



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

ANTONIO MATOS FRAGA JUNIOR

INFLUÊNCIA DO DIÂMETRO FOLICULAR E DO HORMÔNIO ANTIMULLERIANO  
(AMH) NA TAXA DE CONCEPÇÃO E PRODUÇÃO LEITERIA DE  
FÊMEAS DA RAÇA GIROLANDO INSEMINADAS

Recife, PE

2020

ANTONIO MATOS FRAGA JUNIOR

INFLUÊNCIA DO DIÂMETRO FOLICULAR E DO HORMÔNIO ANTIMULLERIANO  
(AMH) NA TAXA DE CONCEPÇÃO E PRODUÇÃO LEITERIA DE  
FÊMEAS DA RAÇA GIROLANDO INSEMINADAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal Tropical.

Orientador : Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro

Recife, PE

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

F811i

Fraga Junior, Antonio Matos

Influência do diâmetro folicular e do hormônio antimulleriano (AMH) na taxa de concepção e produção leiteira de fêmeas da raça Girolando inseminadas / Antonio Matos Fraga Junior. - 2020.  
76 f. : il.

Orientador: Gustavo Ferrer Carneiro.  
Inclui referências e anexo(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Recife, 2020.

1. AMH. 2. IATF. 3. Girolando. 4. fertilidade. I. Carneiro, Gustavo Ferrer, orient. II. Título

CDD 636.089

---

ANTONIO MATOS FRAGA JUNIOR

INFLUÊNCIA DO DIÂMETRO FOLICULAR E DO HORMÔNIO ANTIMULLERIANO  
(AMH) NA TAXA DE CONCEPÇÃO E PRODUÇÃO LEITERIA DE  
FÊMEAS DA RAÇA GIROLANDO INSEMINADAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal Tropical.

Recife, PE, \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro - Orientador

Universidade Federal Rural de Pernambuco – DMV / UFRPE

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Madalena Pessoa Guerra

Universidade Federal Rural de Pernambuco – DMV / UFRPE

---

Prof. Dr. Victor Netto Maia

Universidade Federal do Agreste de Pernambuco - UFAPE

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra Silva Duarte

Universidade Federal Rural de Pernambuco – DMV / UFRPE

---

Dr.<sup>a</sup> Lúcia Cristina Pereira Arruda

Universidade Federal Rural de Pernambuco – DMV / UFRPE

A minha Família!

## AGRADECIMENTOS

A Deus,

À minha família.

Ao meu orientador, Prof. Gustavo Ferrer, por ter me oferecido a oportunidade que tive.  
Ao senhor também, toda a minha gratidão.

Ao proprietário da Fazenda Diva, Sr. Nilson e aos funcionários que foram peças importantes para a construção deste trabalho.

Ao amigo Sérgio Alves do Nascimento, técnico do Laboratório de Virologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pelo apoio na execução da parte laboratorial.

Aos amigos, Allan Rezende, Allan Crispim, Urias Fagner, Urbino Menezes, Érika Souza, Josevânia Teixeira, Emerson Israel, Francisco Diemerson, por todo o apoio nos momentos mais difíceis e, em especial a Prof.<sup>a</sup> Lenalda Dias dos Santos por me incentivar e apoiar nesse sonho.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical (PPGCAT), por toda a contribuição com a minha formação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela fomentação de bolsa de estudo, o que viabilizou a execução desta pesquisa.

Aos demais não mencionados aqui, mas que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho, recebam todos os meus agradecimentos.

"Um homem nunca sabe aquilo de que é capaz até que o tenta fazer." Charles Dickens

## RESUMO

Uma das principais biotecnologias para aperfeiçoar os índices reprodutivos e assim gerar maior retorno econômico para a produção de bovinos é a inseminação artificial, porém estes índices ainda se encontram baixos, ocasionados, principalmente, por problemas na detecção do estro, puberdade tardia, e anestro pós-parto que afetam o desempenho reprodutivo. O tamanho do folículo ovulatório no momento da inseminação dentre outros fatores acabam influenciando a taxa de concepção e a eficiência reprodutiva em programas de IATF. O hormônio anti-Mülleriano (AMH) é componente da família do fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), conhecido por suas atribuições na diferenciação sexual em machos e fêmeas, secretado por células da granulosa e cumulus, por exercer impactos sobre a sensibilidade folicular ao hormônio FSH e recrutamento inicial de folículos. Regulam a eficiência do recrutamento e seleção folicular. Objetivou-se com este trabalho avaliar se existe relação entre as concentrações do hormônio antimulleriano com a taxa de concepção em vacas Girolando inseminadas em tempo fixo em blocos. Foram utilizadas 327 vacas da raça Girolando (*Bos taurus indicus x Bos taurus taurus*) no experimento. As fêmeas foram submetidas aos seguintes protocolos de sincronização: para as fêmeas primíparas, secundíparas e pluríparas o protocolo iniciou-se no D0 com a aplicação do dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR<sup>®</sup>, 1,9 g, Zoetis) e aplicação intramuscular (IM) de 2 mg de benzoato de estradiol (Gonadiol<sup>®</sup>, 2 mL, Zoetis); no D7 aplicação (IM) de 25 mg de dinoprost (Lutalyse<sup>®</sup> 5 mL, Zoetis); D9: aplicação (IM) de 12,5 mg de dinoprost (Lutalyse<sup>®</sup>, 2,5 mL, Zoetis) e 1 mg de cipionato de estradiol (E.C.P<sup>®</sup> 0,5 mL Zoetis). Para as nulíparas as modificações no protocolo anterior foram no D7 aplicação (IM) de apenas 12,5 mg de dinoprost (Lutalyse<sup>®</sup>, 2,5mL) e D9- aplicação de (IM) de 12,5 mg de dinoprost (Lutalyse<sup>®</sup>, 2,5 mL) e 0,6 mg de cipionato de estradiol (E.C.P<sup>®</sup> 0,3 mL). Decorridos onze dias do início do protocolo (D11) os animais foram divididos randomicamente em dois grupos. Grupo Controle (n:150) e Grupo Bloco (n:179). Avaliações ultrassonográficas foram iniciadas, uma hora antes, da IATF convencional. Após a avaliação ultrassonográfica os animais do Grupo Bloco foram divididos em 4 blocos de acordo com o tamanho do folículo dominante. As coletas de sangue foram realizadas no dia 11 do protocolo, pela veia coccígea, com tubo vacuntainer heparinizado. Após a coleta, o sangue foi centrifugado (900Xg durante 15 minutos) para a retirada do plasma, que foi armazenado em freezer a -80° C até a realização das análises. As concentrações séricas de AMH (ng/mL) foram analisadas utilizando o Bovine Anti-Mullerian hormone (Webster, TX). Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e quando constatado efeito significativo foi realizado teste de Tukey a 5% de significância para tal utilizou-se o programa estatístico RBio. A taxa de concepção do grupo bloco (70,99%) foi 28,71% maior que o grupo controle (42,28%). O ensaio para dosagem do AMH tem um intervalo analítico mensurável de 20 ng/mL-0.312 ng/mL. Os coeficientes de variação intraensaio foi de  $\leq 8\%$  e interensaio foram  $\leq 12\%$ . Os níveis de AMH não influenciaram no diâmetro do folículo dominante ( $p>0,05$ ), assim como na taxa de concepção, entretanto exerceram influência positiva ( $p<0,05$ ) sobre a produção de leite. Concluímos que a dosagem do AMH não pode ser utilizada como um marcador para determinação da fertilidade em vacas da raça Girolando. Maiores estudos serão necessários visando a utilização do AMH como marcador molecular para produção de leite.

**Palavras-chave:** AMH, IATF, Girolando, fertilidade



## ABSTRACT

One of the main biotechnologies to improve reproductive rates generating greater economic return for cattle production is artificial insemination, but these indexes are still low, mainly caused by problems in the detection of estrous, late puberty, and postpartum anestrus that affect directly reproductive performance. The size of the ovulatory follicle at the time of insemination among other factors influences the conception rate and reproductive efficiency in fixed-time Artificial Insemination (FTAI) programs. The anti-Müllerian hormone (AMH) is a component of the  $\beta$  transforming growth factor family (TGF- $\beta$ ), known for its attributions in sexual differentiation in males and females, secreted by granulosa and cumulus cells, for exerting impacts on the follicular sensitivity to FSH hormone and initial recruitment of follicles. They regulate the efficiency of follicular selection and recruitment. The objective of this work was to evaluate whether there is a relationship between AMH concentrations with the conception rate in Girolando cows inseminated FTAI in blocks. A total of 327 Girolando cows (*Bos taurus indicus x Bos taurus taurus*) was used in the experiment. The females were submitted to the following synchronization protocols: for primiparous and multiparous females, the protocol began in D0 with the application of intravaginal progesterone device (CIDR<sup>®</sup>, 1.9 g, Zoetis) and intramuscular application (IM) 2 mg estradiol benzoate (Gonadiol<sup>®</sup>, 2 mL, Zoetis); in the D7, application (IM) of 25 mg dinoprost (Lutalyse<sup>®</sup> 5 mL, Zoetis); D9: application (IM) of 12.5 mg dinoprost (Lutalyse<sup>®</sup>, 2.5 mL, Zoetis) and 1 mg estradiol cypionate (E.C.P<sup>®</sup> 0.5 mL Zoetis). For nulliparous cows, changes in the previous protocol were in the Application D7 (IM) of only 12.5 mg dinoprost (Lutalyse<sup>®</sup>, 2.5mL) and D9 (IM): Application of 12.5 mg dinoprost (Lutalyse<sup>®</sup>, 2.5 mL) and 0.6 mg of estradiol cypionate (E.C.P<sup>®</sup> 0.3 mL). After eleven days from the beginning of the protocol (D11), the animals were randomly divided into two groups. Control Group (n:150) and Block Group (n:179). Ultrasound evaluations were initiated an hour earlier from conventional FTAI. After ultrasound evaluation, animals of the Block Group were divided into 4 blocks according to the size of the dominant follicle. Blood collections were performed on the D11 of the protocol, by the coccygeal vein, with heparinized vacutainer tube. After collection, blood was centrifuged (900 x G for 15 minutes) for plasma removal, which was stored in freezer at -80° C until the analyses were performed. Serum AMH concentrations (ng/mL) were analyzed using bovine anti-Mullerian hormone (Webster, TX). The data were submitted to ANOVA, when significant effect was observed, tukey's test was performed at 5% significance for this, the statistical program RBio was used. The pregnancy rate of the Block Group (70.99%) was 28.71% higher than the Control Group (42.28%). The AMH assay has a measurable analytical interval of 20 ng/mL-0.312 ng/mL. Intraassay coefficients were  $\leq$  8% and interassay was  $\leq$  12%. As conclusion, AMH concentration cannot be used as a marker for fertility determination in Girolando cows. Further studies will be necessary to use AMH as a molecular marker for milk production.

**Keywords:** AMH, FTAI, Girolando, fertility

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFCs	Contagem de folículos antrais
AMH	Hormônio Anti-mulleriano
BE	Benzoato de estradiol
BI	Bloco de inseminação
Ca	Categoria
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIDR	Dispositivo intravaginal de progesterona
CL	Corpo lúteo
cv.	Cultivar
DFD	Diâmetro do folículo dominante
E.C.P.	Cipionato de estradiol
ECC	Escore de condição corporal
FAO	Food and Agriculture Organization
FOL	Folículo dominante
FSH	Hormônio folículo estimulante
GH	Hormônio do crescimento
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas
IEC	Índice de escore corporal
IEC	Índice de escore corporal
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IM	Intramuscular
LH	Hormônio luteinizante
P4	Progesterona
PRF	Fator de liberação de prolactina
VD	Variável dependente
VI	Variável independente

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
et al	et alia
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
mm	Milimetro
°C	Grau Celsius
±	Mais ou menos
ng	Nanograma
g	Gramma
µg	Micrograma
UI	Unidade Internacional

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	13
2.1	OBJETIVO GERAL .....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
3	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
3.1	DINÂMICA FOLICULAR .....	14
3.2	INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO .....	16
3.2.1	<b>PROTOSCOLOS E HORMÔNIOS</b> .....	16
3.3	FATORES QUE INFLUENCIAM A REPRODUÇÃO .....	18
3.3.1	<b>NUTRIÇÃO</b> .....	18
3.3.2	<b>LACTAÇÃO</b> .....	20
3.4	DIÂMETRO DO FOLÍCULO DOMINANTE NO MOMENTO DA IATF X TAXA DE CONCEPÇÃO .....	21
3.5	IATF EM BLOCOS .....	22
4	<b>HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO – AMH</b> .....	23
4.1	AMH COMO MARCADOR DA RESERVA OVARIANA .....	24
4.2	AMH E FERTILIDADE .....	25
5.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	26
6	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	31
7	<b>CAPÍTULO 2</b> .....	41
8	<b>ANEXOS</b> .....	52

## 1 INTRODUÇÃO

A reprodução bem como a produção de leite são os fatores que irão determinar a lucratividade em um sistema de produção leiteira. A produção por vaca tem aumentado devido a combinação de manejo, nutrição e intensa seleção genética (OLIVEIRA, 2013). Somando-se a isso, a demanda mundial de lácteos tem se elevado consideravelmente e esse cenário, conseqüentemente, tem impulsionado a produção global de leite.

Os últimos dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) mostram que a produção mundial de leite cresceu mais de 50% nas últimas três décadas, fechando 2017 com 813 bilhões de litros. Projeções a longo prazo, também da FAO, apontam que, em 2022, a produção mundial pode chegar a 895 milhões de litros tendo um aumento de 7,76% em relação ao volume de 2017.

No Brasil, a produção de leite deve aumentar 27,6% até 2025, conforme projeção do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018). Se confirmado o aumento, a produção deve chegar a 36,75 bilhões de litros em um ano. Em 2013, a produção leiteira foi de 35 bilhões de litros, sendo 35% a mais que os 26 bilhões contabilizados em 2016.

Em contraponto o impacto negativo deste aumento de produção é a redução da fertilidade e o aumento da incidência de problemas reprodutivos (GRÖHN; RAJALA-SCHULTZ, 2000). Washburn et al (2002) avaliaram que a taxa de concepção de animais da raça Holandesa caiu de 53% no final da década de 70 para 35% no final da década de 90. Esta diminuição da eficiência reprodutiva está associada tanto ao melhoramento genético quanto às práticas modernas que levam a um aumento da produção de leite por animal.

Outro ponto a ser levado em consideração é o custo de produção para as novilhas de reposição. A recria é uma fase onerosa ao sistema de produção, pois, durante esse período, o produtor despense muitos recursos que poderiam ser aplicados em outra área, como, por exemplo, aquisição de tecnologias, manejo de pastagem, melhoramento genético etc. Além disso, a atividade de criação de animais de reposição ocupa uma área significativa do sistema de produção de leite e não temos como assegurar que esta futura matriz terá uma alta eficiência reprodutiva (SANTOS; LOPES, 2014 ).

Uma das principais biotecnologias para aperfeiçoar os índices reprodutivos e assim gerar maior retorno econômico para a produção de bovinos é a inseminação artificial (IA) (BARUSELLI et al., 2004), porém estes índices ainda se encontram baixos, ocasionados, principalmente, por problemas na detecção do estro, puberdade tardia, e anestro pós-parto que

afetam o desempenho reprodutivo, especialmente em regiões de clima tropical (BARUSELLI et al., 2004; LARSON et al., 2006). O uso da IATF traz uma série de vantagens como: controle sobre o momentos da inseminação, com um maior número de vacas em um menor espaço de tempo (BARUSELLI et al., 2004).

