M.; LEONARDI, C. E. P.; CASTRO, N. A.; VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; CASTILHO, E. M.; SINGH, J.; KRUSSER, R. H.; RUBIN, M. I. B. The use of PGF2 α as ovulatory stimulus for timed artificial insemination in cattle. **Theriogenology**, v. 81, p. 689-695, 2014.

PFEIFER, L. F. M.; MAPLETOFT, R. J.; KASTELIC, J. P.; SMALL, J. A.; ADAMS, G. P.; DIONELLO, N. J.; SINGH, J. Effects of low versus physiologic plasma progesterone concentrations on ovarian follicular development and fertility in beef cattle. **Theriogenology**, v. 72, p. 1237-1250, 2009.

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

RHODES, F. M.; FITZPATRICK, L. A.; ENTWISTLE, K. W.; DE'ATH, G. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrous. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 104, p. 41-49, 1995.

ROELOFS, J. B.; GRAAT, E. A. M.; MULLAART, E.; SOEDE, N. M.; VOSKAMP-HARKEMA, W.; KEMP, B. Effects of insemination-ovulation interval on fertilization rates and embryo characteristics in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 66, p. 2173-2181, 2006.

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

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

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

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

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

SALES, J. N. S.; CARVALHO, J. B. P.; CREPALDI, G. A.; CIPRIANO, R. S.; JACOMINI, J. O.; MAIO, J. R. G.; SOUZA, J. C.; NOGUEIRA, G. P.; BARUSELLI, P. S. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 510-516, 2012.

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

SARTORI, R.; GIMENES, L. U.; MONTEIRO JR., P. L. J.; MELO, L. F.; BARUSELLI, P. S.; BASTOS, M. R. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. **Theriogenology**, v. 86, p. 32-40, 2016b.

SARTORI, R.; PRATA, A. B.; FIGEIREDO, A. C. S.; SANCHES, B. V.; PONTES, G. C. S.; VIANA, J. H. M.; PONTES, J. H.; VASCONCELOS, J. L. M.; PEREIRA, M. H. C.; DODE, M. A. N.; MONTEIRO JR, P. L. J.; BARUSELLI, P. S. Update and overview on assisted reproductive Technologies (ARTs) in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 13, n. 3, p. 300-312, 2016a.

SCHULLER, L. K.; MICHAELIS, I.; HEUWIESER, W. Impact of heat stress on estrus expression and follicle size in estrus under field conditions in dairy cows. **Theriogenology**, v. 102, p. 48-53, 2017.

SIRARD, M.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, p. 126-136, 2006.

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

TENHAGEN, B. –A.; DRILLICH, M.; SURHOLT, R.; HEUWIESER, W. Comparison of Timed AI After Synchronized Ovulation to AI at Estrus: Reproductive and Economic Considerations. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 85-94, 2004.

TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; PENTEADO, L.; SALES, J. N. S.; SÁ FILHO, M. F.; AYRES, H.; BARUSELLI, P. S. A comparison of two different esters of estradiol for the induction of ovulation in an estradiol plus progestin-based timed artificial insemination protocol for suckled *Bos indicus* beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 151, p. 9-14, 2014.

TORTORELLA, R. D.; FERREIRA, R.; SANTOS, J. T.; NETO, O. S. A. N.; BARRETA, M. H.; OLIVEIRA, J. F.; GONÇALVEZ, P. B.; NEVES, J. P. The effect of equine chorionic gonadotropin on follicular size, luteal volume, circulating progesterone concentrations, and pregnancy rates in anestrus beef cows treated with a novel fixed-time artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 79, p. 1204-1209, 2013.

USLENGHI, G.; CHAVEZ, S. G.; CABODEVILA, J.; CALLEJAS, S. Effect of estradiol cypionate and amount of progesterone I the intravaginal device on synchronization o estrus, ovulation and on pregnancy rate n beef cows treated with FTAI based protocols. **Animal Reproduction Science**, v. 145, p. 1-7, 2014.

VAN EERDENBURG, F. J. C. M.; KARTHAUS, D.; TAVERNE, M. A. M.; MERICS, I.; SZENCI, O. The relationship between estrous behavioral score and time of ovulation in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1150-1156, 2002.

VASCONCELOS, J. L. M.; PEREIRA, M. H. C.; MENEGHETTI, M.; DIAS, C. C.; SÁ FILHO, O. G.; PERES, R. F. G.; RODRIGUES, A. D. P.; WILTBANK, M. C. Relationships between growth of the preovulatory follicle and gestation success in lactating dairy cows. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 206-214, 2013.

VASCONCELOS, J. L. M.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H. N.; GUENTER, J. G.; WILTBANK, M. C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v. 54, p. 307-314, 2001.

VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. **Theriogenology**, v. 59, p. 571-584, 2003.

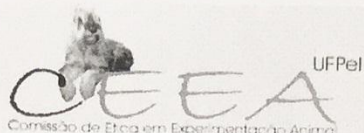
VYNCKIER, L.; DEBACKERE, M.; DE KRUIF, A.; CORYN, M. Plasma estradiol-17 β concentrations in the cow during induced estrus and after injection of estradiol-17 β benzoate and estradiol-17 β cypionate- a preliminary study. **Journal of Veterinary Pharmacology**, v. 13, p. 26-42, 1990

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

XU, Z. Z.; BURTON, L. J. Reproductive performance of dairy heifers after synchronization and fixed-time artificial insemination. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 910-917, 1999.

Anexos

Anexo I - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal



Pelotas, 22 de agosto de 2017

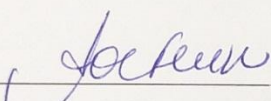
Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Relação entre o diâmetro folicular e o momento da ovulação: Aplicação da IATF em blocos para aumento da taxa de prenhez em bovinos**” registrada com o nº 23110.005324/2017-49, sob a responsabilidade de **Augusto Schneider** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 14/08/2017.

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	23/08/2017 a 01/08/2019
Espécie/linhagem/raça	Bovina/Jersey, Holandês, Angus, Braford
Nº de animais	250
Idade	Acima de 15 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	EMBRAPA Clima temperado, Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça, ABN Agropecuária e Fazenda Bela Vista

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao *COBALTO* para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº CEEA 5324-2017).



M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da CEEA

Ciente em: ____/____/2017

Assinatura do Professor Responsável: _____