

**JHONATA VIEIRA TAVARES DO NASCIMENTO PEREIRA**

**VARIÁVEIS MORFOMÉTRICA E HORMONAIAS OVARIANA E SANGUÍNEA DE  
VACAS NELORE SUBMETIDAS A DIFERENTES PROTOCOLOS DE IATF**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2014**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

P436v  
2014  
Pereira, Jhonata Vieira Tavares do Nascimento, 1987-  
Variáveis morfométrica e hormonais ovariana e sanguínea  
de vacas Nelore submetidas a diferentes protocolos de IATF /  
Jhonata Vieira Tavares do Nascimento Pereira. – Viçosa, MG,  
2014.

vii, 59f. : il. ; 29 cm.

Orientador: José Domingos Guimarães.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Bovino - Inseminação artificial. 2. Bovino de corte.  
3. Fluido folicular. 4. Sincronização do estro. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de  
Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.213

## AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre iluminando meus caminhos e por me dar a força que eu preciso para enfrentar os desafios da vida com dignidade.

Ao meu pai, Mauro, que nunca me faltou com o seu amor, amizade, paciência e conselhos. Além de todo seu esforço e suor para que eu me tornasse Médico Veterinário, e continuasse na especialização. Sem ele, nada seria possível.

Ao meu orientador, JD, por todas as oportunidades, ensinamentos, amizade, conselhos e por todo seu empenho na realização desse trabalho. Sem ele esse trabalho não possível.

À minha namorada, Vívian, pela paciência, amor e cuidados que ela sempre tem comigo, e pela contribuição na parte final desse trabalho.

Ao meu amigo Victor Leon, não só pela amizade, mas por todo o seu profissionalismo e toda ajuda neste e em vários trabalhos que realizamos juntos.

A todos os meus amigos e familiares, que compreendem a minha ausência, e sempre me recebem de braços abertos.

Ao Faider, e a todos os meus amigos da UFV, que contribuíram na realização do estudo com perfil metabólico e estresse em bovinos de leite. Devido ao grande número de pessoas que participaram desse estudo, optei por não citar todos os nomes para não ser injusto com alguém que eu poderia não lembrar no momento. Agradeço também ao professor Marcos, coordenador da Unidade de Ensino Pesquisa e Extensão de Gado de Leite da UFV, por ter disponibilizado toda estrutura para realização do estudo com bovinos de leite, além do gerente, Leornado, e demais funcionários dessa unidade.

À fazenda Derribadinha, de propriedade da Unicafé, em especial ao Wallace, diretor dessa empresa, que prontamente disponibilizou toda estrutura da fazenda e por todo seu empenho para que fosse possível a realização desse trabalho.

Ao Vagner, Itamiro e a todos os funcionários da fazenda Derribadinha, que não mediram esforços durante a execução desse estudo, além da receptividade que encontramos em todos os locais que passamos.

Ao programa REUNI e à CAPES, pela bolsa concedida durante o mestrado.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. A todos os funcionários do Departamento de Medicina Veterinária, em especial à Rosi.

Aos membros da banca examinadora, professores Ciro e Cristina, que prontamente se disponibilizaram para participar desse trabalho.

A todos, um grande abraço.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1. Inseminação artificial em tempo fixo (IATF).....	3
2.2. Ciclo estral e desenvolvimento folicular na vaca .....	4
2.3. Detecção de estro x IATF .....	5
2.4. Função dos hormônios utilizados na IATF .....	6
2.4.1. Prostaglandina F <sub>2</sub> α .....	8
2.4.2 Progestágenos .....	10
2.4.3. 17β estradiol.....	11
2.4.4. Gonadotropina coriônica equina (eCG) .....	12
2.5. Ação de hormônios e metabólitos sobre a reprodução .....	12
2.5.1 Progesterona e estradiol .....	13
2.5.2. Insulina.....	13
2.6. Quimioluminescência .....	15
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	24
<b>4. CAPÍTULO 1</b> .....	34
4.1. Introdução .....	36
4.2. Material e Métodos .....	37
4.3. Resultados e Discussão .....	39
4.4. Conclusões .....	48
4.5. Referências.....	48

## RESUMO

PEREIRA, Jhonata Vieira Tavares do Nascimento. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Variáveis morfológica e hormonais ovariana e sanguínea de vacas Nelore submetidas a diferentes protocolos de IATF.** Orientador: José Domingos Guimarães.

O objetivo desse estudo foi verificar os efeitos que diferentes protocolos de indução e sincronização do estro e da ovulação, com utilização de eCG, BE, CE ou GnRH associados a um progestágeno, podem ter sobre o crescimento e diâmetro do folículo pré-ovulatório, e suas relações com a concentração, no fluido folicular, de progesterona, LH, insulina e cortisol, e com a concentração sérica de progesterona, cortisol e insulina das vacas submetidas aos protocolos. Foram utilizadas 90 vacas Nelore solteiras, com mais de nove meses pós-parto, divididas em seis protocolos, sendo 15 vacas por protocolo. Todos os protocolos consistiam na colocação e retirada de um dispositivo intravaginal de progesterona (DIP) (0,75 gramas de progesterona) no primeiro e no oitavo dia, respectivamente; aplicação de prostaglandina ( $PGF2\alpha$ ) no oitavo dia; e exceto no protocolo 1, foi utilizado benzoato de estradiol (BE) no dia 1. As outras diferenças no esquema dos protocolos foram: protocolo 1 – dia 1 e dia 8 (GnRH); protocolo 2 – Dia 6 ( $PGF2\alpha$ ), dia 8 ( $PGF2\alpha$  + cipionato de estradiol (CE)); protocolo 3 – dia 8 (eCG + CE); protocolo 4 – dia 8 (eCG + BE); protocolo 5 – dia 8 (eCG), dia 9 (BE); protocolo 6 – dia 9 (BE). Em geral, 93,3 % (84/90) de vacas responderam ao protocolo de sincronização. Entretanto, foi observado que 28,9 % das vacas (26/90) não apresentaram sincronização eficiente de uma nova onda folicular, constatado pelo número de vacas que não desenvolveram folículo dominante (5/26), as vacas que ovularam precocemente (15/26), e as vacas que tiveram um folículo dominante que estava em processo de regressão (6/26). Não houve diferença estatística no crescimento e diâmetro do folículo pré-ovulatório entre os protocolos. Não houve efeito, entre os protocolos, na concentração no fluido folicular de progesterona, LH, insulina, cortisol, bem como na concentração sérica de cortisol e insulina. Contudo, no protocolo 2, foi verificada menor concentração sérica ( $P < 0,05$ ) de progesterona na retirada do DIP. Foram recuperados 27 ovócitos, que foram classificados de acordo com a qualidade em 1 (n=12), 2 (n=6), 3 (n=7) e 4 (n=2). A antecipação na aplicação de