O tamanho do folículo ovulatório no momento da inseminação dentre outros fatores acabam influenciando a taxa de concepção e a eficiência reprodutiva em programas de IATF (SÁ FILHO et al., 2012; SÁ FILHO et al., 2010). Sá Filho et al (2010) alegaram que quanto maior o tamanho do folículo ovulatório maior a probabilidade de ovulação e concepção, pois estes relacionam-se com maiores níveis de estrógeno o que promovem mudanças no ambiente uterino e melhoram o transporte espermático, estes efeitos, favorecem a concepção (SÁ FILHO et al., 2011).

Por outro lado, Lonergan et al (2013) afirmaram que o maior diâmetro do folículo ovulatório também se relaciona com o diâmetro do corpo lúteo formado, ou seja, a ovulação de folículos de menor diâmetro leva à formação de corpo lúteo de menor volume e, conseqüentemente, baixa capacidade de produção de progesterona (P4) e desenvolvimento embrionário insuficiente, promovendo assim, uma redução na fertilidade. Deste modo, fazer uma avaliação prévia do diâmetro do folículo dominante no momento da IATF poderá ser uma alternativa para estimar o momento da ovulação e assim ajustar o tempo da IA, buscando melhorar os índices da fertilidade (PFEIFER et al., 2015).

O hormônio anti-Mülleriano (AMH) é componente da família do fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), conhecido por suas atribuições na diferenciação sexual em machos e fêmeas, secretado por células da granulosa e cumulus, por exercer impactos sobre a sensibilidade folicular ao hormônio FSH e recrutamento inicial de folículos. Regulam a eficiência do recrutamento e seleção folicular.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do hormônio Anti-Mulleriano (AMH) na taxa de concepção e produção leiteira de fêmeas da raça Girolando.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar se o tamanho do folículo dominante e o momento da inseminação artificial influenciam a taxa de concepção;
2. Avaliar a concentração de AMH por categoria animal;
3. Avaliar a correlação entre concentração do AMH na taxa de concepção;
4. Avaliar a correlação da concentração do AMH no tamanho do folículo dominante;
5. Avaliar se há correlação da concentração do AMH na produção leiteira em vacas Girolando.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 DINÂMICA FOLICULAR

Animais poliéstricos, como as vacas, apresentam ciclos estrais múltiplos durante o ano. O ciclo estral é o conjunto de mudanças fisiológicas regulares coordenada por hormônios reprodutivos, compreendido por intervalos médios de 20 dias em novilhas e 21 dias em vacas. Conduzidos por interações por uma gama de hormônios do eixo hipotalâmico-hipofisário, gônadas e útero (AKBARINEJAD et al., 2018).

A ultrassonografia é utilizada para análise e compreensão da fisiologia reprodutiva em vacas, especificamente na dinâmica folicular, a partir do crescimento dos folículos ovarianos durante o ciclo estral, compreendido em proestro, estro, metaestro e diestro, respectivamente, com duração média de 21 dias em raças leiteiras como Holandesa e Girolando (PFEIFER et al., 2016).

Na proximidade do período ovulatório, um fenômeno chamado “onda folicular”, é caracterizada pelo recrutamento e crescimento de um grupo de folículos até a seleção de um folículo dominante e a regressão dos demais. O primeiro folículo dominante não é funcional, devido ao estímulo da progesterona produzida pelo do corpo lúteo, ainda presente. Após a segunda onda folicular, aproximadamente no meio do ciclo, outro folículo dominante continuará seu crescimento até a ovulação, o que corresponderá ao tempo de regressão luteínica (NEZ-OLIVERA et al., 2014).

Algumas fêmeas podem apresentar três ondas de crescimento folicular e, tanto o primeiro quanto o segundo evento são precedidos por aumentos nas concentrações do hormônio folículo estimulante (FSH). Esta elevação é essencial para o começo de uma onda folicular e diminuição subsequente para a seleção de somente um único folículo dominante (VAN HOUTEN, THEMME, & VISSER, 2010).

O ciclo estral bovino é caracterizado por diversos aspectos essenciais, principalmente, em relação às estruturas ovarianas, folículos pré-ovulatórios e o corpo lúteo. Importantes hormônios também coordenam este período reprodutivo, como o estradiol do folículo pré-ovulatório, responsável pela manifestação do estro e elevação dos níveis plasmáticos de LH, precursor folicular e do corpo lúteo, cerca de 28 horas após seu estímulo. A progesterona, resultante do corpo lúteo, em altas concentrações sanguíneas podem caracterizar a concepção, caso não, haverá uma regressão luteínica estimulada pela produção crescente de prostaglandina (NEZ-OLIVERA et al., 2014).



O crescimento folicular pode ser discernido em duas fases, a primeira, mais longa, evidenciada até a formação do antro, intrínseca a mecanismos ovarianos e a posterior após o desenvolvimento deste, dependente de gonadotrofinas hipofisárias (LH e FSH) e estrógeno. O antro é uma cavidade preenchida por líquido de transudação de células da granulosa e tecais, constituído de estrógeno, fatores inibidores da maturação ovocitária, progesterona, e inibina, em concentrações diversas entre o início e o final do desenvolvimento (INGENHOFF et al., 2017).

Refere-se à maturação ovocitária as transformações no ovócito ao longo do desenvolvimento folicular. Inicialmente por seu ligeiro aumento, suprimido posteriormente pelo contato das células do cummulus oophorus, formação da zona pelúcida e simultaneamente, ao término do crescimento folicular, que a partir deste momento estará apto a ser fecundado. Devido aos processos mitóticos haverá modificações ao mesmo, como estágios de prófase 1, evidenciada desde a formação embrionária até a onda pré-ovulatória de gonadotrofinas e metáfase 1, em que ocorre a liberação folicular. A meiose somente será finalizada caso o ovócito entre em contato com o espermatozoide (BALDRIGHI, 2013; PFEIFER et al., 2016)

A liberação do ovócito pela ruptura do folículo caracteriza a ovulação, o qual é transportado para a porção média do oviduto, onde ocorrerá à fertilização e as células do interior do folículo se modificarão em sua fase inicial, em corpo hemorrágico, logo após em corpo lúteo e finalmente no corpo albicans. A primeira fase deste fenômeno não responde à prostaglandina devido à ausência de receptores para o mesmo (PICKWORTH et al., 2016).

No metaestro, decorrente da ação do alto nível de estradiol, poderá haver dilatação capilar endometrial, conseqüentemente, elevar a vascularização uterina e observar corrimento muco-sanguinolento devido à ruptura destes pequenos vasos de um a três dias após o estro. A reorganização tecidual posterior ao aumento do fluxo sanguíneo induzido pelo corpo lúteo predispõe elevação gradativa nos índices de progesterona, o que caracteriza o diestro. Período de maior duração, que compreende entre o quinto e décimo sétimo dia, caracterizado pela presença do corpo lúteo (FERREIRA et al., 2013).

O processo dinâmico do desenvolvimento folicular pode ser alterado devido a déficits nutricionais, estresse calórico e anestro lactacional, principais parâmetros que poderão modificar significativamente o padrão reprodutivo e desencadear baixas taxas de concepção (RIBEIRO FILHO et al., 2013; MAGALHÃES et al., 2013; MONNIAUX et al., 2014).

## 3.2 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

### 3.2.1 PROTOCOLOS E HORMÔNIOS

Protocolos de inseminação artificial são realizados com base na fisiologia reprodutiva da vaca em relação ao tempo do estro. Tempo o qual é percebido pela observação dos ovários por meio da ultrassonografia e que se realiza a administração de ensaios hormonais (BISINOTTO et al., 2010).

Os eventos determinantes em torno do estro, basicamente, são relacionados ao aumento dos níveis plasmáticos de estradiol, hormônio luteinizante e a ovulação. A alta concentração plasmática de estradiol é precedente ao crescimento do folículo pré-ovulatório, visto que, após a involução do corpo lúteo, o folículo produz quantidades crescentes de estradiol, que torna a fêmea sexualmente ativa antes do início do estro (FERNANDES, 2010).

Durante certo período de tempo com níveis elevados de estradiol, a fêmea inicia a fase estrogênica, tornando-se, perceptível, a partir da receptividade à monta. A partir daí, há um estímulo à liberação do hormônio liberador da gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo. Este também estimula o aumento da produção do LH. O período do início do estro até a ovulação pode variar entre 25 a 34 horas (FERREIRA et al., 2013).

É fundamental observar que, para a inseminação artificial, o comportamento na fase do estro é essencial para o reconhecimento da fêmea que será inseminada. Caso não ocorra, não haverá a fertilização e conseqüentemente não há concepção. Protocolos reprodutivos são desenvolvidos com o objetivo claro para permitir que as vacas ovulem sincronizadamente sem a necessidade de detecção do estro (BALDRIGHI, 2013).

Uma ampla gama de protocolos tem por princípio alterar a fisiologia reprodutiva a fim de se obter resultados elevados nas taxas de concepção pois permite determinar o tempo ideal da inseminação em relação a uma ovulação induzida (NEZ-OLIVERA et al., 2014).

Ressalta-se a proporcionalidade entre o tamanho do folículo ovulatório e o tamanho do corpo lúteo, ou seja, a dimensão do folículo ovulatório pode influenciar, significativamente, o tamanho do corpo lúteo, devido a um maior número de células da granulosa e/ou tecais (ALVES et al., 2014).

A dimensão do tecido luteal é, provavelmente, um dos preponderantes da produção de progesterona pelo corpo lúteo, ou seja, evidencia-se que, quando há a redução do folículo ovulatório, conseqüentemente, observa-se uma diminuição do tamanho do corpo lúteo e déficits circulantes de progesterona. Estudos ressaltam que vacas em lactação apresentam níveis

elevados de progesterona em relação a não lactantes e novilhas, devido ao maior fluxo sanguíneo hepático, elevada produção leiteira e conseqüente alta necessidade de consumo de alimentos (BATISTA, 2015).

A regressão luteínica conseqüência de uma seqüência fisiológica envolvida por hormônios reprodutivos: estradiol, progesterona, prostaglandina e ocitocina. A princípio sua involução é estimulada pela secreção uterina basal de prostaglandina, também observada em ciclos estrais curtos. Na ausência de tratamento prévio com progestágenos, estas fêmeas poderão apresentar uma fase lútea curta após a ovulação, assim pode-se pressupor que a involução tardia do corpo lúteo relaciona-se a uma alteração da função uterina que induzirá posteriormente a secreção de prostaglandina (ALVES et al., 2014; NEZ-OLIVERA et al., 2014).

Ondas foliculares e a seleção de um único folículo dominante podem ser observadas por meio da ultrassonografia. Próximo ao período ovulatório, observa-se o crescimento de um pequeno conjunto de folículos ovarianos, o que se caracteriza o início da onda folicular. Deste pequeno grupo, um único dominante será selecionado para dar continuidade ao seu crescimento e a regressão dos demais. Este primeiro folículo não eleva os níveis circulantes de LH, ainda devido à presença de um corpo lúteo funcional, altas concentrações de progesterona e conseqüentemente a não ovulação (WILTBANK et al., 2014).

Ocorrerá a seleção de um novo folículo dominante que desencadeará a ovulação, posteriormente a regressão luteínica. Algumas fêmeas poderão apresentar três ondas de crescimento folicular, então, observa-se a involução do segundo folículo dominante e após a seleção do terceiro ocorrerá à ovulação. Tanto na primeira quanto na segunda onda folicular é constatado aumento nas concentrações de FSH (MONNIAUX et al., 2014; WILTBANK et al., 2014).

O aumento dos níveis circulantes de FSH é essencial para a inicialização de uma onda folicular. Após o pico o FSH circulante será diminuído até o fim do crescimento folicular. Estes primeiros folículos poderão apresentar diâmetros acima de 4 mm (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2015).

Interações entre a secreção de FSH pela hipófise e antagonistas ovarianos ocorrem durante quase todas as fases reprodutivas. Em animais ovariectomizados observa-se, em no máximo 24 horas, um rápido aumento de FSH circulante. Similarmente perceptível após a aspiração de todos os folículos maiores que 3 mm, o qual comprova que há atividade inibitória folicular (SYMONDS et al., 2016).

Estradiol e inibina são os principais inibidores de FSH. Em contraponto, elevadas concentrações circulantes nos níveis de FSH são observadas após a passagem para novas ondas foliculares, provavelmente, associadas a baixas concentrações destes dois hormônios inibidores (PICKWORTH et al., 2016).

Inúmeros mecanismos celulares também são evidenciados em relação ao receptor do hormônio luteinizante (LH) os quais incluem o aumento do fator de crescimento semelhante à insulina do sistema nervoso central (IGF-1), diminuição de proteínas envolvidas e a síntese folicular de estradiol. O IGF-1, na reprodução, auxilia o crescimento somático, principalmente durante a puberdade, também na regulação na produção de GnRH, consequentemente, na produção de gonadotrofinas, LH e FSH (JUNG; GATCH; SIMPKINS, 2002).

Modelos de crescimento folicular são baseados em uma variedade de estudos que ressaltam a importância do FSH e LH no crescimento folicular. Silva (2017), com novilhas imunizadas contra GnRH que receberam tratamentos com FSH, LH e associações responderam com o não crescimento folicular, observados com diâmetros de até 5 mm, com fêmeas tratadas apenas com LH, com a administração de FSH isolado foram observados folículos de 5 a 9,5 mm e em associações, diâmetros maiores.

Portanto, o crescimento folicular antes da seleção folicular necessita do aumento da concentração sérica de FSH, mas após a seleção folicular precisará de pulsos de LH. O FSH circulante regulará todas as fases, desde o surgimento da onda folicular, crescimento até a seleção folicular. Tais concentrações serão progressivamente inibidas proporcionalmente ao crescimento do folículo e a produção de estradiol, até que picos de LH sejam suficientes para induzir a ovulação do folículo dominante (MONNIAUX, 2016).

### 3.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A REPRODUÇÃO

#### 3.3.1 NUTRIÇÃO

Eficiência na produção leiteira está diretamente associada a décadas de seleção genética, mas, em contrapartida, são evidenciados índices negativos no desempenho reprodutivo. Baixa eficiência na reprodução predispõe à inúmeros prejuízos como aumentar o intervalo entre lactações, reduzir o progresso genético, o número de crias para comércio e reposição, eleva a quantidade de animais direcionados ao descarte precoce e baixo retorno de investimentos (RIBEIRO FILHO et al., 2013).

O status nutricional e o escore corporal da fêmea bovina é de suma importância para manutenção de atividades reprodutivas como início e manutenção da prenhez, lactação, ciclo estral e ovulação. São essenciais para avaliação de impactos na produção e auxiliam a regular a redução do período de anestro e a predição do desempenho reprodutivo e produtivo (MACHADO et al., 2008).

Vacas de alta produtividade necessitam de grande demanda de alimentos, principalmente, nas primeiras semanas pós-parto, conseqüentemente, rápida perda de peso, alterações no desenvolvimento folicular e redução dos níveis de progesterona, são associados a redução da fertilidade, no atraso da primeira ovulação, inibição dos pulsos de LH e na produção de estradiol pelo folículo dominante (MACHADO et al., 2008).

