

## Control de la emergencia de la onda folicular mediante la aplicación de benzoato de estradiol, GnRH y ablación folicular en el metaestro tardío en vaquillas de trópico alto

### Control of the emergence of the follicular wave by the application of oestradiol benzoate, GnRH and follicular ablation in the late metaoestrous in heifers in the high tropics

Luis Eduardo Ayala Guanga<sup>1,2</sup>, Pedro Emilio Nieto Escandón<sup>1</sup>,  
Ermes Ramiro Rodas Carpio<sup>1</sup>, Santiago Xavier Sarmiento Quito<sup>1</sup>,  
Jorge Bolívar Dután Sanango<sup>1</sup>

#### RESUMEN

Se caracterizó el comportamiento del folículo dominante (FD), el perfil de la FSH y estradiol, el momento del reinicio de la onda folicular pos-aplicación de benzoato de estradiol, GnRH, o ablación folicular en el metaestro tardío en vaquillas Holstein mestizas, sobre los 2500 msnm y alimentadas al pastoreo. Se utilizaron nueve animales de peso  $427.7 \pm 23.0$  kg, condición corporal  $2.7 \pm 0.1$ , edad  $26.7 \pm 1.4$  meses. Previo al experimento las vaquillas fueron sincronizadas y se consideró día cero (inicio del experimento) al día 6 del ciclo estral. Se tuvo tres tratamientos: T1=Benzoato de estradiol - BE (n=9), T2=GnRH (n=9), T3=Ablación (n=9). La evaluación del FD se realizó mediante ecografía cada 24h, durante 5 días consecutivos. Los niveles de FSH y estradiol fueron analizados cada 5 días a partir del día 0 mediante radioinmunoensayo. El reinicio de la onda y número de folículos reclutados fueron determinados en forma retrospectiva al valorar los resultados de las ecografías diarias. La aplicación de BE (T1) provocó un crecimiento inicial del FD, luego se mantuvo y finalmente fue a la atresia, el pico de FSH apareció a las 48h ( $0.87 \pm 0.21$  ng/ml), el reinicio de la onda folicular fue a los  $3.2 \pm 0.15$  d pos-tratamiento. En T2, el 55.5% de las vaquillas ovularon en 24h y el 44.5% entre las 24-48h, el pico de FSH fue a las 24h pos-tratamiento y el reinicio de la onda en  $2.4 \pm 0.18$  d. Las vaquillas de T3 presentaron el

<sup>1</sup> Carrera de Medicina Veterinaria Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, Ecuador

<sup>2</sup> E-mail: [luis.ayala@ucuenca.edu.ec](mailto:luis.ayala@ucuenca.edu.ec)

Recibido: 12 de noviembre de 2019

Aceptado para publicación: 8 de agosto de 2020

Publicado: 25 de noviembre de 2020

pico de FSH a las 24h y reinicio de onda  $1.8\pm 0.15$  días. Se concluye que la aplicación de BE en las vaquillas del estudio causa que reinicien tempranamente la onda folicular. Además, la presencia de cuerpo lúteo y FD previo a la aplicación de GnRH y ablación permite un reinicio de la onda folicular más sólido y homogéneo.

**Palabras clave:** metaestro, dinámica, reclutamiento, hormona

## ABSTRACT

The response of the dominant follicle (DF), the profile of the FSH and estradiol and the onset of the follicular wave after the application of estradiol benzoate, GnRH, or follicular ablation in late metestrus were characterized in crossbred Holstein heifers, reared at 2500 meters above sea level and fed to grazing. Nine animals weighing  $427.7\pm 23.0$  kg, body condition  $2.7\pm 0.1$ , age  $26.7\pm 1.4$  months were used. Before the experiment, the heifers were synchronized and day 6 of the oestrous cycle was considered day zero (start of the experiment). There were three treatments: T1 = Oestradiol benzoate - BE (n=9), T2 = GnRH (n=9), T3 = Ablation (n=9). The evaluation of the DF was carried out by ultrasound every 24 hours, for 5 consecutive days. FSH and oestradiol levels were analysed every 5 days from day 0 by radioimmunoassay. The onset of the follicular wave and number of follicles recruited were determined retrospectively when assessing the daily ultrasound. The application of BE (T1) caused an initial growth of the DF, then it was maintained and finally went to atresia, the peak of FSH appeared at 48h ( $0.87\pm 0.21$  ng/ml) and the onset of the follicular wave was at  $3.2\pm 0.15$  d post-treatment. In T2, 55.5% of the heifers ovulated in 24h and 44.5% between 24-48h, the peak of FSH was at 24h post-treatment and the onset of the wave in  $2.4\pm 0.18$  d. The T3 heifers showed the FSH peak at 24h and wave restarted at  $1.8\pm 0.15$  days. It is concluded that the application of BE in the heifers of the study favoured then an earlier restart of the follicular wave. Besides, the presence of corpus luteum and DF prior to the application of GnRH and ablation allows a more solid and homogeneous restart of the follicular wave.