prostaglandina, em dois dias da retirada do DIP, resulta em menor concentração de progesterona circulante.

## ABSTRACT

PEREIRA, Jhonata Vieira Tavares do Nascimento. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2014. **Morphometric variable and ovarian hormone and blood of cows Nelore submitted to different protocols of TAI.** Adviser: José Domingos Guimarães.

This study was aimed to investigate the effects that different protocols for induction and synchronization of estrus and ovulation, with the use of eCG, BE, CE or GnRH associated with progestin could have on the follicle growth and pre-ovulatory follicle diameter. Furthermore the relationship with progesterone, LH, insulin, cortisol in the follicular fluid concentration and progesterone, cortisol, insulin serum concentrations of cows submitted to protocols. Ninety Nelore suckled cows were divided into six groups, 15 cows per protocol. The protocols consisted in the placement and removal of an intravaginal progesterone device (IPD) (0.75g of progesterone) in the first and eighth day respectively; application of prostaglandin (PGF2  $\alpha$ ) on the eighth day, and except in protocol 1 was used estradiol benzoate (EB) on day 1. The other differences in the delineation of protocols were: Protocol 1 – day 1 and day 8 (GnRH); Protocol 2 – day 6 (PGF2  $\alpha$ ), day 8 (PGF2  $\alpha$  + estradiol cypionate (EC)); Protocol 3 – day 8 (eCG + EC); Protocol 4 – day 8 (eCG + EB); Protocol 5 – day 8 (eCG), day 9 (EB); Protocol 6 – day 9 (EB). Overall 93.3% (84/90) of cows responded to synchronization protocol. However, it was observed that 28.9% of cows (26/90) did not have a synchronization of a new follicular wave, checked by the number of cows which have not developed a dominant follicle (5/26), cows with early ovulation (15/26) and cows that had a dominant follicle in regression process (6/26). There was no statistical difference in growth and diameter of the pre-ovulatory follicle between protocols. Progesterone, LH, insulin, cortisol concentrations on follicular fluid, as well as in cortisol and insulin serum concentration did not differ with the protocols used. Although, in protocol 2, lower progesterone concentrations ( $P < 0.05$ ) were observed in the withdrawal of IPD. Twenty seven oocytes were recovered, which were classified according to quality: 1 (n=12), 2 (n=6), 3 (n=7) e 4 (n=2). The anticipation in the prostaglandin application in two days from IPD withdrawal result in lower progesterone concentrations.

## 1. INTRODUÇÃO

A situação econômica da pecuária mundial exige dos produtores máxima eficiência para ter retorno econômico. Desta forma, elevados índices de produção, associados à alta eficiência reprodutiva, devem ser metas que norteiam os técnicos e criadores a alcançar melhor produtividade e satisfatório retorno econômico na atividade. Neste contexto, a otimização da eficiência reprodutiva é um dos principais fatores que contribuem para a melhora do desempenho produtivo e da lucratividade dos rebanhos bovinos (BARUSELLI et al., 2002).

O Brasil tornou-se o maior produtor e exportador mundial de carne bovina por meio da aplicação de novas técnicas de biotecnologia, como a fertilização *in vitro* (FIV), transferência de embriões, sexagem de sêmen, inseminação artificial (IA), inseminação artificial em tempo fixo (IATF) entre outros (BARUSELLI et al., 2004).

No entanto, a IA, que é a principal biotecnologia de melhoramento genético, devido aos problemas relacionados à detecção do estro, tem sido subutilizada, porque, em alguns casos, pode ocorrer importante redução da taxa de prenhez (PEREIRA, 2006). Uma das formas para solucionar tais problemas é desenvolver e utilizar protocolos de sincronização do ciclo estral e ovulação que permitam realizar a IA com horário pré-determinado, ou seja, sem a necessidade da detecção do estro. Os protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) objetivam induzir a emergência de uma nova onda de crescimento folicular, controlar a duração do crescimento folicular até o estágio pré-ovulatório, por meio da inserção e retirada de uma fonte de progesterona exógena (dispositivo vaginal ou implante auricular) e endógena (prostaglandina F<sub>2α</sub>) e induzir a ovulação sincronizada em todos os animais simultaneamente (BARUSELLI et al., 2006).