O suprimento energético inadequado na dieta da fêmea bovina desencadeia conseqüências negativas sobre a atividade reprodutiva. Restrições de energia em animais de alta produção leiteira poderão influenciar déficits sobre a função hipotalâmica e ovariana. Correlacionados a mudanças endócrinas e metabólicas, assim como reduzida viabilidade ovocitária e fertilização, além de efeitos na produção de leite e desempenho (SARTORI; GUARDIEIRO, 2010) .

Subnutrição na reprodução pode ser vista como uma condição patológica, a qual fomenta alterações no sistema reprodutivo. A inibição reprodutiva em períodos de baixa disponibilidade energética é ressaltada como um reflexo do estímulo de mecanismos fisiológicos que restringem a probabilidade da ocorrência da ovulação. Os mecanismos pelos quais as mudanças do balanço energético afetam a função reprodutiva não são conseqüências diretas do suprimento inadequado de nutrientes, mas relativo à ação de fatores metabólicos que regulam a ações hipofisária e ovariana (SARTORI; GUARDIEIRO, 2010).

Por outro ponto de vista, a subnutrição e superalimentação são os principais fatores para alterações no sistema reprodutivo, como infertilidade. Assim, para que não haja perdas reprodutivas, deverá ser ofertada uma alimentação balanceada capaz de suprir as necessidades destes animais (SARTORI; GUARDIEIRO, 2010).

O anestro é a principal conseqüência da má nutrição, conseqüentemente, alterações ou até mesmo a ausência do estro. Ele é observado pela inatividade e involução ovariana, além destas fêmeas estarem mais susceptíveis a outras enfermidades; a superalimentação em altos consumos energéticos, por exemplo, em um estado de obesidade, também proporciona alterações reprodutivas (MACHADO et al., 2008).

Consumo insuficiente e restrições alimentar de nutrientes para atender às exigências metabólicas poderão levar a fêmea bovina ao anestro nutricional. Considerada como um fator determinante ao aparecimento do anestro pós-parto a energia pode alternar a partir da variabilidade entre os estágios produtivos e reprodutivos e na qualidade e quantidade do alimento disposto. Boa qualidade alimentar contribui para a eficiência reprodutiva e produtiva entre o final do período gestacional e início da lactação. Os parâmetros de escore corporal são utilizados para avaliação da condição nutricional e estimar a capacidade reprodutiva no pós-parto (GODOY et al., 2004).

### 3.3.2 LACTAÇÃO

Ao longo do tempo, a vaca foi gradativamente especializada com o objetivo de atingir a maior produção diária e por lactação. Em contrapartida, observa-se declínio da eficiência reprodutiva e baixas taxas de detecção do estro nestes animais de alta produção (LOPEZ, 2004).

Inúmeros fatores da relação alta produção leiteira e declínio reprodutivo podem ser observados em animais de produções acima da média em relação ao rebanho possuir maior intervalo de parto e entre a detecção visual do cio. Outro fator evidenciado nestas mesmas fêmeas, é não apresentarem sinais evidentes de estro. A correlação de diferentes níveis de produção e informações referentes ao estro, também evidenciam associação entre a capacidade da produção leiteira e a duração do cio (LOPEZ, 2004).

A lactação está relacionada, fisiologicamente, a processos reprodutivos. No início da lactação, estímulos sensoriais são direcionados ao hipotálamo, conseqüentemente, a síntese do fator de liberação de prolactina (PRF) e dopamina. O PRF alcança picos máximos em vacas de alta produção leiteira, visto que este hormônio está estritamente relacionado a fêmeas com altos períodos entre lactações e anestros (RIBEIRO FILHO et al., 2013).

Grande mobilização de reservas corporais, balanço energético negativo, consumo elevado de matéria seca e modificações no início da lactação estão associadas a baixas taxas de concepção e grandes perdas gestacionais. Fatores envolvidos entre saúde, reprodução e nutrição são estritamente relacionados à qualidade do ovócito e desenvolvimento embrionário. O período de transição entre gestação e lactação é uma das fases mais delicadas para a fertilidade e produtividade de vacas leiteiras que caracteriza-se por excessiva adaptação metabólica a qual envolve variações de uma diversidade de hormônios e metabólitos, com

propósito de conduzir os nutrientes, anteriormente disponibilizados no útero gestante e, agora para a glândula mamária e sustentar a produção leiteira (CARVALHO et al., 2015).

Ocorrem, também, alterações hepáticas em vacas de alta produção. A hipoinsulinemia desencadeia déficit na expressão do receptor do GH, responsável pelo desacoplamento do eixo somatotrófico, além das elevadas concentrações plasmáticas de GH no início da lactação. Há redução, ao final, nas concentrações circulantes de IGF-I, outra adaptação metabólica para priorizar glicose para a glândula mamária (CARVALHO et al., 2015).

Os efeitos do balanço energético negativo são momentâneos, e sua expressividade é reduzida com a reversão deste para positivo, ao decorrer da lactação, devido ao aumento do consumo de matéria seca e à redução na produção de leite, após o pico de lactação. A sobreposição da sua ocorrência é evidenciada com o período ótimo de reprodução. O intervalo de partos próximo a 12 meses, as fêmeas devem ser inseminadas e tornarem-se gestantes num período médio de 85 dias (CARVALHO et al., 2015).

#### 3.4 DIÂMETRO DO FOLÍCULO DOMINANTE NO MOMENTO DA IATF X TAXA DE CONCEPÇÃO

A sincronização do cio em grande parte dos protocolos de IATF em bovinos tem como principal base hormonal a progesterona. Podem ser administrados na forma de implante auriculares, formulações orais ou, mais utilizado, dispositivo intravaginal. Os implantes com os progestágenos são utilizadas por volta de cinco a dez dias como inibidores de estradiol e dos picos de LH, para, desta forma, prevenir o estro e a ovulação do folículo dominante (MOROTTI; CAMPOS; SENEDA, 2013).

Ao ser associado ao estrógeno no dia zero (D0), a progesterona promove a involução do folículo dominante (FD) e o estímulo de uma nova onda folicular. Promove a sincronização eficiente do estro e a ovulação, potencializa o manejo reprodutivo e reduz custos. Observam-se, após a administração do progestágeno, mais folículos acima de 5 mm no dia quatro, além de melhores taxas no crescimento folicular e comportamento estral mais evidente (MOROTTI; CAMPOS; SENEDA, 2013).

Inúmeros protocolos foram desenvolvidos com o objetivo de induzir a ovulação e controlar o crescimento folicular, conseqüentemente, sincronizar o cio e ovulação para permitir o emprego do protocolo reprodutivo sem a obrigatoriedade da detecção do estro, muitas vezes não observada o que desencadeia perdas reprodutivas. Os protocolos mais empregados para

sincronização são os que associam estrógeno e progesterona, no início do protocolo hormonal, e prostaglandina, estrógeno e gonadotrofina coriônica equina, no momento da retirada da fonte do progestágeno (RIBEIRO FILHO et al., 2013).

A resposta ovariana e a fertilidade de fêmeas são os principais objetivos dos protocolos de inseminação artificial associados, anteriormente, à sincronização das ondas foliculares e do folículo dominante, a fase luteínica uniforme e a ovulação. O diâmetro do folículo ovulatório é destacado como um parâmetro essencial para que haja boas taxas de concepção e eficiência reprodutiva dos protocolos. Folículos maiores são associados a maiores concentrações de estradiol, maiores taxas de ovulação e concepção (SÁ FILHO et al., 2010).

Maiores concentrações pré-ovulatórias de estradiol promovido a partir do maior diâmetro do folículo ovulatório podem predispor maiores índices de fertilização nestes animais por promover melhores características no ambiente uterino o que favorece o transporte de espermatozoides e concepção. Também observa-se a formação de um corpo lúteo maior e, conseqüentemente, elevada habilidade em manter a gestação (BALDRIGHI, 2013; MAGALHÃES et al., 2013).

### 3.5 IATF EM BLOCOS

Como uma biotecnologia reprodutiva presente em sistemas de produção bovina tanto corte quanto leite, a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) é responsável por aumentos significativos na fertilidade destes animais. Fêmeas submetidas a tal protocolo são influenciadas pelas concentrações nas doses de hormônios utilizados, pelos indutores de ovulação e pelo diâmetro do folículo dominante no momento da inseminação (VELHO, 2015).

Qualidade e tipo de indutores de ovulação são fatores decisivos para a fertilidade de vacas submetidas à IATF. Indutores, como o cipionato de estradiol (ECP) e Benzoato de Estradiol (BE), são utilizados em protocolos de IATF como condutor a ovulações concentradas associadas a inseminações até 12 horas antes da ovulação. Ao levar em consideração que o ovócito possui viabilidade média de 6 a 12 horas, ressalta-se a importância de que a IA seja realizada neste intervalo (SAACKE, 2008).

O diâmetro do folículo ovulatório também é associado à fertilidade destes animais, relacionado diretamente com a maturidade folicular e do ovócito. O momento ideal da ovulação é definido quando há a associação entre o indutor hormonal e o diâmetro do folículo dominante. Animais que apresentam maiores folículos ovulam antes de outros com menores, mesmo quando se é administrado indutor da ovulação ao mesmo tempo. Deste modo, o diâmetro



folicular pode ser utilizado como um parâmetro para estimar a maturidade e o momento da ovulação folicular e adequar o tempo de indução dos protocolos de inseminações (PFEIFER et al., 2015a).

Apesar dos protocolos convencionais de IATF melhorarem significativamente a fertilidade, observou-se que as taxas de prenhez se estabilizaram entre 40% e 60%, visto esta problemática uma nova técnica foi desenvolvida com o objetivo de aumentar por volta de 5 a 20% este atual desempenho reprodutivo em relação a fêmeas submetidas à IATF, a IATF em Blocos (IATF-BLOCO). Tal técnica foi projetada para usufruir do potencial máximo reprodutivo destes animais. Seu diferencial é que seja utilizado de acordo com o diâmetro do folículo ovulatório, ou seja, diretamente relacionada à capacidade ovariana do animal (PFEIFER et al., 2015).

A IATF-BLOCO, em relação ao IATF convencional, proporciona algumas vantagens como a possibilidade de que os animais sejam inseminados em um momento mais próximo da ovulação, aumento das taxas de fertilidade e prenhez por inseminação, prevê a fertilidade da IATF no lote de acordo com a resposta da fêmea, possibilita diagnosticar afecções reprodutivas e selecionar ou descartar animais não responsivos ao tratamento de sincronização. Como limitações, exige a necessidade de que tal protocolo seja utilizado por técnicos especializados e que o ambiente de trabalho seja estruturado para que haja possibilidade de separar os animais no momento da inseminação (FERNANDES, 2010; PFEIFER et al., 2015).

#### **4. HORMÔNIO ANTI-MÜLLERIANO – AMH**

O hormônio anti-Mülleriano (AMH) é componente da família do fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), conhecido por suas atribuições na diferenciação sexual em machos e na fêmea, secretado por células da granulosa e cumulus, por exercer impactos inibitórios sobre a sensibilidade folicular ao hormônio folículo estimulante e recrutamento inicial de folículos. Assim, pode ser considerado como um fator inibitório de crescimento ovariano durante os estágios iniciais da foliculogênese (ZHANG, et al., 2014).

Útil como marcador endócrino da reserva folicular ovariana de folículos em fase de crescimento e é usado como um precursor da resposta ovariana a gonadotrofinas. Seus índices plasmáticos totais são correlacionados ao número de folículos antrais de 3 a 7 mm de diâmetro, os quais são principais alvos dos tratamentos superovulatórios e previsão da aptidão de fêmeas produtoras de baixo ou altos números embriões e/ou folículos após superovulação e/ou aspiração folicular, respectivamente (LAHOZ, et. al., 2012; EL-SHEIKH, 2013).

Responsável pela diferenciação sexual do embrião masculino o AMH é secretado pelas células de Sertoli o que induz à regressão do ducto Mülleriano. Em algumas espécies o AMH é verificado logo após o nascimento ou após a expressão em células da granulosa assim que se inicia o estímulo ao recrutamento de folículos primordiais. Déficits na expressão de AMH são percebidos após o estímulo do FSH. Portanto, é expresso por folículos em crescimento entre o recrutamento inicial e a seleção (VAN HOUTEN, et. al., 2010; HIRAYAMA, et al., 2017).

Apesar da significativa variação das concentrações plasmáticas de AMH entre as espécies, mínimas diferenças são observadas ao longo do ciclo estral. O AMH também pode ser utilizado como marcador responsivo a terapêutica superestimulatória, utilizada na produção de embriões. Constata-se que é possível selecionar animais que responderam melhor a biotecnologias reprodutivas a partir dos índices plasmáticos de AMH. Assim, a associação dos valores de AMH e a possível relação com a produção de embriões pode ser significativamente útil para selecionar vacas que promovam elevadas quantidades de embriões após implementação de biotecnologias reprodutivas (VISSER, & THEMMEN, 2014; LIANG, et al., 2016).

Em fêmeas, os valores plasmáticos do AMH em células da granulosa de folículos em desenvolvimento esta correlacionado diretamente na foliculogênese, fase compreendida entre o recrutamento de folículos primordiais, seguido por crescimento e diferenciação. Também constatado por sua alta concentração no fluido folicular e observado, principalmente, nos folículos antrais iniciais. Seus níveis séricos são utilizados como marcador de reserva ovariana e precursor da resposta ovariana (MAGALHÃES, et al., 2013).

#### 4.1 AMH COMO MARCADOR DA RESERVA OVARIANA

A dinâmica ovariana em fêmeas é utilizada como indicador de fertilidade. Caracterizada para quantificar e qualificar seu potencial reprodutivo relativo ao número folículos saudáveis presentes no ovário. Técnicas como a ultrassonografia, possibilita mensurar a quantidade de folículos e contagem de folículos antrais, descrita como um indicador de reserva ovariana. Déficits na contagem destes têm efeito na capacidade ovariana através de alterações nas concentrações de progesterona e gonadotrofinas que, pode prejudicar os índices reprodutivos (PFEIFFER, 2014).

O AMH é outro parâmetro utilizado como avaliação do desempenho reprodutivo, tem a capacidade de estimar a reserva ovariana e potencial fertilidade através de exames sanguíneos,

o que torna mais prático em um ambiente de produção comparado a ultrassonografia. Variações na concentração de AMH independem da dinâmica folicular e sua produção pode ser avaliada a qualquer momento (RICO, et al., 2011).

O AMH é um marcador de função ovariana em fêmeas adultas e jovens. Níveis séricos elevados de AMH são encontrados nestes indivíduos com maturação precoce do córtex adrenal, sugestivo de que o desenvolvimento folicular precede um estágio de desenvolvimento mais avançado do que o esperado para idade cronológica. Assim, concentrações de AMH podem ser correlacionadas com a função ovariana durante a puberdade com o objetivo de prever a vida reprodutiva e declínio do pool de folículos com a idade (LAHOZ, et. al., 2012).