**Key words:** metestrus, dynamic, recruitment, hormone

## INTRODUCCIÓN

El éxito de los programas de inseminación a tiempo fijo (IATF) y de la producción de embriones *in vivo* (MOET) e *in vitro* (PIV) está influenciado por el estado folicular individual de los animales antes de iniciar los tratamientos hormonales (Lonergan *et al.*, 2003) y, si bien la dinámica folicular puede ser evaluada mediante ecografía (Ayala *et al.*, 2019), se complica cuando se requiere trabajar con varios animales a la vez, especialmente en sistemas de explotación extensivos (Bo *et al.*, 1995).

Una posible estrategia es el control exógeno de la onda folicular previo al inicio de la aplicación de protocolo para la IATF o MOET (Kohram *et al.*, 1998), utilizando estradiol más progesterona/progestágenos para suprimir la liberación de FSH e inducir la atresia folicular, permitiendo el surgimiento de una nueva onda folicular (Bo *et al.*, 1993, 1995). También, en reemplazo de los estrógenos se puede estimular el reinicio de la onda folicular mediante la aplicación de GnRH, siempre que exista un folículo dominante que pueda ovular (Martinez *et al.*, 1999). Diversos estudios han demostrado que la administración de GnRH en etapas

aleatorias del ciclo estral produce ovulación en el 44 a 54% de las vacas lecheras (Bello *et al.*, 2006; Colazo *et al.*, 2009), en el 56% de novillas de carne (Martínez *et al.*, 1999) y en el 60% de vacas de carne (Small *et al.*, 2009); sin embargo, el nivel de respuesta es demasiado inconsistente para el éxito de un programa de MOET.

Otra alternativa para sincronizar la onda folicular es eliminar el efecto supresor del folículo dominante (FD) mediante la ablación folicular guiada por ultrasonido (Bergfelt *et al.*, 1994; Bungartz y Niemann, 1994), e iniciar la superovulación 1-2 días más tarde. Si bien la ablación del FD es altamente efectiva, tiene como desventaja que se requiere un equipo de ultrasonido y personal capacitado para operarlo, lo cual dificulta la aplicación de esta tecnología a nivel de campo.

Estas alternativas han sido evaluadas en varias razas bovinas de carne criadas principalmente en el trópico bajo (Dorneles *et al.*, 2017) y en sistemas intensivos de producción de leche (Quispe *et al.*, 2014; Hidaka *et al.*, 2018), lo cual ha permitido estandarizar el momento del reinicio de la onda folicular en el bovino. Sin embargo, hay diferencias en la fisiología ovárica entre *Bos indicus* y *Bos taurus*; así se reporta 42.7 y 19.7 folículos entre 2 y 5 mm en una onda folicular en *B. indicus* (Nelore) y *B. taurus* (Holstein), respectivamente, así como FD en el proceso de desviación de 8.3 y 9.8 mm en *B. indicus* y *B. taurus*, respectivamente (Bastos *et al.*, 2010). Además, se reporta que vacas Holstein con folículos entre 7 y 8.5 mm no llegaron a ovular con la aplicación de LH (Sartori *et al.*, 2001), mientras que Gimenes *et al.* (2008) reporta ovulaciones en el 33% de vacas *B. indicus*. Asimismo, se observan diferencias entre estas especies en el volumen del cuerpo lúteo y la concentración de estrógenos y progesterona (Sartori *et al.*, 2016).

Aparte de las diferencias fisiológicas entre razas de *B. indicus* y *B. taurus*, se deben considerar diferencias entre y dentro de razas, Así, Morotti *et al.* (2018) reporta-

ron diferencias individuales en el recuento de folículos antrales altos y bajos en vacas Nelore, en tanto que razas autóctonas presentan características ováricas particulares, que podrían modificar el reinicio de la onda folicular (Chasombat *et al.*, 2013; Ayala *et al.*, 2019). Toda esta información permite suponer que el reinicio de la onda folicular estimulada por la aplicación del benzoato de estradiol, GnRH o la ablación del FD en la fase tardía de la primera onda folicular, podría tener una respuesta diferente en vaquillas Holstein mestizas, criadas en fincas lecheras y alimentadas al pastoreo. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue caracterizar el comportamiento del FD, el perfil de la FSH y estradiol, y el reinicio de la nueva onda folicular, luego de la aplicación de una dosis de benzoato de estradiol o de GnRH, o la ablación folicular en la fase tardía de la primera onda folicular.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización

El estudio se realizó entre julio y diciembre de 2018 en la Granja Experimental de Iruquis, Universidad de Cuenca, Ecuador. La zona se encuentra a una altitud de 2671 msnm, y presenta una precipitación promedio anual de 1078 mm y temperatura entre 7 a 12 °C.