Os protocolos hormonais, utilizados em vacas no pós-parto, possibilitam que a maior parte das fêmeas do rebanho retorne à ciclicidade e se tornem gestantes em um período reduzido de tempo (BARUSELLI et al., 2004). Portanto, os programas de indução e sincronização de estros são métodos que precisam apresentar repetibilidade e ser minimamente dependentes do ambiente. Com isso, possibilitam elevadas taxas de prenhez, nas diferentes categorias de fêmeas, regiões e diferentes condições edafoclimáticas. Quanto menor a necessidade de observação de estro, mais práticos e atrativos tornar-se-ão os programas de IA. Alguns autores propuseram que a IATF pode ser uma estratégia de manejo capaz de eliminar a necessidade de detecção do estro, com

resultados iguais ou superiores à inseminação convencional pelo método de Trimberg (DISKIN et al., 2002; MAPLETOFT et al., 2002).

As principais vantagens desta técnica são: redução do custo com a mão de obra para observação do estro, além de eliminar possíveis erros de detecção (BARUSELLI et al., 2004); redução do custo com manejo de outros animais, dispensando o uso de rufiões; concentra os trabalhos em dias pré-determinados; concentração dos partos em um determinado período; aumento do número de animais inseminados e homogeneização dos lotes (BARROS; FERNANDEZ, 1998); além de induzir a ciclicidade em vacas em anestro, permitindo a inseminação dessas fêmeas e diminuindo o investimento com touros (BARUSELLI et al., 2003).

Deste modo, no intuito de encurtar o período de serviço das vacas, diferentes protocolos de sincronização de estro e indução da ovulação têm sido preconizados e largamente empregados na atividade da bovinocultura de corte. No ano de 2012 aproximadamente 2,5 milhões de vacas foram inseminadas com a utilização de protocolos de IATF na Argentina e cerca de 6,5 milhões no Brasil (BÓ et al., 2013).

Os programas mais comuns de IATF, utilizados em bovinos de corte, são baseados na utilização de hormônios como estradiol, GnRH e PGF2 $\alpha$ , e incluem o uso de um dispositivo intravaginal de liberação lenta de progesterona. As taxas de concepção reportadas com utilização desses protocolos têm sido entre 40 e 50%, variando de 27,8 a 75% (BO et al., 2002; BO et al., 2007).

Neste contexto, é provável que os protocolos de IATF ocasionem diferentes respostas entre os fatores que se relacionam ao crescimento folicular, taxa de ovulação, qualidade do ovócito, entre outros, que podem interferir na viabilidade embrionária e, conseqüentemente, na taxa de prenhez.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Inseminação artificial em tempo fixo (IATF)**

A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) é uma técnica consagrada e viável, a qual consiste em sincronizar a ovulação em vacas por meio de aplicações de hormônios, para melhorar o manejo na propriedade (BARROS, 2007).

Para um rebanho comercial obter máximo desempenho reprodutivo seria desejável a produção de um bezerro/vaca/ano (THOMAS, 1992) e, para tal, as vacas deveriam

conceber no máximo entre o 80º e o 85º dia do pós-parto, visto que, o período de gestação é de aproximadamente 280 dias. Nas raças zebuínas, essa meta é mais difícil de ser alcançada em virtude do maior período de gestação, de aproximadamente, 10 dias em relação as taurinas, devendo conceber entre o 70º e o 75º dia do pós-parto (MADUREIRA, 2004).

Com a IATF, toda reprodução fica sob controle do produtor. Por meio desta técnica, as vacas tratadas são inseminadas com data marcada e sem a necessidade de se observar o estro. Dessa forma, o criador pode inseminar mais vacas em menos tempo, programar a inseminação e o nascimento dos bezerros, aumentando o número de bezerros de IA ao início da estação de nascimento e obter um melhor aproveitamento da mão de obra. A vantagem econômica da IATF é uma questão importante e vai depender do uso correto da técnica (CLIMENI; PICCININ, 2008).

Dentre as principais vantagens da IATF, destacam-se a redução da mão de obra e concentração das atividades; elimina a detecção do estro; reduz o período de serviço e intervalo de partos; permite a concentração da estação de inseminação e da parição em épocas mais desejáveis, e com isso possibilita padronizar os lotes de bezerros e aumentar a eficiência no índice de desmame (peso ao desmame e número de animais desmamados), refletindo diretamente no custo/benefício da atividade (BARTOLOMEU et al., 2003; GONÇALVES, 2004).

## 2.2. Ciclo estral e desenvolvimento folicular na vaca

O ciclo estral em bovinos apresenta duração média de 17 a 25 dias (SIROIS; FORTUNE, 1988) e é regido por interações e antagonismos de hormônios secretados pelo hipotálamo, hipófise, gônadas e útero. Esse período pode ser dividido em duas fases distintas: a folicular ou estrogênica, que se estende do pró-estro ao estro culminando na ovulação, e a luteínica ou progesterônica, que compreende o metaestro e o diestro culminando com a luteólise (MACMILLAN; BURKE, 1996).

Durante um ciclo estral, ocorrem normalmente duas ou três ondas de crescimento folicular consecutivas, sendo apenas a última, a onda ovulatória. O folículo ovulado passa por mudanças funcionais e estruturais para dar origem ao corpo lúteo (CL). O CL desenvolve-se rapidamente, secretando quantidades crescentes de progesterona (P4). Entre os dias 16-18, ocorre o processo de luteólise que causa a regressão do CL e a conseqüente queda das concentrações plasmáticas de P4 (ADAMS; PIERSON, 1995).

Cada onda de crescimento folicular é caracterizada pelas fases de recrutamento, seleção e dominância. O folículo dominante (FD) de uma onda tem dois destinos possíveis. Na presença de P4 acima de 1ng/mL, o FD entra em regressão ou atresia. Durante e após o processo de luteólise, o FD continua seu crescimento até a ovulação. Se não houver fertilização do ovócito ovulado, o ciclo se repetirá (BINELLI et al., 2006).