O declínio da capacidade reprodutiva destes animais é refletido a partir do aumento da idade associado à diminuição da reserva ovariana e baixa qualidade dos folículos. Uma vez que os folículos primordiais não têm a capacidade de serem recrutados, observam-se déficits em seu crescimento e subfertilidade. O AMH constitui um marcador intraovariano do número de folículos em crescimento e, assim, indiretamente, para o aspecto quantitativo de reserva ovariana (VAN HOUTEN, et. al., 2010; HIRAYAMA, et al., 2017).

Lahoz, et. al (2012), em estudo com ovelhas, observaram que os valores de AMH pode ser correlacionado a um reflexo do início do crescimento folicular em animais pré púberes, reflete uma atividade ovariana quantitativamente diferente entre animais da mesma idade. Provavelmente, fêmeas com maior atividade ovariana de 3 a 6 meses foram mais precoces e resultantes de melhor fertilidade. Essas descobertas destacam a importância de diferenças no desenvolvimento folicular cronológico e na reserva folicular como responsável pelo futuro vida reprodutiva.

## 4.2 AMH E FERTILIDADE

Há uma restrita relação entre concentração de AMH e a fertilidade em animais domésticos. Estudos ressaltam que fêmeas com altas concentrações plasmáticas pré púberes deste hormônio possuem maior probabilidade de gestar no início do protocolo reprodutivo em relação a menores concentrações. Além disso, animais que não conceberam após duas inseminações consecutivas obtiveram baixas concentrações plasmáticas de AMH. Ressaltam-se alguns fatores que podem estar relacionados a resultados negativos como idade, estado nutricional, temporada, estado endocrinológico ou condições uterinas (LAHOZ, et. al., 2012).

Em humanos, o AMH correlaciona-se com marcadores qualitativos de ovócitos, como taxas de implantação e fertilização. Tais marcadores tem efeito direto na estrutura e morfologia ovariana e, provavelmente proporcionar efeito sobre a qualidade de oócitos ovarianos. Outros determinantes além do tamanho do folículo também precisam ser medidos e considerados (CARTER, 2016).

Pressupõe-se que, altas concentrações plasmáticas de AMH estão significativamente correlacionadas com a contagem de folículos antrais e média do número de oócitos por ovários, o que confirma, mais uma vez, que este parâmetro serve de grande valia como um parâmetro reprodutivo (CARTER, 2016; GOBIKRUSHANTH, et al., 2014).

A concentração plasmática de AMH está relacionada à ocorrência de ovulação após a aplicação de tratamentos hormonais, associado à população de folículos responsivos à gonadotropina. A concentração de AMH antes da puberdade pode ser usada como precursor da fertilidade de fêmeas adultas no primeiro acasalamento. Assim, pressupõe que após a execução de protocolos hormonais nestes animais sejam observadas maiores taxas de prenhez (LAHOZ, et al., 2012).

Bioteχνologias reprodutivas relacionadas à produção de embriões utilizam níveis séricos plasmáticos circulantes de AMH como um método simples, rápido e padronizado que pode ser aplicado na indústria de embriões. Alguns estudos, encontraram uma associação entre taxas circulantes de AMH e de fertilização, desenvolvimento de blastocisto, qualidade do embrião e prenhez (GUERREIRO, et al., 2014 ).

A concentração de AMH pode permanecer constante ao longo do ciclo estral . A praticidade é relacionada pela constatação da concentração sérica plasmática de AMH a partir de uma amostra sanguínea. Assim a avaliação desta concentração pode ser um indicador válido de uma característica como a fertilidade. Animais com elevado potencial fértil ou infértil são facilmente detectados (OKAWA, et al., 2016).

## **5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADAMS, G.P., KOT, K., GINTHER, O.J., 1993. Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 30, 259–271

AKBARINEJAD, V. et al. Nulliparous and primiparous cows produce less fertile female offspring with lesser concentration of anti-Müllerian hormone (AMH) as compared with multiparous cows. 2018.

- BARUSELLI, P.S., REIS, E.L., MARQUES, M.O., NASSER, L.F., BO, G.A., 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83, 479–486
- Batista, E. O. S., Guerreiro, B. M., Freitas, B. G., Silva, J. C. B., Vieira, L. M., Ferreira, R. M., ... Baruselli, P. S (2016). Plasma anti-Müllerian hormone as a predictive endocrine marker to select *Bos taurus* (Holstein) and *Bos indicus* (Nelore) calves for in vitro embryo production. *Domestic Animal Endocrinology*, 54, 1–9. doi:10.1016/j.domaniend.2015.08.001.
- Canovas, S., & Ross, P. J (2016). Epigenetics in preimplantation mammalian development. *Theriogenology*, 86(1), 69–79. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.02
- Carter, A. S.-, Mahboubi, K., Costa, N. N., Gillis, D. J., Carter, T. F., Neal, M. S., ... King, W. A (2016). Systemic and local anti-Müllerian hormone reflects differences in the reproduction potential of Zebu and European type cattle. *Animal Reproduction Science*, 167, 51–58. doi:10.1016/j.anireprosci.2016.02.003.
- CARTER, A. S., MAHBOUBI, K., COSTA, N. N., GILLIS, D. J., CARTER, T. F., NEAL, M. S., ... KING, W. A (2016). Systemic and local anti-Müllerian hormone reflects differences in the reproduction potential of Zebu and European type cattle. *Animal Reproduction Science*, 167, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.003>
- Claes, A., Ball, B. A., Scoggin, K. E., Esteller-Vico, A., Kalmar, J. J., Conley, A. J., ... Troedsson, M. H. T (2014). The interrelationship between anti-Müllerian hormone, ovarian follicular populations and age in mares. *Equine Veterinary Journal*, 47(5), 537–541. doi:10.1111/evj.12328
- El-Sheikh Ali, H., Kitahara, G., Nibe, K., Yamaguchi, R., Horii, Y., Zaabel, S., & Osawa, T (2013). Plasma anti-Müllerian hormone as a biomarker for bovine granulosa-theca cell tumors: Comparison with immunoreactive inhibin and ovarian steroid concentrations. *Theriogenology*, 80(8), 940–949. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.07.02
- FERREIRA, R. M. et al. Effect of different doses of equine chorionic gonadotropin on follicular and luteal dynamics and P/AI of high-producing Holstein cows. *Animal Reproduction Science*, v. 140, n. 140, p. 26–33, 2013.
- Gobikrushanth, M., Dutra, P., Felton, C., Bruinjé, T., Colazo, M., Butler, S., Ambrose, D. (2014). The association between Anti-Müllerian Hormone concentrations , antral follicle count and fertility measures in dairy cows The association between Anti-Müllerian Hormone concentrations , antral follicle count and fertility measures in dairy cows. *J. Anim. Sci. Vol. 94, E-Suppl. 5/J. Dairy Sci. Vol. 99, E-Suppl. 1.*
- GRÖHN, Y. T, RAJALA-SCHULTZ, P.J.. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 605-614, 2000.
- Guerreiro, B. M., Batista, E. O. S., Vieira, L. M., Sá Filho, M. F., Rodrigues, C. A., Castro Netto, A., Baruselli, P. S (2014). Plasma anti-müllerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. *Domestic Animal Endocrinology*, 49, 96–104. doi:10.1016/j.domaniend.2014.07.002

HIRAYAMA, H., NAITO, A., FUKUDA, S., FUJII, T., ASADA, M., INABA, Y., ... KAGEYAMA, S (2017). Long-term changes in plasma anti-Müllerian hormone concentration and the relationship with superovulatory response in Japanese Black cattle. *Journal of Reproduction and Development*, 63(1), 95–100. doi:10.1262/jrd.2016-019

Lahoz, B., Alabart, J. L., Monniaux, D., Mermillod, P., & Folch, J (2012). Anti-Müllerian hormone plasma concentration in prepubertal ewe lambs as a predictor of their fertility at a young age. *BMC Veterinary Research*, 8. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-118>

Liang, A., Salzano, A., D'Esposito, M., Comin, A., Montillo, M., Yang, L., ... Gasparri, B (2016). Anti-Müllerian hormone (AMH) concentration in follicular fluid and mRNA expression of AMH receptor type II and LH receptor in granulosa cells as predictive markers of good buffalo ( *Bubalus bubalis* ) donors. *Theriogenology*, 86(4), 963–970. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.03.02

Magalhães, R., Rocha, P., Maria, A., Vasconcelos, C., Lima, L., Araújo, V., Bernuci, M., Paula, A., Rodrigues, R., Figueiredo, J. (2013). Regulation of Ovarian Function : Structural Characterization and Role of Anti-Müllerian Hormone ( AMH ). *Acta Scientiae Veterinariae*. Doi: 2890/289031817044.

MARTINS, J. P. N., WANG, D., MU, N., ROSSI, G. F., MARTINI, A. P., MARTINS, V. R., & PURSLEY, J. R (2018). Level of circulating concentrations of progesterone during ovulatory follicle development affects timing of pregnancy loss in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. doi:10.3168/jds.2018-14410

Okawa, H., Tomiki, M., Ishida, T., Kawaguchi, H., Wijayagunawardane, M. P. B., & Takagi, M (2016). Clinical diagnosis of bovine granulosa cell tumour in a Holstein cow using plasma anti-Müllerian hormone concentration: a case report. *Journal of Applied Animal Research*, 45(1), 529–532. doi:10.1080/09712119.2016.1220948

OLIVEIRA JUNIOR, J. S. DE et al. Antral follicles population in heifers and cows of Nelore and Girolando breeds. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 36, n. 6, p. 3741, 2012.

PEREIRA, L., FERREIRA, A., VALE, W., SERIQUE, L., NEVES, K., MORINI, A., ... MINERVINO, A (2018). Effect of body condition score and reuse of progesterone-releasing intravaginal devices on conception rate following timed artificial insemination in Nelore cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(3), 624–628. doi:10.1111/rda.13150

PFEIFER, L. F. M. et al. Timed artificial insemination in blocks: A new alternative to improve fertility in lactating beef cows. *Animal Reproduction Science*, v. 163, p. 89–96, 2015.

Pfeiffer, K. E., Jury, L. J., & Larson, J. E (2014). Determination of anti-Müllerian hormone at estrus during a synchronized and a natural bovine estrous cycle. *Domestic Animal Endocrinology*, 46, 58–64. doi:10.1016/j.domaniend.2013.05.004

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2017.

R. S. Bisinotto, E. S. Ribeiro, L. T. Martins, R. S. Marsola, L. F. Greco, M. G. Favoreto, C. A. Risco, W. W. Thatcher, and J. E. P. Santos (2010). Effect of interval between induction of ovulation and artificial insemination (AI) and supplemental progesterone for resynchronization on fertility of dairy cows subjected to a 5-d timed AI program. *J. Dairy Sci.* 93 :5798–5808 doi: 10.3168/jds.2010-3516

RIBEIRO FILHO, A. D. L. et al. DIÂMETRO DO FOLÍCULO NO MOMENTO DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO E TAXA DE CONCEPÇÃO EM VACAS NELORE. *Ciência Animal Brasileira*, v. 14, n. 4, p. 501–507, 17 dez. 2013.

Rico, C., Médigue, C., Fabre, S., Jarrier, P., Bontoux, M., Clément, F., & Monniaux, D (2011). Regulation of Anti-Müllerian Hormone Production in the Cow: A Multiscale Study at Endocrine, Ovarian, Follicular and Granulosa Cell Levels. *Biology of Reproduction*, 84(3), 560-571. Doi:10.1095/biolreprod.110.088187

Rivera, G.M., Goni, C.G., Chaves, M.A., Ferrero, S.B., Bo, G.A., 1998. Ovarian follicular wave synchronization and induction of ovulation in postpartum beef cows. *Theriogenology* 49, 1365–1375.

ROSA, GONÇALO MORAIS SALVADOR TELES DA. EFEITO DO DIÂMETRO FOLICULAR E DA CONDIÇÃO CORPORAL SOBRE A TAXA DE GESTAÇÃO EM VACAS BOS INDICUS SUJEITAS A PROGRAMA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO. LISBOA, 2015. 107 p. Dissertação (Faculdade de Medicina Veterinária) - UNIVERSIDADE DE LISBOA.

SÁ FILHO, M. F. et al. 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*, 2010.

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, 2010.

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

SANTOS, A.S., OLIVEIRA, M.A.L., CALDAS, J.G.L., LIMA, P.F., DONATO, I.V., 2001a. Ovarian follicular dynamics of five-eighths Girolando cows. *Reprod. Dom. Anim.* 36, 207–210.

SANTOS, G.; LOPES, M. A. CUSTOS DE PRODUÇÃO DE FÊMEAS BOVINAS LEITEIRAS DO NASCIMENTO AO PRIMEIRO PARTO. v. 15, n. 1, p. 11–19, 2014.

SIROIS, J., FORTUNE, J.E., 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.* 39, 308–317.

- SOUZA, A.H., VIECHNIESKI, S., LIMA, F.A., SILVA, F.F., ARAUJO, R., BO, G.A., WILTBANK, M.C., BARUSELLI, P.S., 2009. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology* 72, 10–21.
- Van Houten, E. L. A. F., Themmen, A. P. N., & Visser, J. A (2010). Anti-Müllerian hormone (AMH): Regulator and marker of ovarian function. *Annales d'Endocrinologie*, 71(3), 191–197. doi:10.1016/j.ando.2010.02.016
- VASCONCELOS, J. L. M.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H. N.; GUNTHER, J. G.; WILTBANK, M. C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*, v. 56, p. 307-314, 2001.
- Visser, J. A., & Themmen, A. P. N (2014). Role of anti-Müllerian hormone and bone morphogenetic proteins in the regulation of FSH sensitivity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), 460–465. doi:10.1016/j.mce.2013.08.012
- WASHBURN, S.P. et al. Trends in reproductive performance in southeastern and Jersey DHI herds. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p.244-251, 2002.
- Zhang, Y., Shao, L., Xu, Y., Cui, Y., Liu, J., & Chian, R.-C (2014). Effect of Anti-Müllerian Hormone in Culture Medium on Quality of Mouse Oocytes Matured In Vitro. *PLoS ONE*, 9(6), e99393. doi:10.1371/journal.pone.0099393



## 6 CAPÍTULO 1: Artigo submetido a revista *Animal Reproduction Science*

### Taxa de concepção de vacas Girolando submetidas à IATF em blocos

Antonio Matos Fraga Junior<sup>a1</sup>, Urias Fagner Santos Nascimento<sup>b</sup>, Gustavo Ferrer Carneiro<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE, Brasil

<sup>b</sup> Universidade Federal de Sergipe, UFS, Av. marechal Rondon, SN, Rosa Else – CEP: 49100-000 – São Cristovão/SE, Brasil

<sup>1</sup>e-mail: fragaam@gmail.com

#### Resumo

Uma das principais biotecnologias para aperfeiçoar os índices reprodutivos e assim gerar maior retorno econômico para a produção de bovinos é a inseminação artificial, porém estes índices ainda se encontram baixos, ocasionados, principalmente, por problemas na detecção do estro, puberdade tardia, e anestro pós-parto que afetam o desempenho reprodutivo. O tamanho do folículo ovulatório no momento da inseminação dentre outros fatores acabam influenciando a taxa de concepção e a eficiência reprodutiva em programas de IATF. Deste modo, fazer uma avaliação prévia do diâmetro do folículo dominante no momento da IATF pode ser uma alternativa para estimar o momento da ovulação e assim ajustar o tempo da IA, buscando melhorar os índices de fertilidade. Objetivou-se com este trabalho avaliar a influência da IA em blocos, na taxa de concepção em fêmeas da raça Girolando. Foram utilizadas 327 vacas da raça Girolando (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) no experimento. As fêmeas foram submetidas aos seguintes protocolos de sincronização: para as fêmeas primíparas, secundíparas e pluríparas o protocolo iniciou-se no D0 com a aplicação do dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®, 1,9 g, Zoetis) e aplicação intramuscular (IM) de 2 mg de benzoato de estradiol (Gonadiol®, 2 mL, Zoetis); no D7 aplicação (IM) de 25 mg de dinoprost (Lutalyse® 5 mL, Zoetis); D9: aplicação de (IM) de 12,5 mg de dinoprost (Lutalyse®, 2,5 mL, Zoetis) e 1 mg de cipionato de estradiol (E.C.P® 0,5 mL Zoetis). Para as nulíparas as modificações no protocolo anterior são no D7 aplicação (IM) de apenas 12,5 mg de dinoprost (Lutalyse®, 2,5mL) e D9- aplicação de (IM) de 12,5 mg de dinoprost (Lutalyse®, 2,5 mL) e 0,6 mg de cipionato de estradiol (E.C.P® 0,3 mL). Decorridos onze dias do início do protocolo (D11) os animais foram divididos de forma aleatória em dois grupos. Grupo Controle (n: 150) e Grupo Bloco (n:179). Foram iniciadas, uma hora antes, do previsto que seria a IATF convencional, as avaliações ultrassonográficas. Após a avaliação ultrassonográfica os animais do Grupo Bloco foram divididos em 4 blocos de acordo com o tamanho do folículo dominante. Todos os procedimentos estatísticos foram desenvolvidos com 95% de confiança com o software R. A taxa de concepção do Grupo Controle foi de 42,28% e do Grupo Bloco foi de 70,99%, tendo uma diferença positiva de 28,71% (p < 0,05). Nesse estudo foi possível avaliar que a IATF em bloco foi capaz de elevar a taxa de concepção quando comparado ao grupo controle.