### Animales y Manejo

Se utilizaron nueve vaquillas Holstein mestizas, con peso promedio de 427.7±23.0 kg, condición corporal de 2.7±0.1 (escala de 1 a 5) y edad de 26.7±1.4 meses. Las vaquillas no habían sido inseminadas previamente y todas se encontraban en el día 6 del ciclo estral (metaestro tardío) al iniciarse el estudio. Los animales fueron manejados en un grupo común, y se alimentaban con una mezcla de kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), ray gras inglés (*Lolium perenne*) e italiano (*Lolium multiflorum*), y recibían 2.5 kg de concentrado/día, 100 g/animal de sales minerales y

agua *ad libitum*. En el trabajo se aplicó la normativa del código sanitario para animales terrestres, capítulo 7.8 «Utilización de animales en la investigación y educación» de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2019), el cual permite asegurar el bienestar de los animales.

### Protocolo de Sincronización Pre-experimento

La sincronía del ciclo estral de las vaquillas se realizó mediante un protocolo estándar de IATF, al inicio de cada repetición. Día -15: implante de progesterona (DIB® 0.5 g, Syntex, Argentina) + 2 mg de benzoato de estradiol (Grafoleón®, Life, Ecuador) IM; Día -8: retiro del implante + 0.5 mg de cloprostenol sódico (Lutaprost® 250) IM. Además, se colocó un parche colorimétrico para facilitar la detección de celo en la región lumbosacra; Día -7: 1 mg de benzoato de estradiol, IM; Día -5: se verificó mediante ultrasonografía el tamaño y la ubicación del folículo preovulatorio; Día -3: confirmación ecográfica de la ovulación; Día 0: (día 6 post celo), se confirmó la presencia del cuerpo lúteo (CL)  $\geq 15$  mm y un folículo dominante  $\geq 10$  mm, condiciones necesarias para que las vaquillas se asignaran aleatoriamente a uno de los tres tratamientos experimentales.

### Tratamientos

En el día 6 pos-celo (Día 0) se inició la aplicación de los tratamientos. Se aplicó un diseño de cuadrado latino de 3x3 con tres tratamientos y tres repeticiones: T1: 2 mg de benzoato de estradiol – BE, (Grafoleón®, Life, Ecuador), IM (n=9); T2: 0.25 mg de gonadorelina (Fertagyl®, MSD Intervet, Ecuador), IM (n=9); T3: ablación de folículos  $\geq 5$  mm (n=9).

La valoración del FD se realizó mediante ecografía transrectal (Aloka, Prosoun 2, Japón) con una sonda lineal de 7.5 MHz cada 24h (06:00), durante cinco días consecutivos. Se determinó el ancho y el largo del FD (en mm). Asimismo, se realizaron chequeos

ecográficos de ambos ovarios cada 24 h, mediante un barrido dorsoventral y lateromedial para identificar la emergencia de un nuevo grupo de folículos  $\leq 4$  mm y cuantificar el número de estos folículos.

A partir del Día 0 y por cinco días consecutivos se colectaron 10 ml de sangre de la vena coccígea (06:00) en tubos sin anticoagulante. Las muestras se centrifugaron a 3000 g durante 20 min y el suero sobrenadante fue congelado a -20 °C hasta la medición de las hormonas. La determinación de las concentraciones de FSH y estradiol (Steranti Research, UK) fueron realizadas mediante radioinmunoensayo. El rango de la curva estándar para FSH fue de 0.13 a 16 ng/ml y la sensibilidad del ensayo de 0.2 ng/ml. Los coeficientes de variación de los estándares de referencia bajos y altos fueron 6.5 y 5.8%, respectivamente. En el caso del estradiol la curva estándar varió entre 5 a 400 pg/ml, sensibilidad de 5.2 pg/ml, coeficiente de variación intra-ensayo de 8.1%.