As concentrações decrescentes de FSH limitam o crescimento folicular e a maioria dos folículos recrutados entra em atresia. A seleção folicular é o ajuste do número de folículos recrutados para o número de folículos ovulados normalmente, em um ciclo estral. Assim, dentre os folículos recrutados em cada onda, apenas um é selecionado (diâmetro de 8-9 mm). Por meio de avaliações ultrassonográficas pode-se definir a seleção pelo momento do “desvio” folicular, que é o momento no qual o folículo selecionado passa a ter uma taxa de crescimento (aumento diário de diâmetro) maior que os outros folículos recrutados na mesma onda (GINTHER et al., 2001).

Os mecanismos de seleção são controversos, mas provavelmente o folículo selecionado apresenta mais precocemente a capacidade de responder ao estímulo provido pelo hormônio luteinizante – LH (DRIANCOURT, 2001; SARTORI et al., 2001). Em resposta ao LH, o folículo selecionado continua a crescer e sua capacidade de produzir E<sub>2</sub> e inibina aumenta. Tal fato leva a queda das concentrações de FSH a concentrações basais e o folículo selecionado se torna dominante (GINTHER et al., 1999).

Alternativamente, na fase folicular do ciclo, com a ausência de P4 ocorre aumento na frequência de pulsos de LH que estimula a liberação de quantidades crescentes de E<sub>2</sub> pelo FD. O E<sub>2</sub> induz mudanças de comportamento associadas ao estro e induz a liberação de um pico pré-ovulatório de GnRH, seguido por um pico de liberação de LH que causa a ovulação do FD (HAFEZ, 1995).

### 2.3. Detecção de estro x IATF

A detecção visual do estro depende de vários fatores como: conhecer os sinais do animal em estro, tempo gasto para a observação, horário para a observação, horário da IA e especialização e dedicação da mão de obra destinada ao serviço. O tempo gasto para a observação do estro pode ser citado como um fator de extrema importância, portanto pode-se concluir que quanto mais vezes e por mais tempo se observar os

animais, mais eficiente seria a detecção de estro. A detecção do estro é mais difícil quanto menor for a duração do estro (BARUSELLI et al., 2002).

A detecção de estro pode ser facilitada por algumas medidas de manejo como: à utilização de rufiões com buçal marcador, maior frequência de observação e bonificação para os funcionários. A detecção de estro não é tão fácil quanto parece, é necessário um entendimento da fisiologia e comportamento da vaca, exigindo uma mão-de-obra treinada para esta função. Deste modo, muitos sistemas foram desenvolvidos em busca de melhorar eficiência na detecção de estro: utilização de rufião com buçal marcador, vaca androgenizada, “Kamar” (pastilha com tinta), “raspadinha” (se desgasta no ato da monta), passagem de giz na cauda, pedômetro, medidor de progesterona e “Heat Watch” (mede a pressão exercida durante a monta). Porém, muitos destes métodos não possuem comprovação de sua eficácia e outros são muito caros, o que inviabiliza sua utilização (BO et al., 2002b).

Com a evolução e o estabelecimento da técnica de IA, os problemas, como detecção de estros, baixo número de animais inseminados e principalmente a necessidade de mão de obra em tempo integral, levaram à busca por alternativas, sem comprometer os índices reprodutivos (BARUSELLI et al., 2004). Assim, surgiram as técnicas de sincronização de estros e da ovulação que permitem a realização da IATF e possibilitam inseminar um grande número de animais (até 400 inseminações/dia) no momento mais apropriado aos técnicos e produtores, sem a necessidade de observar os estros (AYRES et al., 2006; TORRES-JÚNIOR et al., 2007).

Os programas de IATF seguem a lógica de iniciar uma onda folicular sincronizada em todos os animais, controlar a duração da fase luteal e o crescimento folicular com um dispositivo de liberação de progesterona até o estágio pré-ovulatório e depois sincronizar a ovulação, retirando a progesterona exógena (dispositivo) e endógena (prostaglandina F<sub>2α</sub>) e aplicando um indutor de ovulação (estradiol, eCG, hCG, GnRH ou LHp) para definir o momento desta.

#### 2.4. Função dos hormônios utilizados na IATF

O controle farmacológico do ciclo estral e da ovulação de vacas depende primeiramente do comportamento fisiológico reprodutivo da vaca, o qual está ligado diretamente com seu estado nutricional e condição (parida ou solteira). Neste mesmo

sentido as interações e funções de hormônios aplicados para este fim, requerem compreensão e análise do seu funcionamento fisiológico.

Muitos hormônios têm sido usados como produtos farmacológicos para sincronizar o estro e a ovulação de bovinos. Três classes principais de hormônios são usadas: 1- Prostaglandinas (PG) e seus análogos; 2- esteróides (progesterona e estradiol 17 $\beta$ ); e 3- peptídeos pequenos (hormônio liberador de gonadotropinas-GnRH) e glicoproteínas (gonadotropina coriônica humana - hCG, gonadotrópina coriônica equina - eCG).

#### 2.4.1 Prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$

Foi Babcock em 1966 o primeiro a sugerir que uma prostaglandina seria a substância secretada pelo útero e que provocaria a luteólise. Posteriormente, MCCracken et al., (1972) comprovaram que a prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  (PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ) é um fator luteolítico na ovelha. As PGs são derivados de lipídeos compostos de ácidos graxos insaturados com 20 carbonos, a partir do ácido araquidônico. A PGF<sub>2</sub> $\alpha$  é sintetizada principalmente no útero, mas também é produzida pelo próprio CL, e é o mais importante fator luteolítico. Sua ação luteolítica principal é promover a vasoconstrição seguida de uma cascata apoptótica. Após sua descoberta, esta substância foi modificada e deu origem aos seus análogos (Dinoprost trometamina, cloprostenol sódico, alfoprostol, fenprostalene, luprostiol e tiaprost) (LOPEZ, 2005). O sucesso da sincronização do estro com PGF<sub>2</sub> $\alpha$  depende da presença de um CL, visto que, a ação da mesma é desencadear a regressão morfológica e funcional dessa estrutura. A maturidade do CL no momento da aplicação da PGF<sub>2</sub> $\alpha$  influencia a resposta luteolítica. Assim, a PGF<sub>2</sub> $\alpha$  não induz efetivamente a luteólise durante os primeiros 5 ou 6 dias após o estro (RATHBONE et al., 2001) visto que, antes deste período o CL não possui receptores para a ação da PGF<sub>2</sub> $\alpha$ .