**Palavras chave:** Folículo dominante. Ovulação. Ultrassonografia

## 1. Introdução

A reprodução bem como a produção de leite são os fatores que irão determinar a lucratividade em um sistema de produção leiteira. A produção por vaca tem aumentado devido a combinação de manejo, nutrição e intensa seleção genética (OLIVEIRA, 2012). Somando-se a isso, a demanda mundial de lácteos tem se elevado consideravelmente e esse cenário, conseqüentemente, tem impulsionado a produção global de leite.

No Brasil, a produção de leite deve aumentar 27,6% até 2025, conforme projeção do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018). Se confirmado o aumento, a produção deve chegar a 36,75 bilhões de litros em um ano. Em 2013, a produção leiteira foi de 35 bilhões de litros, sendo 35% a mais que os 26 bilhões contabilizados em 2016.

Em contraponto o impacto negativo deste aumento de produção é a redução da fertilidade e o aumento da incidência de problemas reprodutivos (GRÖHN; RAJALA-SCHULTZ, 2000). Washburn et al (2002) avaliaram que a taxa de concepção de animais da raça Holandesa caiu de 53% no final da década de 70 para 35% no final da década de 90. Esta diminuição da eficiência reprodutiva está associada tanto ao melhoramento genético quanto às práticas modernas que levam a um aumento da produção de leite por animal.

Outro ponto a ser levado em consideração é o custo de produção para as novilhas de reposição. A recria é uma fase onerosa ao sistema de produção, pois, durante esse período, o produtor despense muitos recursos que poderiam ser aplicados em outra área, como, por exemplo, aquisição de tecnologias, manejo de pastagem, melhoramento genético etc. Além disso, a atividade de criação de animais de reposição ocupa uma área significativa do sistema de produção de leite e não temos como assegurar que esta futura matriz terá uma alta eficiência reprodutiva (SANTOS; LOPES, 2014).

Uma das principais biotecnologias para aperfeiçoar os índices reprodutivos e assim gerar maior retorno econômico para a produção de bovinos é a inseminação artificial (IA) (BARUSELLI et al., 2012), porém estes índices ainda se encontram baixos, ocasionados, principalmente, por problemas na detecção do estro, puberdade tardia, e anestro pós-parto que afetam o desempenho reprodutivo, especialmente em regiões de clima tropical (BARUSELLI et al., 2004; LARSON et al., 2006). O uso da IATF traz uma série de vantagens, tais como: controle sobre os momentos da IA, com um maior número de vacas inseminadas em um menor espaço de tempo (BARUSELLI, 2004).

O tamanho do folículo ovulatório no momento da IA dentre outros fatores acabam influenciando a taxa de concepção e a eficiência reprodutiva em programas de IATF (SFILHO et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2010). Sá Filho et al (2010) alegaram que quanto maior o tamanho do folículo ovulatório maior a probabilidade de ovulação e concepção, pois estes relacionam-se com maiores níveis de estrógeno o que promovem mudanças no ambiente uterino e melhoram o transporte espermático, estes efeitos, favorecem a concepção (SÁ FILHO et al., 2011).

Por outro lado, Lonergan et al (2013) afirmaram que o maior diâmetro do folículo ovulatório também se relaciona com o diâmetro do corpo lúteo formado, ou seja, a ovulação de folículos de menor diâmetro leva à formação de corpo lúteo de menor volume e, conseqüentemente, baixa capacidade de produção de progesterona (P4) e desenvolvimento embrionário insuficiente, promovendo assim, uma redução na fertilidade. Deste modo, fazer uma avaliação prévia do diâmetro do folículo dominante no momento da IATF poderá ser uma alternativa para estimar o momento da ovulação e assim ajustar o tempo da IA, buscando melhorar os índices da fertilidade (PFEIFER, 2015). Objetivou-se com esta pesquisa avaliar a influência da inseminação artificial em blocos na taxa de concepção em fêmeas da raça Girolando.

## 2. Material e métodos

O experimento foi realizado na Fazenda Diva, localizada no município de Boquim, região centro-sul de Sergipe, entre os meses de novembro de 2016 a março de 2017. Foram utilizadas 327 vacas da raça Girolando (*Bos taurus indicus x Bos taurus taurus*), sendo 35 nulíparas, 48 primíparas, 107 secundíparas e 137 pluríparas, com graus de sangue variando de 1/2 a 7/8 (Holandês x Gir), índice de escore corporal médio de 2,75 (IEC – escala de 1 a 5) (HOUGHTON et al., 1990).

As fêmeas eram manejadas, em sistema de pastejo rotacionado, em piquetes com pastagem predominante de *Panicum maximum* (cv. Mombaça), com suplementação de silagem de milho e concentrado à base de milho moído, soja e núcleo mineral de acordo com a categoria, uma vez por dia. A fazenda obedece ao calendário sanitário oficial e todas as fêmeas foram imunizadas contra as doenças da esfera reprodutiva. Todas as vacas, previamente, ao início do protocolo de IATF, foram submetidas a exame clínico-ginecológico. Foram selecionadas para

esse trabalho as vacas sem histórico de aborto e que não apresentaram, no momento da avaliação, anormalidades do trato reprodutivo.

As fêmeas foram submetidas aos seguintes protocolos de sincronização: para as fêmeas primíparas, secundíparas e pluríparas o protocolo iniciou-se no D0 com a aplicação do dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®, 1,9 g, Zoetis) e aplicação intramuscular (IM) de 2 mg de benzoato de estradiol (Gonadiol®, 2 mL, Zoetis); no D7 aplicação (IM) de 25 mg de dinoprost (Lutalyse® 5 mL, Zoetis); D9: aplicação de (IM) de 12,5 mg de dinoprost (Lutalyse®, 2,5 mL, Zoetis) e 1 mg de cipionato de estradiol (E.C.P® 0,5 mL Zoetis).

Para as nulíparas as modificações no protocolo anterior são no D7 aplicação (IM) de apenas 12,5 mg de dinoprost (Lutalyse®, 2,5mL) e D9- aplicação de (IM) de 12,5 mg de dinoprost (Lutalyse®, 2,5 mL) e 0,6 mg de cipionato de estradiol (E.C.P® 0,3 mL).

Decorridos onze dias do início do protocolo (D11) os animais foram divididos de forma aleatória em dois grupos. Grupo Controle (n: 150) e Grupo Bloco (n:179). As fêmeas do Grupo Controle foram todas inseminadas conforme protocolo de inseminação convencional, já as do grupo bloco igual para todas as categorias, foi iniciado uma hora antes do horário previsto que seria a IATF convencional, com as avaliações ultrassonográficas utilizando o aparelho (Kaixin, KX2600 VET) com transdutor linear multifrequencial de 4,5 a 6,5 MHz, sendo todas realizadas pelo mesmo técnico.

Após a avaliação ultrassonográfica os animais do Grupo Bloco foram divididos em 4 blocos de acordo com o tamanho do folículo dominante: no bloco 0, os animais foram inseminados no momento da avaliação e apresentavam folículo com tamanho maior ou igual a 15 mm ; no bloco 1, foram inseminados 6 horas após a avaliação, os animais com diâmetro folicular de 13 a 14,9 mm; bloco 2, foram inseminados 24 horas após a avaliação os animais com diâmetro folicular de 10 a 12,9 mm; já no bloco 3, os animais com diâmetro folicular entre 8 e 9,9 mm foram inseminados 30 horas após as avaliações. Animais com folículos menores que 8 mm foram considerados como não responsivos e não foram inseminados (PFEIFER et. al, 2015).

Seguindo as recomendações de Ribeiro Filho et al (2013), as inseminações foram realizadas por um mesmo técnico, com a finalidade de se evitar o efeito do inseminador.

Para a realização das inseminações, utilizou-se sêmen criopreservado, de um único touro da raça Girolando, descongelado a 37°C por 30 segundos, com o uso de um descongelador eletrônico (BioGenetic, BIO-DS3). O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a IATF, com auxílio de ultrassonografia transretal, utilizando o aparelho (Kaixin, KX2600 VET)

com transdutor linear multifrequencial de 4,5 a 6,5 MHz, sendo todas realizadas pelo mesmo técnico.

O critério de diagnóstico de gestação positivo foi a presença da vesícula embrionária com um embrião viável, apresentando batimentos cardíacos. Os animais de cada categoria foram divididos em gestantes e não gestantes.

Para a análise dos fatores genéticos, fisiológicos e ambientais associados à taxa de prenhez, variável dependente (VD), foram utilizados os dados do diâmetro do folículo dominante (DFD), a Categoria (Ca), e o bloco de inseminação (BI) como variáveis independentes (VI). Realizou-se estudo descritivo das variáveis investigadas determinando sua frequência absoluta e relativa em forma de porcentagem mediante análise univariada de Chi quadrado, onde cada variável independente foi cruzada com a variável dependente. Para verificar a influência das VI na taxa de prenhez, utilizou-se o modelo linear geral de acordo a metodologia de Buell et al (2015). As comparações entre os níveis da CA e os do BI foram realizadas mediante contrastes ortogonais. Todos os procedimentos estatísticos foram desenvolvidos com 95% de confiança com o software R (R CORE TEAM, 2017).

O experimento seguiu as recomendações da legislação brasileira, sobre procedimentos de uso científico de animais (Lei nº 11.794 / 2008), com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade Pio Décimo sob a licença nº 10/2016.

### **3. Resultados e discussão**

Biotechnologias reprodutivas aplicadas em vacas são estudadas com intuito de promover melhores resultados. Inovações medicamentosas e manejo destas fêmeas durante a administração destes protocolos são de suma importância para elevação das taxas além de potencializar a função e atividade ovariana (CARTER, A. S., et al., 2016).

A IATF em blocos é considerada uma alternativa para aprimorar a taxa de concepção em vacas. Diante desta perspectiva, algumas pesquisas avaliam mudanças no manejo e inseminação de acordo com o diâmetro do folículo pré-ovulatório associadas às taxas de concepção, prenhez e gestação (PFEIFER, L. et al., 2015).

Os resultados evidenciam que a IA em bloco obteve um incremento de 28,71% na taxa de concepção em comparação ao grupo controle. Houveram efeitos positivos significativos na relação do diâmetro do folículo ovulatório no momento da IA e a taxa de concepção no presente

estudo ( $p < 0,05$ ). Estes resultados estão de acordo com um estudo de SÁ FILHO et al, (2010), onde observaram que a presença de folículos com maior diâmetro estão associados com a alta ocorrência de estro, maior capacidade ovulatória e maior taxa de gestação em vacas *Bos indicus*.

Entretanto, como relatado por Santos et al (2001), vários estudos demonstram que o diâmetro do FOL e o tempo de ovulação das vacas Girolando são semelhantes aos observados para *Bos taurus* (Sirois e Fortune, 1988; Adams et al., 1993). Rivera et al., 1998) e *Bos indicus* (Baruselli et al., 2004; Souza et al., 2009).

Os valores da taxa de concepção estão expressos na tabela 1.

Tabela 1 - Taxa de concepção de fêmeas Girolando Inseminadas em tempo fixo e em blocos

	Grupo Controle	Grupo Bloco
Não gestante (%)	57,72 (86/149)a	29,01 (47/162)b
Gestante (%)	42,28 (63/149)a	70,99 (115/162)b

Letras diferentes na mesma coluna, diferem entres si estatisticamente ( $P < 0,05$ )

As médias do diâmetro do folículo dominante de acordo com o grupo estão apresentados abaixo (tabela 2). Relacionado a esses resultados, as fêmeas que ovulam folículos de maior diâmetro apresentam maiores concentrações circulantes de estradiol no momento da ovulação (VASCONCELOS et al., 2001). As concentrações de estradiol no momento da inseminação podem influenciar a fertilização, promovendo alterações no ambiente uterino, desempenhando um papel importante no transporte e na viabilidade dos espermatozoides até a ovulação e fertilização (SÁ FILHO, 2011).

Além disso, o maior diâmetro do folículo ovulatório também se relaciona com o diâmetro do CL formado, formando assim um CL de maior diâmetro e, conseqüentemente, com elevada habilidade em manter a gestação por produzir elevados níveis e progesterona (LONERGAN et al., 2013).

Tabela 2 - Média e desvio padrão do diâmetro do folículo dominante no D11 (mm)

Grupo bloco	FOL
Bloco 0	16,37±1,77
Bloco 1	13,62±0,62
Bloco 2	11,72±0,84
Bloco 3	9,10±0,66

Tabela 3 - Média do diâmetro do folículo dominante no D11 (mm) por categoria animal

Categoria	FOL
Nulípara	12,22±3,32
Primípara	13,45±2,76
Secundípara	12,73±2,32
Plurípara	13,50±2,67

Em seu estudo, ROSA (2015) relatou que a média do diâmetro do FOL foi maior nas fêmeas multíparas em comparação com as primíparas, resultado diferente com o observado nesse estudo onde não houve diferença no tamanho do FOL entre as categorias estudadas. Não se encontrou diferença significativa quando se comparou a taxa de concepção entre os blocos (tabela 4) e a categoria animal (tabela 5).