### Análisis Estadístico

Se utilizó el programa SPSS v. 25®. El efecto de los tratamientos sobre las variables comportamiento del FD (tamaño), y niveles de estradiol y FSH y el momento del reinicio de la onda folicular fueron determinados mediante análisis de varianza. Para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey al 5%.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tamaño del FD en los tres tratamientos fue similar al inicio del experimento (Día 0): T1 = 12.7 $\pm$ 0.67 mm, T2 = 12.9 $\pm$ 0.96 mm, T3 = 12.2 $\pm$ 0.69 mm. Estos valores concuerdan con un trabajo previo de este grupo de investigación en vaquillas Holstein receptoras en el día 6 del ciclo estral (Ayala *et al.*, 2017); sin embargo, los FD fueron más pequeños a los obtenidos por Sartori *et al.* (2004) y Echternkamp *et al.* (2009), quienes

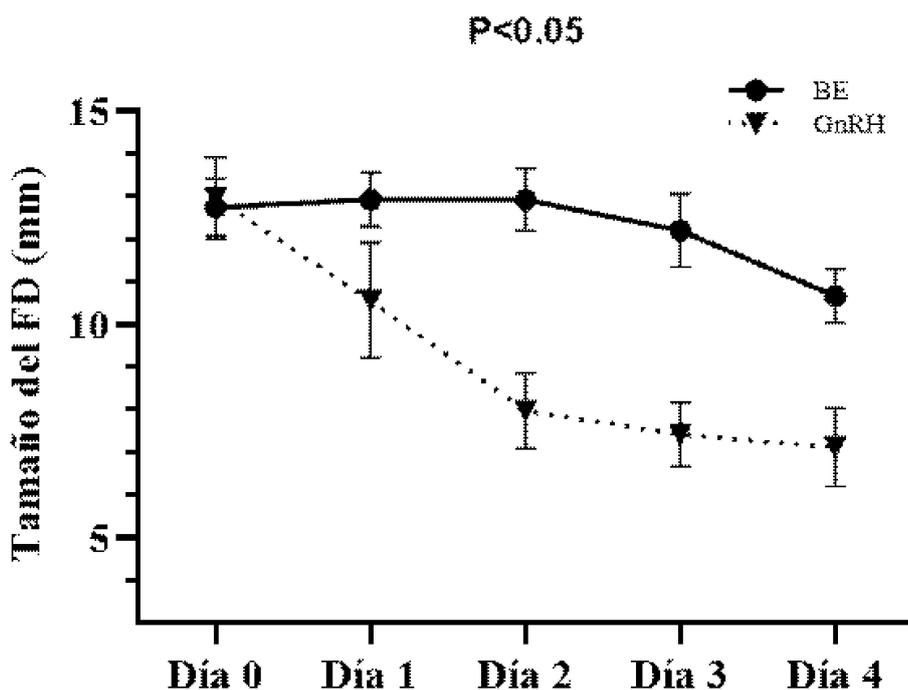


Figura 1. Comportamiento del fólculo dominante (FD), expresado en media y error estándar (mm), en los tratamientos T1=Benzoato de estradiol (BE) y T2=GnRH, durante los primeros cuatro días de la aplicación

reportaron FD en vaquillas Holstein de  $15.0 \pm 0.2$  mm y  $14.0 \pm 0.3$  mm, respectivamente.

El comportamiento del FD presentó diferencias significativas entre T1 y T2 ( $p < 0.05$ ) a partir del día 1 (Figura 1). Las vaquillas que recibieron GnRH (T2) presentaron una reducción marcada del tamaño del FD en los dos primeros días (día 1: 2.3 mm y día 2: 2.7 mm), mientras que fue menor en los siguientes dos días (0.5 y 0.3 mm). Esta disminución drástica del tamaño del FD luego del tratamiento fue producto de la ovulación ocurrida. Se determinó que 5 de las 9 vaquillas tratadas con GnRH (55.5%) ovularon en las primeras 24 h y las restantes entre 24 y 48 h ( $1.4 \pm 0.02$  días), lo cual concuerda con lo descrito por Martínez *et al.* (1999), quienes mencionan que la aplicación de GnRH desencadena la ovulación en caso se encuentre pre-

sente un FD. Asimismo, Bello *et al.* (2006) describieron que contar con FD y un CL funcional en el momento de la aplicación de GnRH permite elevar el porcentaje de ovulación en vacas lecheras a un 85%, lo cual podría explicar el 100% de ovulación en el presente trabajo, ya que las nueve vaquillas tenían CL funcional y un  $FD \geq 10$  mm.