Nas fêmeas em que se verifica a luteólise, a ocorrência do estro é distribuída num intervalo de cinco ou mais dias, o que tornam impraticáveis os programas de inseminação e transferência de embriões em tempo fixo (BO et al., 2002). Esta variação no intervalo da aplicação da PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , o estro e a ovulação, é decorrente do estágio de desenvolvimento dos folículos no momento do tratamento. Dessa forma, se o tratamento é realizado quando o folículo dominante está na fase final do seu crescimento, ou no início da sua fase estática, a ovulação irá ocorrer dentro de 2 a 3 dias. Por outro lado, se

a  $\text{PGF}_2\alpha$  for aplicada quando o folículo dominante estiver no meio ou no final da sua fase estática, a ovulação irá ocorrer 5 a 7 dias mais tarde, após o crescimento do folículo dominante da próxima onda folicular (KASTELIC; GINTHER, 1991).

As grandes variações no intervalo de tempo do tratamento à ovulação, além do manejo da detecção de estro, reforçam a necessidade de protocolos destinados a controlar tanto o estado luteal quanto o crescimento folicular e a ovulação. Assim, quando a luteólise é induzida por tratamento com  $\text{PGF}_2\alpha$ , o começo do estro é distribuído por um período de seis dias. Essa variação é devida ao status folicular dos ovários no momento em que é administrado a  $\text{PGF}_2\alpha$  (MAPLETOFT et al., 2009).

#### 2.4.2. Progestágenos

O nome progestágeno é utilizado para substâncias farmacológicas de efeitos similares a progesterona. Começaram a ser desenvolvidos nos anos 50 por via oral e a partir dos anos 60 começaram a ser utilizados na sincronização do estro de bovinos. Porém, tratamentos com progestágenos foram realizados por períodos prolongados, e os resultados após as sincronizações, resultavam em baixa taxa de prenhez (MADUREIRA et al., 2006). Desde então, os progestágenos foram utilizados com o objetivo de simular uma fase luteal por períodos que permitam a regressão espontânea do CL, o que leva a uma sincronização do estro de aproximadamente 4 dias após a remoção do agente progestacional (RATHBONE et al., 2001).

A liberação de LH pela hipófise é primariamente controlada pela P4 e pelo estradiol ( $\text{E}_2$ ) (KINDER et al., 1996). No início da fase luteal (2 a 3 dias após a ovulação, quando o CL ainda não está completamente formado) as concentrações de P4 são menores e os pulsos de LH ocorrem numa frequência maior do que no meio da fase luteal (PETERS et al., 2000). O mesmo ocorre após a luteólise, quando há maior concentração e frequência dos pulsos de LH, em consequência de uma concentração de P4 circulante mais baixa. A P4 inibe o estro, a ovulação e altera a dinâmica folicular, atuando sobre o hipotálamo e regulando a liberação de GnRH (PETERS et al., 2000) e consequentemente LH. Assim, a administração de progestágenos por um período suficiente para permitir a regressão natural do CL (ou seja, 14 dias ou mais) pode induzir o estro sincronizado, uma vez que a supressão do tratamento progestacional leva à ocorrência do pico de LH e à ovulação.

A exposição prolongada aos progestágenos leva a maturação ovocitária anormal, transporte de gametas e do embrião anormal, baixa taxa de concepção, ou uma preparação inadequada do útero para receber o embrião, levando a um aumento da mortalidade embrionária (WEHRMAN et al., 1993). Além disso, é fundamental que uma onda folicular se inicie durante o período de exposição ao progestágeno. Com esta finalidade, a associação entre progestágenos e estradiol é o tratamento para indução e/ou sincronização de estro mais utilizado em bovinos.

Um dos progestágenos sintéticos mais utilizados em bovinos é o acetato de medroxiprogesterona (MAP), mas também pode se encontrar no mercado o acetato chlormadiona (CAP), o acetato de melengestrol (MGA) e o norgestomet. Os dispositivos intravaginais contendo MAP tornaram-se uma alternativa interessante, atingindo bons resultados com custo inferior aos outros dispositivos com progestágenos disponíveis no mercado (SIQUEIRA et al., 2008).

Uma das vantagens dos tratamentos baseados no emprego de progesterona e/ou progestágenos, além de permitir a sincronização de estro em fêmeas ciclando, é a possibilidade de induzir a retomada da ciclicidade em vacas em anestro. O tratamento de fêmeas amamentando, no período do pós-parto com progestágeno mantém o folículo dominante para que o mesmo alcance sua maturação final e ovule após a retirada do hormônio (YAVAS; WALTON, 2000).

#### 2.4.3. $17\beta$ estradiol

Como visto anteriormente a concentração de estradiol  $17\beta$  ( $E_2$ ) flutua durante o ciclo estral, exercendo uma importante influência na dinâmica folicular e na atividade folicular. O estrógeno atua nos vasos sanguíneos, crescimento glandular e crescimento epitelial, preparando a fêmea para a receptividade sexual. Altas concentrações de  $E_2$  também influenciam no comportamento da fêmea e eventos copulatórios (GINTHER et al., 1999).