Tabela 4 - Taxa de concepção entre os Blocos experimentais

	Vazia	Prenhe
Bloco 0	27,91 (12/43)	72,09 (31/43)
Bloco 1	22,73 (10/44)	77,27 (34/44)
Bloco 2	26,42 (14/53)	73,58 (39/53)
Bloco 3	50,00 (11/22)	50,00 (11/22)

Akbarinejad et al (2018), demonstraram que vacas nulíparas possuem menor desempenho reprodutivo e tamanho de reservas ovarianas diminuídas demonstradas em menores taxas de fertilidade. Resultado não condizente com o presente estudo, o qual não demonstrou diferenças significativas de concepção e nem prenhez entre fêmeas nulíparas, primíparas, secundíparas e pluríparas. Como as vacas utilizadas nesse trabalho acumulavam um longo período de dias pós-parto e eram submetidas ao mesmo manejo sanitário e nutricional, pode ser que todas se encontrassem com as reservas ovarianas em níveis semelhantes, no início desse experimento, e por isso conseguiram obter taxas semelhantes de concepção e prenhez.

Nesse trabalho, o fato das vacas apresentarem escore médio de 2,75 mostra que os animais possuíam reservas nutricionais significativas e estavam aptas para a serem submetidas ao protocolo de IATF, sendo que as mesmas nem sofriam pela desnutrição, nem possuíam alto acúmulo de gordura peri-ovariana e isso podem explicar o sucesso do trabalho (PEREIRA, L., et al., 2018).

Vacas leiteiras multíparas são mais propensas a emprenhar com o uso de programas de IATF (Ferraz Júnior et al., 2016; Sa Filho et al., 2013). Pfeifer, L. et al., (2015) avaliaram que vacas de corte multíparas inseminadas em tempo fixo em blocos obtiveram maior taxa de concepção em relação aos demais grupo, resultado diferente ao presente estudo já que não foi encontrada diferenças entre as categorias estudadas.

Tabela 5 - Taxa de concepção por categoria animal

CATEGORIA	Vazia	Prenhe
Nulípara	30,77 (4/13)	69,23 (9/13)
Primípara	52,38 (11/21)	47,62 (10/21)
Secundípara	27,59 (16/58)	72,41 (42/58)
Plurípara	22,86 (16/70)	77,14 (54/70)

Nesse trabalho, apesar de não terem sido dosadas as taxas de progesterona circulantes o fato dos animais apresentarem folículos pré-antrais com tamanho consideravelmente grandes, influenciou no sucesso das taxas de gestação, haja vista que há uma correlação entre tamanho do FD e corpos lúteos, o que produziria mais progesterona (MARTINS, J. P. N., et al., 2018).

#### 4. Conclusão

Concluimos que a inseminação artificial em bloco em fêmeas da raça Girolando foi capaz de elevar a taxa de concepção em relação ao grupo controle. Portanto o uso desta técnica pode ser um procedimento eficaz para melhorar os resultados de fertilidade com IATF.

#### 5. Referência bibliográficas

- ADAMS, G.P., KOT, K., GINTHER, O.J., 1993. Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 30, 259–271
- AKBARINEJAD, V. et al. Nulliparous and primiparous cows produce less fertile female offspring with lesser concentration of anti-Müllerian hormone (AMH) as compared with multiparous cows. 2018.
- BARUSELLI, P.S., REIS, E.L., MARQUES, M.O., NASSER, L.F., BO, G.A., 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83, 479–486



- CARTER, A. S., MAHBOUBI, K., COSTA, N. N., GILLIS, D. J., CARTER, T. F., NEAL, M. S., ... KING, W. A (2016). Systemic and local anti-Mullerian hormone reflects differences in the reproduction potential of Zebu and European type cattle. *Animal Reproduction Science*, 167, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.003>
- FERREIRA, R. M. et al. Effect of different doses of equine chorionic gonadotropin on follicular and luteal dynamics and P/AI of high-producing Holstein cows. *Animal Reproduction Science*, v. 140, n. 140, p. 26–33, 2013.
- GRÖHN, Y. T, RAJALA-SCHULTZ, P.J.. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 605-614, 2000.
- MARTINS, J. P. N., WANG, D., MU, N., ROSSI, G. F., MARTINI, A. P., MARTINS, V. R., & PURSLEY, J. R (2018). Level of circulating concentrations of progesterone during ovulatory follicle development affects timing of pregnancy loss in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*.doi:10.3168/jds.2018-14410
- OLIVEIRA JUNIOR, J. S. DE et al. Antral follicles population in heifers and cows of Nelore and Girolando breeds. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 36, n. 6, p. 3741, 2012.
- PEREIRA, L., FERREIRA, A., VALE, W., SERIQUE, L., NEVES, K., MORINI, A., ... MINERVINO, A (2018). Effect of body condition score and reuse of progesterone-releasing intravaginal devices on conception rate following timed artificial insemination in Nelore cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(3), 624–628. doi:10.1111/rda.13150
- PFEIFER, L. F. M. et al. Timed artificial insemination in blocks: A new alternative to improve fertility in lactating beef cows. *Animal Reproduction Science*, v. 163, p. 89–96, 2015.
- R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2017.
- RIBEIRO FILHO, A. D. L. et al. DIÂMETRO DO FOLÍCULO NO MOMENTO DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO E TAXA DE CONCEPÇÃO EM VACAS NELORE. *Ciência Animal Brasileira*, v. 14, n. 4, p. 501–507, 17 dez. 2013.
- Rivera, G.M., Goni, C.G., Chaves, M.A., Ferrero, S.B., Bo, G.A., 1998. Ovarian follicular wave synchronization and induction of ovulation in postpartum beef cows. *Theriogenology* 49, 1365–1375.
- ROSA, GONÇALO MORAIS SALVADOR TELES DA. EFEITO DO DIÂMETRO FOLICULAR E DA CONDIÇÃO CORPORAL SOBRE A TAXA DE GESTAÇÃO EM VACAS BOS INDICUS SUJEITAS A PROGRAMA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

EM TEMPO FIXO. LISBOA, 2015. 107 p. Dissertação (Faculdade de Medicina Veterinária) - UNIVERSIDADE DE LISBOA.

SÁ FILHO, M. F. et al. 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*, 2010.

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 progestinbased protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Animal Reproduction Science* , v. 120, p. 23-30, 2010.

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

SANTOS, A.S., OLIVEIRA, M.A.L., CALDAS, J.G.L., LIMA, P.F., DONATO, I.V., 2001a. Ovarian follicular dynamics of five-eighths Girolando cows. *Reprod. Dom. Anim.* 36, 207–210.

SANTOS, G.; LOPES, M. A. CUSTOS DE PRODUÇÃO DE FÊMEAS BOVINAS LEITEIRAS DO NASCIMENTO AO PRIMEIRO PARTO. v. 15, n. 1, p. 11–19, 2014.

SIROIS, J., FORTUNE, J.E., 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.* 39, 308–317.

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

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

WASHBURN, S.P. et al. Trends in reproductive performance in southeastern and Jersey DHI herds. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p.244-251, 2002.

## 7 CAPÍTULO 2

### Avaliação da influência do hormônio Anti-Mulleriano (AMH) na taxa de concepção e produção leiteira de fêmeas da raça Girolando

Antonio Matos Fraga Junior<sup>a1</sup>, Gustavo Ferrer Carneiro<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos  
- CEP: 52171-900 - Recife/PE, Brasil

<sup>1</sup>e-mail: fragaam@gmail.com

#### Resumo

O hormônio anti-Mülleriano (AMH) é componente da família do fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), conhecido por suas atribuições na diferenciação sexual em machos e fêmeas, secretado por células da granulosa e cumulus, por exercer influência sobre a sensibilidade folicular ao hormônio FSH e recrutamento inicial de folículos. Em função da sua grande relação com a gônada feminina, vem sendo demonstrado um interesse crescente neste hormônio como marcador da reserva folicular ovariana. O tamanho do folículo ovulatório no momento da inseminação dentre outros fatores acabam influenciando a taxa de concepção e a eficiência reprodutiva em programas de IATF. Deste modo, a avaliação prévia do diâmetro do folículo dominante no momento da IATF pode ser uma alternativa para estimar o momento da ovulação e assim ajustar o tempo da IA buscando melhorar os índices de fertilidade. Objetivou-se com este trabalho avaliar a correlação entre concentração do hormônio antimulleriano com a taxa de concepção em vacas Girolando inseminadas em tempo fixo em blocos. Foram utilizadas 327 vacas da raça Girolando (*Bos taurus indicus x Bos taurus taurus*) no experimento. As fêmeas foram submetidas aos seguintes protocolos de sincronização: para as fêmeas primíparas, secundíparas e pluríparas o protocolo iniciou-se no D0 com a aplicação do dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®, 1,9 g, Zoetis) e aplicação intramuscular (IM) de 2 mg de benzoato de estradiol (Gonadiol®, 2 mL, Zoetis); no D7 aplicação (IM) de 25 mg de dinoprost (Lutalyse® 5 mL, Zoetis); D9: aplicação de (IM) de 12,5 mg de dinoprost (Lutalyse®, 2,5 mL, Zoetis) e 1 mg de cipionato de estradiol (E.C.P® 0,5 mL Zoetis). Para as nulíparas as modificações no protocolo anterior são no D7 aplicação (IM) de apenas 12,5 mg de dinoprost (Lutalyse®, 2,5mL) e D9- aplicação de (IM) de 12,5 mg de dinoprost (Lutalyse®, 2,5 mL) e 0,6 mg de cipionato de estradiol (E.C.P® 0,3 mL). Decorridos onze dias do início do protocolo (D11) os animais foram divididos de forma aleatória em dois grupos. Grupo Controle (n: 150) e Grupo Bloco (n:179). Após a avaliação ultrassonográfica os animais do Grupo Bloco foram divididos em 4 blocos de acordo com o tamanho do folículo dominante. As coletas de sangue foram realizadas no dia 11 do protocolo, pela veia coccígea, com tubo vacuntainer heparinizado. Após a coleta, o sangue foi centrifugado (900Xg durante 15 minutos) para a retirada do plasma, que foi armazenado em freezer a -80 °C até a realização das análises. As concentrações séricas de AMH (ng/mL) foram analisadas utilizando o Bovine Anti-Mullerian hormone (Webster, TX). O ensaio tem um intervalo analítico mensurável de 20 ng/mL-0.312 ng/mL. Os coeficientes de variação intraensaio foi de  $\leq 8\%$  e interensaio foram  $\leq 12\%$ . Todos os procedimentos estatísticos foram desenvolvidos com 95% de confiança com o software R. A concentração de AMH não influenciou categoria animal, bloco ou diâmetro do folículo dominante ( $p > 0,05$ ). Porém, este hormônio foi capaz de influenciar ( $p < 0,05$ ) a produção de leite. Concluímos que a dosagem do AMH não pode ser utilizada como um marcador para determinação da fertilidade em vacas da raça Girolando. Maiores estudos serão necessários visando a utilização do AMH como marcador molecular para produção de leite.

**Palavras chave:** AMH. Fertilidade. Folículo dominante. Ovulação. Ultrassonografia.

## 1. Introdução

A reprodução bem como a produção de leite são os fatores que irão determinar a lucratividade em um sistema de produção leiteira. A produção por vaca tem aumentado devido a combinação de manejo, nutrição e intensa seleção genética (OLIVEIRA, 2012). Somando-se a isso, a demanda mundial de lácteos tem se elevado consideravelmente e esse cenário, conseqüentemente, tem impulsionado a produção global de leite.

No Brasil, a produção de leite deve aumentar 27,6% até 2025, conforme projeção do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018). Se confirmado o aumento, a produção deve chegar a 36,75 bilhões de litros em um ano. Em 2013, a produção leiteira foi de 35 bilhões de litros, sendo 35% a mais que os 26 bilhões contabilizados em 2016.

Em contraponto, o impacto negativo deste aumento de produção é a redução da fertilidade e o aumento da incidência de problemas reprodutivos (GRÖHN; RAJALA-SCHULTZ, 2000). Washburn et al (2002) avaliaram que a taxa de concepção de animais da raça Holandesa caiu de 53% no final da década de 70 para 35% no final da década de 90. O processo de melhoramento genético quando muito intenso ou quando realizado com endogamia ou consanguinidade, pode levar a seleção fixação de genes com alelo recessivo deletério em uma população e, assim, afetar em características produtivas de animais, como por exemplo na reprodução ou levando ao esgotamento da variabilidade genética num rebanho (Torres Júnior et al., 2013). Esta diminuição da eficiência reprodutiva está associada tanto ao melhoramento genético quanto às práticas modernas que levam a um aumento da produção de leite por animal.

Outro ponto a ser levado em consideração é o custo de produção para as novilhas de reposição. A recria é uma fase onerosa ao sistema de produção, pois, durante esse período, o produtor despense muitos recursos que poderiam ser aplicados em outra área, como, por exemplo, aquisição de tecnologias, manejo de pastagem, melhoramento genético etc. Além disso, a atividade de criação de animais de reposição ocupa uma área significativa do sistema de produção de leite e não temos como assegurar que esta futura matriz terá uma alta eficiência reprodutiva (SANTOS; LOPES, 2014).

Marcadores genéticos podem ser usados para buscar associações com características de interesse econômico, identificando os animais de genótipo superior, que é indicada como estratégia auxiliar para aumento do desempenho produtivo em bovinos. O princípio consiste na identificação e seleção para marcadores moleculares associados a genes envolvidos direta ou

indiretamente com a expressão de uma característica desejada (DAVIS, G.P.; DENISE, S.K., 1998).

Diversos estudos demonstram que por ser mais expresso em folículos pré-antrais e pequenos folículos antrais em crescimento, as concentrações plasmáticas de AMH têm sido utilizadas como marcadores da reserva ovariana em mulheres (La Marca et al., 2012) e em vacas (Rico et al., 2011). Além disso, o AMH pode ser correlacionado com o número de folículos antrais (Van Rooij et al., 2005; Ireland et al., 2008). Através dessas observações, a concentração de AMH passou a ser considerado como possível marcador de fertilidade.

A inseminação artificial em blocos é aplicada dentro de um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo específico, este protocolo inicia-se com as fêmeas recebendo um dispositivo intravaginal de progesterona, no dia 0, neste mesmo dia as mesmas recebem 2mg de benzoato de estradiol por via intramuscular. Decorridos oito dias, os dispositivos intravaginais de progesterona são retirados e as vacas recebem, por via intramuscular, 150 µg de um análogo de prostaglandina, 300 UI de eCG e 1mg de cipionato de estradiol. Aos 10 dias do início do protocolo os animais são avaliados por meio de ultrassonografia transretal e mensura-se o diâmetro do folículo pré-ovulatório e classificados em quatro grupos, de acordo com o diâmetro deste folículo. As fêmeas que apresentam diâmetro de folículo pré-ovulatório maior que 15 mm devem ser inseminadas logo após a ultrassonografia, as fêmeas que apresentam folículos com 13 e 14,9 mm devem ser inseminadas 12 horas após a ultrassonografia, as fêmeas que apresentam folículos entre 10 e 12,9mm devem ser inseminadas 24 horas após a ultrassonografia, as fêmeas que apresentam folículos que medem entre 8 e 10 mm devem ser inseminadas 30 horas após a ultrassonografia e as fêmeas que apresentam folículos menores que 8mm não serão inseminadas (Pfeifer et al., 2015).

Objetivou-se com este trabalho avaliar a correlação entre a concentração do hormônio antimulleriano com a taxa de concepção em vacas Girolando inseminadas em tempo fixo em blocos.