El FD de los animales de T1 que recibieron BE (Día 0) presentó un patrón de comportamiento diferente a las vaquillas de T1 (GnRH). Así, el FD incrementó 0.22 mm en promedio las primeras 24 h, para luego entrar a mantener ese tamaño y recién en el día 3 y 4 reducir su tamaño en 0.7 y 1.7 mm, respectivamente (Figura 1), de allí que se puede notar que la aplicación de BE en el día 6 del ciclo estral no generó atresia inmediata del FD, comportamiento que concuerda con lo

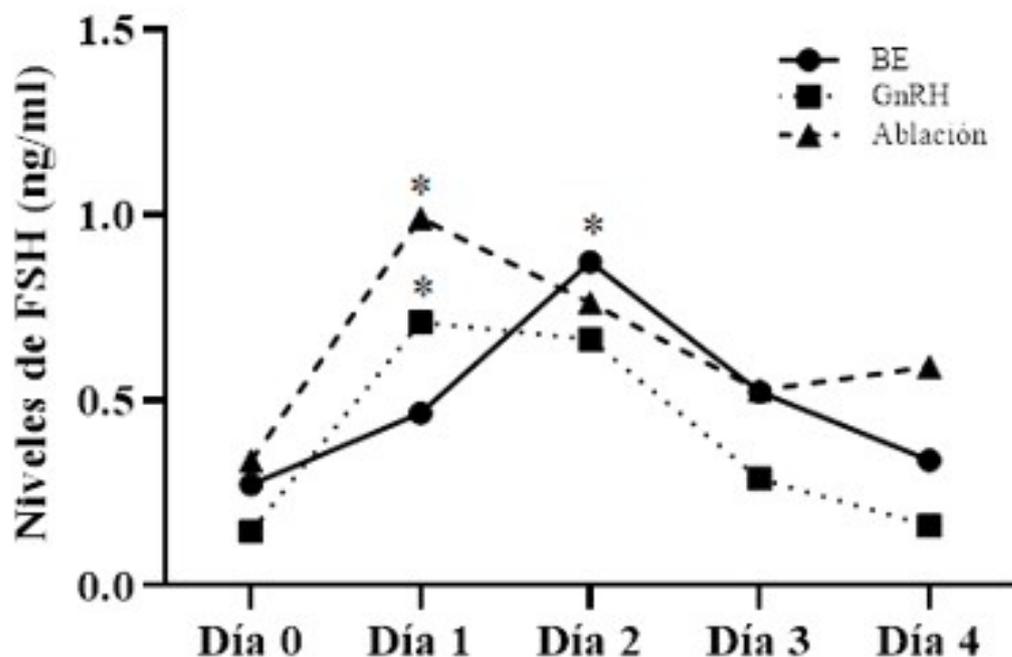


Figura 2. Comportamiento de la hormona folículo estimulante (FSH), expresado en media (ng/ml), en los tratamientos T1=Benzoato de estradiol (BE) y T2=GnRH, durante los primeros cuatro días de la aplicación. (\*) Diferencia significativa dentro de cada tratamiento que permite determinar el pico de FSH

reportado por Bo *et al.* (1993) al aplicar 5 mg de valeriato de estradiol en el día 6 del ciclo estral.

Los niveles de FSH fueron similares al inicio del experimento en los tres tratamientos ( $0.27 \pm 0.09$ ,  $0.14 \pm 0.02$  y  $0.34 \pm 0.09$  ng/ml para T1, T2 y T3, respectivamente). El pico de FSH fue observado a las 24 h de la aplicación de GnRH ( $0.71 \pm 0.19$  ng/ml) y de la ablación folicular ( $0.99 \pm 0.19$  ng/ml) (Figura 2). Valores similares han sido descritos por Ramos *et al.* (2010) a las 24 h de la ablación folicular y también por Bergfelt *et al.* (1994) en vaquillas mestizas. Por otro lado, las vaquillas de T1 (BE) tuvieron la mayor concentración de FSH ( $0.87 \pm 0.21$  ng/ml) a las 48 h del tratamiento (Figura 2), lo cual concuerda con lo descrito por Bo *et al.* (1993) al

aplicar valeriato de estradiol y por Ramos *et al.* (2010) al aplicar BE en vaquillas.

Los niveles de estradiol en sangre fueron similares al inicio del experimento en los tres tratamientos ( $60.3 \pm 5.16$ ,  $47.8 \pm 7.05$  y  $57.9 \pm 3.80$  pg/ml para T1, T2 y T3, respectivamente), llegándose a casi duplicar a las 24 h de la aplicación de BE en las vaquillas de T1 ( $103.9 \pm 14.41$  pg/ml) aunque inferiores a los reportados por Bo *et al.* (1993) al aplicar 5 mg de valeriato de estradiol (150 pg/ml). Los valores de estradiol en T2 y T3 se mantuvieron constantes en el día 2 ( $59.9 \pm 12.40$  y  $58.3 \pm 5.75$  pg/ml en T2 y T3, respectivamente), para recién elevarse en el día 3 y 4 (Figura 3). En este sentido, Macmillan y Thatcher (1991) describieron que los niveles de estradiol por efecto de la aplicación de buserelina en el día 12 del ciclo estral en ganado de carne se mantuvieron constantes.