A utilização do  $E_2$  em programas de sincronização de estro e ovulação está relacionada com sua habilidade em induzir o surgimento da onda pré-ovulatória de LH, luteólise durante a fase folicular e atresia folicular (WILTBANK et al., 1961; BO et al., 1993; LAMMOGLIA et al., 1998). A aplicação de estrógenos causa, inicialmente, uma supressão na secreção tanto de FSH quanto de LH (MARTINEZ et al., 2003) levando à atresia dos folículos. Segue a liberação de um pico de FSH e, conseqüentemente, o

recrutamento de uma nova onda (BINELLI et al., 2006). O intervalo da aplicação do estrógeno ao recrutamento da nova onda depende da dose administrada e da natureza do estrógeno, variando em torno de 36 a 72 horas (MARTINEZ et al., 2005). O desenvolvimento de uma nova onda folicular situa-se em torno de quatro dias após a aplicação do E<sub>2</sub> e depende do reaparecimento do pico de FSH (BO et al., 1993). Na ausência de progesterona, o E<sub>2</sub> induz liberação de GnRH e LH e ovulação do FD em 36 a 72 horas, dependendo do éster de estradiol empregado.

Diferentes ésteres de E<sub>2</sub> vêm sendo utilizados para a sincronização do estro. A maioria é utilizada como soluções injetáveis, como o valerato de estradiol, benzoato de estradiol, cipionato de estradiol e E<sub>2</sub> (BO et al., 1994; MURRAY et al., 1998). A maior diferença entre estes compostos é a meia-vida após a administração, a duração da meia-vida é maior em ordem crescente: estradiol 17 $\beta$ , benzoato de estradiol, valerato de estradiol e cipionato de estradiol. Cada um deles apresenta um metabolismo diferente. Por exemplo, a administração de uma única injeção de valerato de estradiol (5mg) resulta na elevação da concentração plasmática de estradiol por um período de 5 a 7 dias (BO et al., 1993), sendo que uma única injeção de E<sub>2</sub> (5mg) resulta na elevação plasmática de estradiol por apenas 42 horas (BO et al., 1994). Estas diferenças promovem mudanças referentes ao protocolo de sincronização estabelecido (LOPEZ, 2005). Os estrógenos de longa duração promovem um surgimento de onda folicular muito variável e ainda podem estar ativos no momento de induzir a ovulação durante o protocolo de IATF.

#### 2.4.4. Gonadotropina coriônica eqüina (eCG)

A gonadotropina coriônica equina (eCG), é um fármaco de meia vida longa (até três dias), conhecida também como PMSG (gonadotropina do soro da égua prenhe), é produzida nos cálices endometriais pelas células sincíotrofoblástica da placenta equina e, similarmente ao hCG, atua primariamente como FSH luteotrópico promovendo estímulo para manutenção de CL e formação de corpos lúteos acessórios na égua (SENGER, 2003).

Diversos estudos mostram a ocorrência de efeitos deletérios no desenvolvimento embrionário inicial e no reconhecimento materno da gestação, relacionados à baixa concentração de progesterona (MANN; HARESIGN, 2001). Sendo assim, uma possível

solução para evitar baixas concentrações de P4 no diestro, seria aumentar a produção desse hormônio nesta fase.

O eCG também cria condições de crescimento folicular e de ovulação. Diante disso, pesquisadores tem incorporado o eCG em protocolos de IATF e relatam aumento na fertilidade. O eCG possui atividade de FSH e LH, por isso é capaz de promover o crescimento de um ou vários folículos quando administrado, dependendo da dose (BARUSELLI et al., 2004). O eCG está sendo usado para estimular o desenvolvimento folicular em vacas em anestro ou de baixa ciclicidade e em vacas recém paridas (período pós-parto menor que 60 dias).

O eCG administrado no final da fase de crescimento do folículo dominante, é capaz de induzir a ovulação e/ou luteinização devido sua atividade LH (BARUSELLI et al., 2004). Por possuir ação folículo estimulante e luteinizante, em fêmeas bovinas (MURPHY, B.D.; MARTINUK, S.D., 1991), é capaz de aumentar as concentrações plasmáticas de P4, principalmente quando administrado após a fase de divergência folicular. Com isso, ocorre um aumento da taxa de crescimento folicular, culminando com um maior folículo dominante e, conseqüentemente, maior CL, que pode resultar em aumento na taxa de concepção e de prenhez, em relação às fêmeas que não foram tratadas com eCG (BARUSELLI et al., 2003).

## 2.5. Ação de hormônios e metabólitos sobre a reprodução

### 2.5.1. Progesterona e estradiol

As concentrações de progesterona atingem valores máximos cerca de duas semanas após a ovulação e assim permanecem até pouco antes do parto. Durante a gestação de vacas da raça Nelore foram registradas concentrações de progesterona de 11,5 ng/mL até os 270 dias e no pós-parto, estes valores caíram para 0,1 ng/mL (MUCCIOLO; BARBEIRO, 1983).

O estradiol influencia a neurotransmissão do cérebro no controle da secreção pulsátil de GnRH (SMITH; JENNES, 2001) pelo aumento de receptores de GnRH nas células basófilas na hipófise anterior (SCHOENEMANN et al., 1985).

As concentrações plasmáticas de estrógeno aumentam rapidamente após o parto (WETTEMANN, 1980). Porém durante o período anovulatório pós-parto, as concentrações de estradiol no plasma podem aumentar por curta duração, mas esses

aumentos podem não estar associado ao crescimento e maturação folicular (STAGG et al., 1995). A ovulação no pós-parto é dependente da produção suficiente de estradiol pelo folículo dominante para estimular a síntese e liberação da gonadotrofina pré-ovulatória (DAY, 2004).