## **2. Material e Métodos**

O experimento foi realizado na Fazenda Diva, localizada no município de Boquim, região centro-sul de Sergipe, entre os meses de novembro de 2016 a março de 2017. Foram utilizadas 327 vacas da raça Girolando (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*), sendo 35 nulíparas, 48 primíparas, 107 secundíparas e 137 pluríparas, com graus de sangue variando de

1/2 a 7/8, índice de escore corporal médio de 2,75 (IEC – escala de 1 a 5) (HOUGHTON et al., 1990) e intervalo pós-parto de (160,76 dias) vacas que estavam vazias.

As fêmeas foram manejadas, em sistema de pastejo rotacionado, em piquetes com pastagem predominante de *Panicum maximum* (cv. Mombaça), com suplementação de silagem e concentrado a base de milho, soja e núcleo mineral, uma vez por dia. A fazenda obedece ao calendário sanitário oficial e todas as fêmeas foram imunizadas contra as doenças da esfera reprodutiva. Todas as vacas, previamente ao início do protocolo de IATF, foram submetidas a exame clínico-ginecológico e ultrassonográfico utilizando-se um transdutor linear multifrequencial de 4,5 a 6,5 MHz (Kaixin, KX2600 VET), afim de verificar-se a presença de enfermidades reprodutivas que inviabilizassem a inclusão dos animais no experimento.

Foram selecionadas para a pesquisa as vacas sem histórico de aborto e que não apresentaram, no momento da avaliação, anormalidades do trato reprodutivo.

As fêmeas foram submetidas aos seguintes protocolos de sincronização: para as vacas o protocolo iniciou no D0 com a aplicação do dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR<sup>®</sup>, 1,9 g, Zoetis) e aplicação intramuscular (IM) de 2 mg de benzoato de estradiol (Gonadiol<sup>®</sup>, 2 mL, Zoetis); no D7 aplicação (IM) de 25 mg de dinoprost (Lutalyse<sup>®</sup> 5 mL, Zoetis); D9: aplicação de (IM) de 12,5 mg de dinoprost (Lutalyse<sup>®</sup>, 2,5 mL, Zoetis) e 1 mg de cipionato de estradiol (E.C.P<sup>®</sup> 0,5 mL Zoetis).

Para as novilhas as modificações no protocolo anterior são no D7 aplicação (IM) de apenas 12,5 mg de dinoprost (Lutalyse<sup>®</sup>, 2,5 mL) e D9- aplicação de (IM) de 12,5 mg de dinoprost (Lutalyse<sup>®</sup>, 2,5 mL) e 0,6 mg de cipionato de estradiol (E.C.P<sup>®</sup> 0,3 mL).

No D11 os animais foram divididos de forma aleatória em dois grupos. Grupo controle (n: 150) e Grupo bloco (n:179). As fêmeas do grupo controle foram todas inseminadas no dia e horário pré-estabelecidos pelo protocolo. Já as fêmeas pertencentes ao grupo controle, foram submetidas a exame ultrassonográfico com o uso do aparelho (Kaixin, KX2600 VET) com transdutor linear multifrequencial de 4,5 a 6,5 MHz, uma hora antes do início das inseminações, estabelecidas pelo protocolo de IATF utilizado.

Após a avaliação ultrassonográfica os animais foram divididos em 4 blocos de acordo com o tamanho do folículo dominante: no bloco 0 os animais foram inseminados no momento da avaliação e apresentavam folículo com tamanho maior ou igual a 15 mm; no bloco 1 foram inseminados 6 horas após a avaliação, os animais com diâmetro folicular de 13 a 14,9 mm; bloco 2 foram inseminados 24 horas após a avaliação os animais com diâmetro folicular de 10 a 12,9 mm; já no bloco 3, os animais com diâmetro folicular entre 8 e 9,9 mm foram

inseminados 30 horas após as avaliações. Animais com folículos menores que 8 mm foram considerados como não responsivos, sendo assim não inseminados (Pfeifer et al, 2015).

Seguindo as determinações de Ribeiro Filho et al (2013), as inseminações foram realizadas por um mesmo técnico, com a finalidade de se evitar o efeito do inseminador.

Para a realização das inseminações, utilizou-se sêmen criopreservado, de um único touro da raça Girolando, descongelado a 37°C por 30 segundos, com o uso de um descongelador eletrônico (BioGenetic, BIO-DS3). O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a IATF, com auxílio de ultrassonografia transretal, utilizando o aparelho (Kaixin, KX2600 VET) com transdutor linear multifrequencial de 4,5 a 6,5 MHz, sendo todas realizadas pelo mesmo técnico.

As coletas de sangue foram realizadas no dia 11 do protocolo, pela veia coccígea, com tubo vacutainer heparinizado. Após a coleta, o sangue foi centrifugado (900Xg durante 15 minutos) para a retirada do plasma, que foi armazenado em freezer a -80 °C até a realização das análises.

As concentrações séricas de AMH (ng/mL) foram analisadas utilizando o Bovine Anti-Mullerian hormone (Webster, TX). O ensaio tem um intervalo analítico mensurável de 20 ng/mL-0.312 ng/mL. Os coeficientes de variação intraensaio foi de  $\leq 8\%$  e interensaio foram  $\leq 12\%$ .

O critério de diagnóstico de gestação positivo foi a presença da vesícula embrionária com um embrião viável, apresentando batimentos cardíacos. Os animais de cada categoria foram divididos em gestantes e vazias.

O experimento realizado com os animais seguiu as recomendações da legislação brasileira, sobre procedimentos de uso científico de animais (Lei nº 11.794 / 2008), com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade Pio Décimo sob a licença nº 10/2016.

Os dados coletados foram organizados da seguinte forma, o AMH foi considerado variável dependente para Categoria animal, Bloco, Grau de Sangue. Já para as variáveis Diâmetro do folículo dominante (DFD), produção de leite (PL) e taxa de concepção o AMH foi considerado independente. Desta forma, os dados foram organizados e submetidos a análise de variância (ANOVA) e quando constatado efeito significativo procedeu-se com o teste de Tukey com significância igual a 5%. Para tais análises estatísticas foi utilizado o programa RBio (Bhering et al., 2017).

### 3. Resultados e discussão

A concentração de AMH tem sido utilizada como um marcador para estimar o tamanho da reserva ovariana, e a população de pequenos folículos antrais que foi associado positivamente com a fertilidade (Ireland et al., 2011).

A categoria animal e o bloco não influenciaram ( $p>0,05$ ) o AMH. Do mesmo modo, o AMH não influenciou ( $p>0,05$ ) no diâmetro do folículo dominante (Tabela 1). Porém, este hormônio foi capaz de influenciar ( $p<0,05$ ) a produção de leite.

Tabela 1. Média e desvio padrão das concentrações de AMH de fêmeas prenhes e vazias

	Vazia	Prenhe	Não Responderam
Média AMH (ng/mL)	1,269±0,262	1,891±1,123	1,792±0,787

A variável bloco não exerceu influência sobre o AMH (Tabela 2), possivelmente pelo fato dos blocos serem a representação do diâmetro do folículo dominante dos animais no momento da ultrassonografia. Como o desenvolvimento folicular é estimulado por hormônios como o FSH e progesterona, possivelmente não há uma inter-relação entre o desenvolvimento dominante do folículo e os níveis de AMH, mesmo com o hormônio sendo liberado pelos folículos na fase inicial do seu desenvolvimento. Esses dados diferem dos relatados por Ireland et al (2011) onde os autores afirmam que vacas com baixa população de folículos pré-antrais, têm baixa concentração de AMH, o que compromete o desenvolvimento folicular e a qualidade dos oócitos levando a uma redução na concentração de progesterona o que poderá comprometer a fertilidade.

Tabela 2: Médias encontradas para o bloco e sua influência sobre o AMH em vacas mestiças.

Bloco	AMH
0	1,849A
1	1,658A
2	1,909A
3	1,507A
NR	1,682A
Nível de significância	ns

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ). Ns= não significativo,  $p<0,05=*$ ;  $p<0,01=**$ ;  $p<0,001=***$



A categoria dos animais não exerceu influência significativa sobre os níveis de AMH (Tabela 3), possivelmente pelo fato dos níveis de AMH permanecerem estáveis durante a vida do animal. Assim, independente da idade do animal ou de sucessivos partos provavelmente os folículos liberem uma quantidade específica de AMH e com o seu desenvolvimento passem a não produzir mais o hormônio, isso explica o fato dos níveis do AMH permanecerem inalterados independente da categoria animal e da sua idade, levando-se em consideração que as fêmeas com maior quantidade de partos são mais velhas. Resultado semelhantes foram encontrados por Fanchin et al (2003) em estudo com mulheres e Guerreiro et al (2014) em estudo com vacas, ambos os autores afirmam que a concentração de AMH permanece constante no organismo, mantendo a suas concentrações plasmáticas ao longo da vida, sendo muito semelhantes nos animais quando jovens ou adultos.

Tabela 3: Médias encontradas para a categoria animal e o AMH em vacas mestiças.

Categoria	AMH
Nulípara	1,740A
Primípara	1,552A
Secundípara	1,749A
Múltipara	1,790A
Nível de significância	ns

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Ns= não significativo,  $p < 0,05 = *$ ;  $p < 0,01 = **$ ;  $p < 0,001 = ***$

O AMH não exerceu influência sobre o diâmetro do folículo dominante (Tabela 4), possivelmente pelo fato da produção do AMH concentrar-se nos folículos pré-antrais e não ser continuada a medida que estes folículos assumem a dominância. Assim, o folículo dominante parece não ser responsivo aos níveis de AMH, e tem seu desenvolvimento moldado por outros hormônios. Esses dados divergem dos relatados por Ireland et al (2008) e Rico. et al (2011) onde os mesmos relatam que a secreção de AMH ocorre, nas células da granulosa, preferencialmente nos folículos em crescimento, a partir de 1,5 até 5 mm de diâmetro, no estágio pré-antral e pequenos folículos antrais e conseqüentemente, os animais com maior diâmetro folicular, teriam maiores concentrações circulantes de AMH.

Tabela 4: Médias encontradas para AMH, diâmetro do folículo dominante e produção de leite de vacas mestiças.

AMH	Diâmetro do Folículo Dominante	Produção de Leite
Grupo 1	11,758A	17,32A
Grupo 2	11,897A	15,57A
Grupo 3	12,080A	15,04A
Grupo 4	12,446A	4,55B
Nível de significância	ns	***

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Ns= não significativo,  $p < 0,05 = *$ ;  $p < 0,01 = **$ ;  $p < 0,001 = ***$

Já para a produção de leite, o AMH exerceu influência significativa ( $p < 0,05$ ) o que indica que animais com maiores níveis de AMH também produzem mais leite. EM trabalho desenvolvido por Jimenz et al (2015) os mesmos relatam que após a avaliação de três lactações de vacas Jersey, holandesas e mestiças, observou-se que os animais que tinham maiores concentrações de AMH eram mais produtivos que animais que apresentaram menores concentrações de AMH semelhantes aos encontrados neste trabalho. No entanto parece não haver uma influência direta do AMH sobre a glândula mamária e a produção leiteira, embora estaticamente haja diferença significativa. Dessa forma, sugere-se que estudos genéticos sejam realizados afim de verificar-se se existem marcadores moleculares específicos que relacionem o AMH e a produção de leite em bovinos.

#### 4. Conclusão

Concluimos nesse estudo, que a concentração de AMH não pode ser utilizada como um marcador para determinação da fertilidade em vacas da raça Girolando, entretanto foi observado uma associação positiva para produção leiteira, que pode sugerir maiores estudos genéticos a fim de verificar a possibilidade de existência de marcadores moleculares específicos que relacionem o AMH e a produção de leite em bovinos da raça Girolando.

#### 5. Referências Bibliográficas

Batista, E. O. S., Guerreiro, B. M., Freitas, B. G., Silva, J. C. B., Vieira, L. M., Ferreira, R. M., ... Baruselli, P. S (2016). Plasma anti-Müllerian hormone as a predictive endocrine

marker to select *Bos taurus* (Holstein) and *Bos indicus* (Nelore) calves for in vitro embryo production. *Domestic Animal Endocrinology*, 54, 1–9. doi:10.1016/j.domaniend.2015.08.001.

Carter, A. S., Mahboubi, K., Costa, N. N., Gillis, D. J., Carter, T. F., Neal, M. S., ... King, W. A (2016). Systemic and local anti-Müllerian hormone reflects differences in the reproduction potential of Zebu and European type cattle. *Animal Reproduction Science*, 167, 51–58. doi:10.1016/j.anireprosci.2016.02.003.

Canovas, S., & Ross, P. J (2016). Epigenetics in preimplantation mammalian development. *Theriogenology*, 86(1), 69–79. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.02

Claes, A., Ball, B. A., Scoggin, K. E., Esteller-Vico, A., Kalmar, J. J., Conley, A. J., ... Troedsson, M. H. T (2014). The interrelationship between anti-Müllerian hormone, ovarian follicular populations and age in mares. *Equine Veterinary Journal*, 47(5), 537–541. doi:10.1111/evj.12328

El-Sheikh Ali, H., Kitahara, G., Nibe, K., Yamaguchi, R., Horii, Y., Zaabel, S., & Osawa, T (2013). Plasma anti-Müllerian hormone as a biomarker for bovine granulosa-theca cell tumors: Comparison with immunoreactive inhibin and ovarian steroid concentrations. *Theriogenology*, 80(8), 940–949. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.07.02

Gobikrushanth, M., Dutra, P., Felton, C., Bruinjé, T., Colazo, M., Butler, S., Ambrose, D. (2014). The association between Anti-Müllerian Hormone concentrations , antral follicle count and fertility measures in dairy cows The association between Anti-Müllerian Hormone concentrations , antral follicle count and fertility measures in dairy cows. *J. Anim. Sci* Vol. 94, E-Suppl. 5/*J. Dairy Sci.* Vol. 99, E-Suppl. 1.

Jimenez-Krassel, F., Scheetz, D., Neuder, L., Ireland, J., Pursley, J., Smith, G., Tempelman, R., Ferris, T., Roudebush, W., Mossa, F., Lonergan, P., Evans, A., Ireland, J., Concentration of anti-Müllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. *Journal of Dairy Science*. 2015 vol: 98 pp: 1-10

R. S. Bisinotto, E. S. Ribeiro, L. T. Martins, R. S. Marsola, L. F. Greco, M. G. Favoreto, C. A. Risco, W. W. Thatcher, and J. E. P. Santos (2010). Effect of interval between induction of ovulation and artificial insemination (AI) and supplemental progesterone for resynchronization on fertility of dairy cows subjected to a 5-d timed AI program. *J. Dairy Sci.* 93 :5798–5808 doi: 10.3168/jds.2010-3516

HIRAYAMA, H., NAITO, A., FUKUDA, S., FUJII, T., ASADA, M., INABA, Y., ... KAGEYAMA, S (2017). Long-term changes in plasma anti-Müllerian hormone concentration and the relationship with superovulatory response in Japanese Black cattle. *Journal of Reproduction and Development*, 63(1), 95–100. doi:10.1262/jrd.2016-019

Lahoz, B., Alabart, J. L., Monniaux, D., Mermillod, P., & Folch, J (2012). Anti-Müllerian hormone plasma concentration in prepubertal ewe lambs as a predictor of their fertility at a young age. *BMC Veterinary Research*, 8. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-118>

Liang, A., Salzano, A., D'Esposito, M., Comin, A., Montillo, M., Yang, L., ... Gasparrini, B (2016). Anti-Müllerian hormone (AMH) concentration in follicular fluid and mRNA expression of AMH receptor type II and LH receptor in granulosa cells as predictive markers of good buffalo (*Bubalus bubalis*) donors. *Theriogenology*, 86(4), 963–970. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.03.02

Guerreiro, B. M., Batista, E. O. S., Vieira, L. M., Sá Filho, M. F., Rodrigues, C. A., Castro Netto, A., Baruselli, P. S (2014). Plasma anti-müllerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. *Domestic Animal Endocrinology*, 49, 96–104. doi:10.1016/j.domaniend.2014.07.002

Magalhães, R., Rocha, P., Maria, A., Vasconcelos, C., Lima, L., Araújo, V., Bernuci, M., Paula, A., Rodrigues, R., Figueiredo, J. (2013). Regulation of Ovarian Function : Structural Characterization and Role of Anti-Müllerian Hormone ( AMH ). *Acta Scientiae Veterinariae*. Doi: 2890/289031817044.