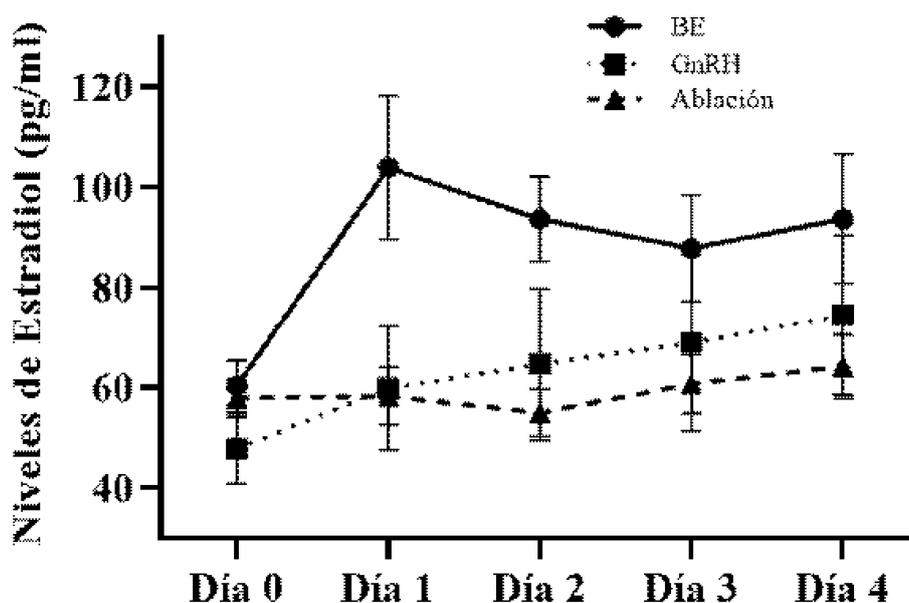


Figura 3. Comportamiento del estradiol en suero sanguíneo, expresado en media (pg/ml), en los tratamientos T1=Benzoato de estradiol (BE), T2=GnRH y T3=Ablación folicular, durante los primeros cuatro días de la aplicación

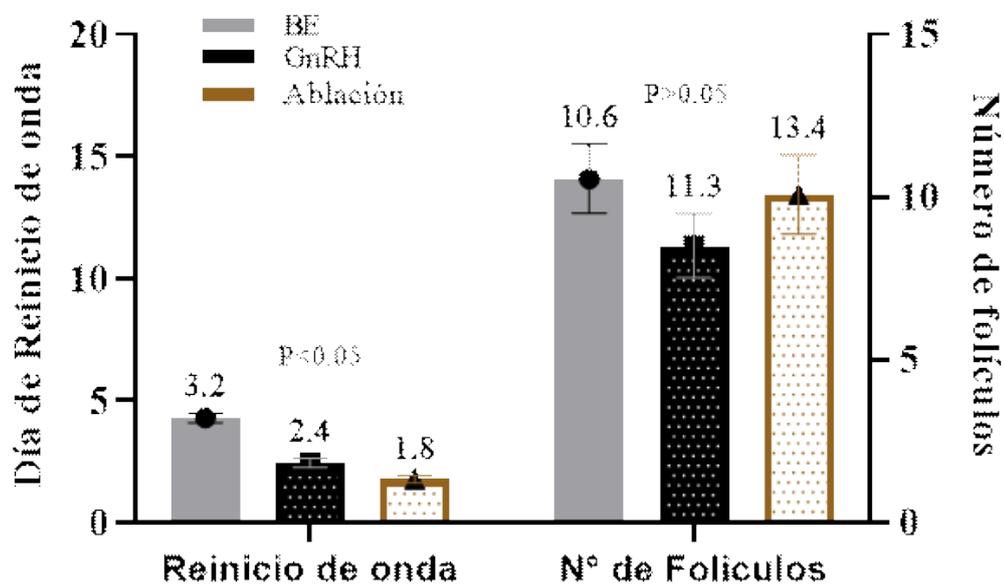


Figura 4. Intervalo al reinicio de la onda folicular y número de folículos al momento de reinicio de la onda folicular en vaquillas Holstein mestizas, en los tratamientos T1=Benzoato de estradiol (BE), T2=GnRH y T3=Ablación folicular