#### 2.5.2. Insulina

A insulina estimula a liberação de GnRH dos núcleos hipotalâmicos *in vitro* quando a glicose está disponível (ARIAS et al., 1992) e quando infundida nos ventrículos cerebrais de ovelhas desnutridas aumenta a secreção de LH (DANIEL et al., 2000). A insulina também estimula a esteroidogênese pelas células ovarianas bovinas (SPICER; ECHTERNKAMP, 1995) e em vacas sistematicamente tratadas com insulina podem aumentar o desenvolvimento folicular (HARRISON; RANDEL, 1986) e a produção de estradiol pelos folículos maiores (SIMPSON et al., 1994). Lucy (2002) verificou que as concentrações sanguíneas de insulina e IGF-I diminuem imediatamente após o parto, aumentando progressivamente a seguir.

#### 2.6. Quimioluminescência

Na medicina veterinária, e particularmente na pesquisa animal, deve-se considerar a utilização da quimioluminescência, pois esta é uma técnica analítica ecologicamente mais correta comparada ao radioimunoensaio (RIA). Além de oferecer maior segurança ao operador, por não utilizar material radioativo, diminuindo o risco de acidentes com materiais biológicos ou reagentes, a quimioluminescência pode proporcionar resultados mais apurados do ponto de vista do coeficiente de variação intraensaio, e, por se tratar de um método automatizado, em que não há manuseio de amostras e reagentes, evitando-se assim, os erros de pipetagem e trocas de reagentes, as transferências de líquidos e pipetagens são feitas de maneira precisa, permitindo segurança para a execução dos testes em uniplicata, além de possibilitar a execução de vários testes diferentes em uma mesma amostra de uma única vez, oferecendo maior rapidez para a obtenção dos resultados (CIARLINI et al., 2002).

Entretanto, alguns resultados ainda tornam a quimioluminescência vulnerável. Richardson et al. (1985) por exemplo, obtiveram uma boa correlação da quimioluminescência com o RIA ( $r = 0,93$ ) utilizando antígeno marcado com éster de acridio para mensurar a progesterona extraída do plasma de mulheres. A sensibilidade,

ou seja, a quantidade mínima do hormônio possível de ser dosado na amostra foi de  $0,64 \pm 0,2$  nmol/L. Para testar a acurácia da dosagem por quimioluminescência, amostras dosadas por RIA receberam dosagens crescentes de progesterona e foram dosadas novamente com RIA e quimioluminescência. Os resultados tiveram uma variação de -2,2% a -9,5%. Para estimar a variação intraensaio, dez amostras foram mensuradas em duplicata dentro de um único ensaio (CV% 7,2 a 12,5%). Para estimar a variação entre-ensaio, cinco ensaios foram feitos três vezes separadamente (CV% 12,4 a 23,3%).

Lee et al. (2010), descrevendo um método primário de mensuração de progesterona para certificação de materiais de referência, distribuíram amostras previamente dosadas para laboratórios de análises clínicas comerciais, que utilizam os métodos de quimioluminescência. Os resultados mostraram grande variação entre os laboratórios clínicos, por causa da baixa concentração de progesterona das amostras. Os resultados dos laboratórios clínicos não concordaram com a do método proposto, visto que, embora o método de quimioluminescência tenha uma sensibilidade analítica de  $0,21$  ng mL<sup>-1</sup>, a variância entre laboratórios clínicos era grande. O valor de um laboratório era quase 16 vezes maior do que o de outro laboratório. Portanto, recomenda-se que a certificação dos valores atribuídos aos calibradores ou materiais de controle deve ser assegurada por meio de procedimentos disponíveis de mensuração de referência.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Bovine model for study of ovarian follicular dynamics in humans. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 113-120, 1995.

ARIAS, P.; RODRIGUEZ, M.; SZWARCFARB, B.; SINAY, I. R.; MOGUILEVSKY, J. A. Effect of Insulin on Lhrh Release by Perfused Hypothalamic Fragments. **Neuroendocrinology**, v. 56, n. 3, p. 415-418, 1992.

AYRES, H.; TORRES-JUNIOR, J. R. S.; PENTEADO, L.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Efeito do momento da inseminação e do tratamento com GnRH na IATF sobre a taxa de concepção de vacas de corte lactantes sincronizadas com norgestomet e valerato de estradiol. **Acta Science Veterinariae**, v. 34, p. 408, 2006.

BABCOCK, J. C. Group discussion of 'Luteotrophic and luteolytic mechanisms in bovine corpora lutea' by W. Hansel. **J Reprod Fertil**, v. 47, n. 1, 1966.

BARROS, C. M. **Técnica cada vez mais utilizadas nos rebanhos brasileiros permite economia.**, Acesso em: 11 janeiro 2010.

BARROS, C. M.; FERNANDEZ, P. **Inseminação artificial com tempo fixo em zebuínos.** <http://www.abcz.org.br/eventos/anais/1998/112-127.doc>, Disponível em: < <http://www.abcz.org.br/eventos/anais/1998/112-127.doc> >. Acesso em: 3 de dezembro 2013.

BARTOLOMEU, C. C.; DEL REI, A. J.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; SILVA, J. E. Inseminação artificial em tempo fixo de vacas leiteiras mestiças Holando-Zebu no pós-parto com emprego de CIDR reutilizado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 426-427, 2003.