Okawa, H., Tomiki, M., Ishida, T., Kawaguchi, H., Wijayagunawardane, M. P. B., & Takagi, M (2016). Clinical diagnosis of bovine granulosa cell tumour in a Holstein cow using plasma

anti-Müllerian hormone concentration: a case report. *Journal of Applied Animal Research*, 45(1), 529–532. doi:10.1080/09712119.2016.1220948

Pfeiffer, K. E., Jury, L. J., & Larson, J. E (2014). Determination of anti-Müllerian hormone at estrus during a synchronized and a natural bovine estrous cycle. *Domestic Animal Endocrinology*, 46, 58–64. doi:10.1016/j.domaniend.2013.05.004

Rico, C., Médigue, C., Fabre, S., Jarrier, P., Bontoux, M., Clément, F., & Monniaux, D (2011). Regulation of Anti-Müllerian Hormone Production in the Cow: A Multiscale Study at Endocrine, Ovarian, Follicular and Granulosa Cell Levels<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, 84(3), 560-571. Doi:10.1095/biolreprod.110.088187

Van Houten, E. L. A. F., Themmen, A. P. N., & Visser, J. A (2010). Anti-Müllerian hormone (AMH): Regulator and marker of ovarian function. *Annales d'Endocrinologie*, 71(3), 191–197. doi:10.1016/j.ando.2010.02.016

Visser, J. A., & Themmen, A. P. N (2014). Role of anti-Müllerian hormone and bone morphogenetic proteins in the regulation of FSH sensitivity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), 460–465. doi:10.1016/j.mce.2013.08.012

Zhang, Y., Shao, L., Xu, Y., Cui, Y., Liu, J., & Chian, R.-C (2014). Effect of Anti-Müllerian Hormone in Culture Medium on Quality of Mouse Oocytes Matured In Vitro. *PLoS ONE*, 9(6), e99393. doi:10.1371/journal.pone.0099393

## 8 ANEXOS



# ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE

An International Journal

## AUTHOR INFORMATION PACK

## CONTENTS

- Description p.1
- Audience p.1
- Impact Factor p.1
- Abstracting and Indexing p.2
- Editorial Board p.2 • Guide for Authors p.3

## TABLE OF



ISSN: 0378-4320

## DESCRIPTION

*Animal Reproduction Science* publishes results from studies relating to **reproduction** and **fertility** in **animals**. This includes both fundamental research and applied studies, including management practices that increase our understanding of the **biology** and **manipulation** of reproduction. Manuscripts should go into depth in the mechanisms involved in the research reported, rather than a give a mere description of findings. The focus is on animals that are useful to humans including food- and fibre-producing; companion/recreational; captive; and

endangered species including zoo animals, but excluding laboratory animals unless the results of the study provide new information that impacts the basic understanding of the biology or manipulation of reproduction.

The journal's scope includes the study of reproductive physiology and endocrinology, reproductive cycles, natural and artificial control of reproduction, preservation and use of gametes and embryos, pregnancy and parturition, infertility and sterility, diagnostic and therapeutic techniques.

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

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

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

## AUDIENCE

---

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

## IMPACT FACTOR

---

2018: 1.817 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2019

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

Biological Abstracts

Current Awareness in Biological Sciences

PubMed/Medline

Animal Breeding Abstracts

Bibliography of Reproduction

Current Contents - Agriculture, Biology & Environmental Sciences

Scopus

Elsevier BIOBASE

Science Citation Index

## EDITORIAL BOARD

---

### *Editor-in-Chief*

**James Kinder**, The Ohio State University Department of Animal Sciences, Columbus, Ohio, United States

### *Associate Editors*

**Christine Aurich**, University of Veterinary Medicine Vienna, Wien, Austria

**Robert Cushman**, USDA, ARS, U.S. Meat Animal Research Center, Clay Center, Nebraska, United States **Marc**

**Yeste**, University of Girona, Girona, Spain

### *Editorial Advisory Board*

**B.M. Alexander**, Laramie, WY USA

**F.W. Bazer**, College Station, TX USA

**H. Cardenas**, Columbus, OH USA

**J.F. Cavalieri**, Cairns, QLD, Australia

**D. Cavestany**, Montevideo, Uruguay

**P. Comizzoli**, Washington, DC USA

**R.A. Dailey**, Morgantown, WV USA

**J.A. Delgadillo**, Torreón, Coahuila, Mexico

**M.G. Diskin**, Athenry, County Galway, Ireland

**M-A. Driancourt**, Boulogne Billancourt, France

**A.D. Ealy**, Gainesville, FL USA

**W.L. Flowers**, Raleigh, NC USA

**D.L. Garner**, Reno, NV USA

**C.L. Gasser**, Cedar City, UT USA

**S.P. de Graaf**, Sydney, NSW, Australia

**W.V Holt**, London, United Kingdom

**K. Imakawa**, Kumamoto, Japan

**A.L. Johnson**, University Park, PA USA

**R.J. Mapletoft**, Saskatoon, SK, Canada

**J.F. Mee**, Carlow, Ireland

**J.C.F. Moraes**, Bage, Brazil



**T. Nagai**, Tsukuba, Japan

**N. Parvizi**, Neustadt, Germany

**J.R. Pursley**, East

Lansing, MI USA **J.P. Ravindra**,

Bangalore, India

**R.R. Santos**, Lelystad, Netherlands

**D.C. Sharp**, Gainesville, FL USA

**Y-L. Shiue**, Kaohsiung, Taiwan

**J.F. Smith**, Auckland, New Zealand

**D.L. Thompson**, Baton Rouge, LA USA

**A. Turner**, Geelong, VIC Australia

**S. Uzbekova**, Nouzilly, France

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### INTRODUCTION

#### Types of Paper

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

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

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

than eight Figures and Tables. The use of illustrations explaining the mechanisms referred to in the Review is strongly encouraged.

#### Contact details for submission

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

#### Submission checklist

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

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

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

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

##### *Manuscript:*

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

*Supplemental files (where applicable)*

##### Further considerations

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

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

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

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

#### Animal Reproduction Science: Submission Checklist

All authors should complete and include in their submission the [ANIREP Submission Checklist](#). PLEASE NOTE: This is a mandatory file for all submissions to *Animal Reproduction Science*.

Animal Reproduction Science: important formatting to which all manuscripts should adhere

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

#### BEFORE YOU BEGIN

##### *Ethics in publishing*

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

##### Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Research conducted that includes cruelty in animal experimentation will not be considered for publication in *Animal Reproduction Science*.

#### [Declaration of interest](#)

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted.

2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

#### [Submission declaration and verification](#)

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other

language, including electronically without the written consent of the copyright holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

### *Preprints*

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

### *Use of inclusive language*

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

### *Author contributions*

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#)

### *Authorship*

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

### *Changes to authorship*

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original

submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

### Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

### *Author rights*

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

### *Elsevier supports responsible sharing*

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

### Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

#### *Open access*

Please visit our Open Access page from the Journal Homepage for more information.

#### *Elsevier Researcher Academy*

*Researcher Academy* is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

#### *Language (usage and editing services)*

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

#### *Submission*

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

#### *Submit your article*

Please submit your article via <https://www.evise.com/profile/api/navigate/ANIREP>.

#### *Referees*

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

## PREPARATION

### Editorial Structure and Preliminary Assessment

The Editor-in-Chief, who decides whether the Manuscripts fit the scope of manuscripts published in this journal, firstly evaluates manuscripts. Associate Editors also make a preliminary evaluation of the Manuscript, with or without the involvement of other Editorial Board members, and then decide whether or not the Manuscript deserves to be sent out for peer review. These preliminary assessments made by the Editorial Board are based on the scope, novelty, interest, potential contribution to the field, and quality of science and narrative (in the case of review articles). Manuscripts that are not consistent with Journal standards will be returned to the author without peer review.

### Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of one independent expert reviewer to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review](#).

### Appeals

In case of a rejection decision, authors are allowed to submit an appeal, which may be considered by the Editorial Board. Priority of appeals is less than that of new submitted Manuscripts with regard to the Journal's workload. Only one appeal is permitted per Manuscript. If the authors wish to submit an appeal, they must provide evidence that substantial errors of fact and/or biases were made during the reviewing process; a decision will only be reversed if the Editorial Board is convinced that the original decision was a mistake. Should an appeal merit consideration, the Editor-in-Chief will request the authors to provide a response to the reviewers' and Associate Editors' comments and will be then sent out for further peer review. Decisions after submitting an appeal are made by the Editor-inChief and are final.

### Article structure



Manuscripts should have numbered lines (continuous numbering across pages) with wide margins and double spacing throughout (i.e., also for abstracts, footnotes and references). Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. In the text no reference should be made to page numbers; however, if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text. The structure of the manuscript must be Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements, Author Contribution Statement, Competing interests statement, References, Figure legends and Tables (if the latter are provided with the Main text file).

Tables and Figures should be inserted separately at the end of the manuscript. Furthermore, the format used for the Table and Figure legends should be consistent with that of manuscripts published in this journal.

#### *Abstract*

The ABSTRACT can be no longer than 250 words in length and details about what should be included in the ABSTRACT are described subsequently in this document.

#### *Introduction (labelled with the number 1)*

State the objectives of the research and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

The introduction "sets the scene" for the research. Do not over-reference statements; two or three key references should suffice unless each adds something specific. The introduction should not normally be more than 500 words (approximately two manuscript pages).

#### *Materials and Methods (labelled with the number 2)*

Provide sufficient details to allow the research to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

#### *Description of analytical methods*

The description of analytical methods (e.g., hormone analysis, immunohistochemistry) must include information on quality assessment and method validation for the respective laboratory where sample analysis has been performed.

### *Gene names*

Authors must use standard gene names, as provided by HGNC. Gene names must be italicized. If the case of mammalian species and if gene names refer to rodent species, they must be upper case (i.e. HspA1A); if they refer to non-rodent species they must be written in capitals (e.g., HSPA1A). If they refer to other species, they must be written lower case (e.g., hspa1a). Protein names are written in capitals and are not italicized.

### *Quantitative PCR*

If authors have used quantitative PCR, the Methods section must be written following Bustin et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Use of terminology - relative abundance of mRNA transcripts as compared with the abundance of mRNA for a reference gene(s).

Experiments. Clin Chem 2009; 55: 611-622. The authors should also ensure that the following information is provided:

Protocol for DNA/RNA extraction, including quantitation and determination of purity; Reverse transcription: amount of RNA, concentration of all reagents: primers concentration (either random primers or oligonucleotides), reverse transcriptase and master mix components; For qPCR: sequence of Forward and Reverse primers, amplicon size, accession number of Genebank; Thermocycler parameters (i.e. denaturation, annealing and extension steps, number of cycles, melting curves); Validation of PCR products; Non-template controls for Reverse Transcription and qPCR should be included in all reactions; and Data analysis: details for the quantitative or relative determination.

### *Flow cytometry*

When performed, the Methods section should provide technical details for flow cytometry experiments, following the recommendations set by the International Society for Advancement of Cytometry (Lee J et al. MIFlowCyt: The minimum information about a flow cytometry experiment. Cytometry A 2008; 73: 926-930). Amongst others, the following information should be provided: technical specifications of the equipment, laser wavelength, BP and LP for filters, sheath rate, how populations have been gated, concentration of cells during analysis, calibration of the equipment, linear or logarithmic representation, number of technical replicates, data compensation and software used to analyze histograms. The Editorial Board may request, at any point, the authors to provide the original files (.FCS/.LMD) or the histograms and dot-plots.

### *Use of antibodies*

Validation of antibodies through peptide blocking experiments is required when immunoblotting (Western blot), immunofluorescence, immunohistochemistry or immunocytochemistry are performed. The authors may cite a previous reference in which the specificity of the antibody used for the species reported in the submitted Manuscript has been validated and published.

### *Statistical analyses*

Authors must provide enough details on how data were evaluated and which statistical package was used to conduct that evaluation. If linear models are used, authors should have previously confirmed that parametric assumptions (normal distribution and homogeneity of variances) are not violated and, when applicable, indicate whether linear transformations of data or non-parametric tests have been conducted. Authors are also encouraged to consult with biometricians and determine which the most suitable statistical test before conducting the study (e.g., GLM, mixed model, linear regression).

*Results (labelled with the number 3)* Results should be clear and concise.

### *Discussion (labelled with the number 4)*

In this section, there should be an exploration of the significance of the results of the research, not a repeating of the results. For Research Papers, there needs to be a separate Results and Discussion section. Avoid extensive citations and discussion of published literature. Discussion should range between 1,000 and 1,250 words (approximately 4-5 pages).

### *Conclusions (labelled with the number 5)*

The main conclusions of the study should be presented in a separate, short Conclusions section.

### *Essential Title Page Information*

**Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible. Only the first letter of titles should be capitalized unless using words that need to be capitalized (e.g., breed name - Cashmere goats, Holstein cows ***Author names and affiliations.*** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add

your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the research was conducted) below the names. Indicate all affiliations with a lower- case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author. ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will manage correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is provided and that contact details are current for the corresponding author. *Present/permanent address.*** If an author has relocated since the research described in the article was conducted, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually conducted the research must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

### Abstract

A concise and factual abstract is required of not more than 250 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential these must be defined when first used in the abstract.

### Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a

concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of  $531 \times 1328$  pixels (h  $\times$  w) or proportionally more. The image should be readable at a size of  $5 \times 13$  cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

### Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

#### *Please note:*

The first letter of each of the Keywords should be capitalized and with semicolons between each word.

### *Acknowledgements*

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### *Formatting of funding sources*

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### *Nomenclature*

Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

### *Nomenclature and units*

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult [IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents](#) for further information.

### *Math formulae*

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

### *Footnotes*

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

### *Artwork*

#### *Electronic artwork General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.

- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.** *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

**Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

*Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after**

**receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

### Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Number tables consecutively in accordance with the appearance of the tables in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### *Data references*

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

### *Reference management software*

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)



Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/animal-reproduction-science>

When preparing a manuscript, authors will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

### *Reference style*

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al (2010) have recently shown ...'

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

### *Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon.* 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

### Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

### Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file.

If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

### Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

### Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

### *Mendeley Data*

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

### *Data statement*

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

## **AFTER ACCEPTANCE**

### **Online proof correction**

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that

all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

### AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).