Se encuentra descrito que el 17 $\beta$  estradiol se ha utilizado con éxito para sincronizar la emergencia de ondas foliculares en el ganado bovino (Bo *et al.*, 2002). En el presente trabajo, la aparición de una nueva cohorte de folículos <4 mm estuvo conformada por 10.6 $\pm$ 1.1 folículos a los 3.2 $\pm$ 0.2 días en T1 (BE). Se presentó antes de los 4.7 $\pm$ 0.2 días reportados para vacas Angus por Bo *et al.* (1995), al aplicar 5 mg de 17 $\beta$ -estradiol en el día 6 del ciclo estral, aunque después de los 2.5 $\pm$ 0.2d reportado por Sá Filho *et al.* (2011) en vaquillas Nelore al aplicar 2 mg de BE, lo cual fortalece la hipótesis de la existencia de varios factores que pueden alterar el momento del reinicio de la onda folicular.

Las vaquillas de T2 (GnRH) reiniciaron la onda folicular a los 2.4 $\pm$ 0.18 días con un pool de 11.3 $\pm$ 1.31 folículos. Valores inferiores fueron reportados por Martínez *et al.* (1999) en vaquillas de carne (2.1 $\pm$ 0.6 d) al aplicar GnRH el día 6 del ciclo estral. Por otro lado, se observaron 13.4 $\pm$ 1.6 folículos el día 1.8 $\pm$ 0.15 en las vaquillas de T3 (ablación), con diferencia estadística en el momento del reinicio de la onda entre T2 y T3 ( $p < 0.05$ ), intervalo que concuerda con lo establecido por Bergfelt *et al.* (1994) en una sesión de OPU en vaquillas de carne.

El número de folículos promedio reclutados en la nueva onda folicular fue semejantes a los descritos por Chasombat *et al.* (2013), quienes contabilizaron 10.5 $\pm$ 0.1 folículos en ganado criollo Tailandés y Ayala *et al.* (2019) de 9.9 $\pm$ 1.5 folículos en vaquillas criollas en el altiplano ecuatoriano.

## CONCLUSIONES

- La aplicación de 2 mg de benzoato de estradiol más progesterona en vaquillas Holstein mestizas, criadas sobre los 2500 msnm y alimentadas al pastoreo presentan un reinicio de onda folicular promedio a los 3.2 días del tratamiento, mien-

tras que la aplicación de GnRH en estas condiciones genera el reinicio a los 2.4 días y la ablación folicular a los 1.8 días.

- La presencia de un cuerpo lúteo (CL) funcional y un folículo dominante (FD) >10 mm (metaestro tardío) permitió estimular el reinicio de la onda folicular más homogénea al aplicar BE, GnRH o realizar la ablación folicular.

## LITERATURA CITADA

1. Ayala LE, Pesantez JL, Rodas ER, Dután JB, Calle JR, Murillo YA, Vázquez JM, *et al.* 2019. Dinámica folicular de vaquillas criollas al pastoreo en el altiplano ecuatoriano. Arch Zootec 68: 186-192. doi: 10.21071/az.v68i262.-4135
2. Ayala L, Pesántez J, Rodas E, Méndez S, Soria M, Torres S, Vázquez J, *et al.* 2017. Tamaño del folículo ovulatorio, cuerpo lúteo y progesterona sanguínea en vaquillas receptoras de embriones de tres razas en pastoreo en Ecuador. Rev Prod Anim 29: 65-72.
3. Bastos M, Mattos M, Meschiatti M, Surjus R, Guardieiro M, Ferreira J, *et al.* 2010. Ovarian function and circulating hormones in nonlactating Nelore versus Holstein cows. Acta Sci Vet 38: 776.
4. Bello NM, Steibel JP, Pursley JR. 2006. Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of Ovsynch in lactating dairy cows. J Dairy Sci 89: 3413-3424. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72378-5
5. Bergfelt DR, Lightfoot K, Adams GP. 1994. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. Theriogenology 42: 895-907. doi: 10.1016/0093-691X(94)-90113-W
6. Bo GA, Adams GP, Caccia M, Martínez M, Pierson R, Mapletoft R. 1995. Ovarian follicular wave emer-

- gence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim Reprod Sci* 39: 193-204. doi: 10.1016/0378-4320-(95)01389-H
7. **Bo GA, Adams GP, Nasser L, Pierson R, Mapletoft R. 1993.** Effect of estradiol valerate ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. *Theriogenology* 40: 225-239. doi: 10.1016/0093-691X-(93)90261-3
  8. **Bo GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia M, Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, et al. 2002.** The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 57: 53-72. doi: 10.1016/s0093-691x(01)00657-4
  9. **Bungartz L, Niemann H. 1994.** Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J Reprod Fertil* 101: 583-591. doi: 10.1530/jrf.0.1010583
  10. **Chasombat J, Nagai T, Parnpai R, Vongpralub T. 2013.** Ovarian follicular dynamics and hormones throughout the estrous cycle in Thai native (*Bos indicus*) heifers. *Anim Sci J* 85: 15-24. doi: 10.1111/asj.12086
  11. **Colazo MG, Gordon MB, Rajamahendran R, Mapletoft RJ, Ambrose DJ. 2009.** Pregnancy rates to timed artificial insemination in dairy cows treated with gonadotropin-releasing hormone or porcine luteinizing hormone. *Theriogenology* 72: 262-270. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.02.017
  12. **Dorneles R, Nogueira G, Rocha M, Passoni P, Padilha J, Pereira J, Floriani A. 2017.** Characterizing emergence and divergence in the first follicular wave in a tropically adapted *Bos taurus* breed. *Theriogenology* 88: 9-17. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.09.041
  13. **Echternkamp SE, Cushman RA, Allan MF. 2009.** Size of ovulatory follicles in cattle expressing multiple ovulations naturally and its influence on corpus luteum development and fertility. *J Anim Sci* 87: 3556-3568. doi: 10.2527/jas.2009-2049
  14. **Gimenes LU, Sá Filho MF, Carvalho NA, Torres-Júnior JR, Souza AH, Madureira EH, Trinca LA, et al. 2008.** Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology* 69: 852-858. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.01.001
  15. **Hidaka T, Fukumoto Y, Yamamoto Y, Ogata Y, Horiuchi T. 2018.** Estradiol benzoate treatment before ovum pick-up increases the number of good quality oocytes retrieved and improves the production of transferable embryos in Japanese Black cattle. *Vet Anim Sci* 5: 1-6. doi: 10.1016/j.vas.2018.02.001
  16. **Kohram H, Twagiramungu H, Bousquet D, Durocher J, Guilbault LA. 1998.** Ovarian superstimulation after follicular wave synchronization with GnRH at two different stages of the estrous cycle in cattle. *Theriogenology* 49: 1175-1186. doi: 10.1016/S0093-691X(98)00065-X
  17. **Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP. 2003.** Oocyte and embryo quality: Effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Domest Anim* 38: 259-267. doi: 10.1046/j.1439-0531.2003.-00437.x
  18. **Macmillan KL, Thatcher WW. 1991.** Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol Reprod* 45: 883-889. doi: 10.1095/biolreprod45.6.883
  19. **Martinez MF, Adams GP, Bergfelt DR, Kastelic JP, Mapletoft RJ. 1999.** Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. *Anim Reprod Sci* 57: 23-33. doi: 10.1016/s0378-4320(99)00057-3
  20. **Morotti F, Moretti R, Gomes GM, Silva-Santos KC, Ramos Cerqueira PH, Marcondes M. 2018.** Ovarian follicular dynamics and conception rate in *Bos indicus* cows with different antral follicle counts subjected to timed artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 188: 170-

177. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.-12.001
21. **[OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2019.** Utilización de animales en la investigación y educación. En: Código Sanitario para los Animales Terrestres. p 1-12.
22. **Quispe C, Mercado J, Fernández E, Mixan E, Gamarra S, Mellisho E. 2014.** Efecto de tratamientos con benzoato de estradiol o GnRH sobre la dinámica folicular para aspiración de folículos (Ovum pick up) guiada por ultrasonido en vacas lecheras. *Spermova* 4: 86-88.
23. **Ramos AF, Rumpf R, Câmara JU, Mollo MR, Pivato I, Marques AP, Sartori R. 2010.** Effect of follicular wave synchronization on *in vitro* embryo production in heifers. *Anim Reprod Sci* 117: 201-207. doi: 10.1016/j.anireprosci.-2009.04.009
24. **Sá Filho MF, Baldrighi JM, Sales J, Crepaldi GA, Carvalho J, Bó GA, Baruselli PS. 2011.** Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci* 129: 132-139. doi: 10.1016/j.anireprosci.2011.12.005
25. **Sartori R, Fricke PM, Ferreira JC, Ginther OJ, Wiltbank M. 2001.** Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol Reprod* 65: 1403-1409. doi: 10.1095/biolreprod65.5.1403
26. **Sartori R, Haughian JM, Shaver RD, Rosa GJ, Wiltbank MC. 2004.** Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J Dairy Sci* 87: 905-920. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73235-X
27. **Sartori R, Monteiro PLJ, Wiltbank MC. 2016.** Endocrine and metabolic differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* cows and implications for reproductive management. *Anim Reprod* 13: 168-181. doi: 10.21451/1984-3143-AR868
28. **Small JA, Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ. 2009.** Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. *Theriogenology* 71: 698-706. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.045