BARUSELLI, P. S.; AYRES, H.; SOUZA, A. H.; MARTINS, C. M.; GIMENES, L. V.; TORRES JR, J. R. S. Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovino de corte. In: 2º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2006, Paraná. **Anais**. Paraná, 2006. p. 113-128.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, N. A. T.; MADUREIRA, E. H.; CAMPOS FILHO, E. P. Efeito de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo na eficiência reprodutiva de vacas de corte lactantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, p. 218-221, 2002.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; REIS, E. L.; BÓ, G. A. Effect of eCG on pregnancy rates of lactating zebu beef cows treated with CIDR-B devices for timed artificial insemination. **Theriogenology**, v. 59, n. 1, p. 214, 2003.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BO, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 479-486, 2004.

BINELLI, M.; IBIAPINA, B. T.; BISINOTTO, R. S. Bases fisiológicas, farmacológicas e endócrinas dos tratamentos de sincronização do crescimento folicular e da ovulação. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. Supl 1, p. 1-7, 2006.

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

BO, G. A.; ADAMS, G. P.; NASSER, L. F.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Effect of Estradiol Valerate on Ovarian Follicles, Emergence of Follicular Waves and Circulating Gonadotropins in Heifers. **Theriogenology**, v. 40, n. 2, p. 225-239, 1993.

BO, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; TRIBULO, H. E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R. J. Follicular Wave Dynamics after Estradiol-17-Beta Treatment of Heifers with or without a Progestogen Implant. **Theriogenology**, v. 41, n. 8, p. 1555-1569, 1994.

BO, G. A.; CUTAIA, L.; PERES, L. C.; PINCINATO, D.; MARANA, D.; BARUSELLI, P. S. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. **Society for the Study of Reproduction and Fertility**, v. 64, p. 223-236, 2007.

BO, G. A.; CUTAIA, L.; TRIBULO, R. Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos para carne: algunas experiencias realizadas en Argentina. **Taurus**, v. 15, n. 15, p. 17-32, 2002.

BO, G. A.; CUTAIA, L.; TRIBULO, R. Critérios em La eleccion de los programas de IATF em los rodeos para carne **Taurus**, 2002b.

CIARLINI, L. D. R. P.; CIARLINI, P. C.; FEITOSA, F. L. F. Quimiluminescência: princípio e aplicações. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 5, n. 2, p. 181-187, 2002.

CLIMENI, B. S. O.; PICCININ, A. A implantação de IATF (inseminação em tempo fixo) juntamente da IA (inseminação tradicional) como mecanismos alternativos o para manejo reprodutivo de bovinos. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, v. 10, 2008.

DANIEL, J. A.; THOMAS, M. G.; HALE, C. S.; SIMMONS, J. M.; KEISLER, D. H. Effect of cerebroventricular infusion of insulin and (or) glucose on hypothalamic expression of leptin receptor and pituitary secretion of LH in diet-restricted ewes. **Domest Anim Endocrinol**, v. 18, n. 2, p. 177-185, 2000.

DAY, M. L. Hormonal induction of estrous cycles in anestrus *Bos taurus* beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 487-494, 2004.

DISKIN, M. G.; AUSTIN, E. J.; ROCHE, J. F. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. **Domest Anim Endocrinol**, v. 23, n. 1-2, p. 211-228, 2002.

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1211-1239, 2001.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; KOT, K. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 1, p. 197-205, 2001.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, v. 52, n. 6, p. 1079-1093, 1999.

GONÇALVES, P. B. D. Anestro pós parto em vacas de corte. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2004, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. **Anais**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004. p. 105 - 116.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. Manole, 1995.

HARRISON, L. M.; RANDEL, R. D. Influence of Insulin and Energy-Intake on Ovulation Rate, Luteinizing-Hormone and Progesterone in Beef Heifers. **Journal of Animal Science**, v. 63, n. 4, p. 1228-1235, 1986.

KASTELIC, J. P.; GINTHER, O. J. Factors Affecting the Origin of the Ovulatory Follicle in Heifers with Induced Luteolysis. **Animal Reproduction Science**, v. 26, n. 1-2, p. 13-24, 1991.

KINDER, J. E.; KOJIMA, F. N.; BERGFELD, E. G.; WEHRMAN, M. E.; FIKE, K. E. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 6, p. 1424-1440, 1996.

LAMMOGLIA, M. A.; SHORT, R. E.; BELLOWS, S. E.; BELLOWS, R. A.; MACNEIL, M. D.; HAFS, H. D. Induced and synchronized estrus in cattle: Dose titration of estradiol benzoate in peripubertal and postpartum cows after treatment with an intravaginal progesterone-releasing insert and prostaglandin F-2 alpha. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 6, p. 1662-1670, 1998.

LEE, H.; PARK, C. J.; LEE, G. Measurement of progesterone in human serum by isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry and comparison with the commercial chemiluminescence immunoassay. **Anal Bioanal Chem**, v. 396, n. 5, p. 1713-1719, 2010.

LOPEZ, J. P. S. **Ovarian and hormonal events during synchronization of ovulation and timed appointment breeding of Bos indicus- influenced cattle using intravaginal progesterone, GnRH and prostaglandin F2alfa**. 2005. 96 f. Master of Science) - Texas A&M University 2005.

LUCY, M. C. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. **Reproduction**, v. 61, p. 415-427, 2002.

MACMILLAN, K. L.; BURKE, C. R. Effects of oestrous cycle control on reproductive efficiency. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1, p. 307-320, 1996.

MADUREIRA, E. H. Sincronização com Progestágenos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2004, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. **Anais**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004. p. 117-128.

MADUREIRA, E. H.; FERNANDES, R. H. R.; ROSSA, L. A. F. Anestro pós-parto em bovinos: a suplementação com óleos vegetais pode encurtá-los. In: II SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2006, Londrina. **Anais**. Londrina, 2006. p. 63-70.

MANN, G. E.; HARESIGN, W. Effect of oestradiol treatment during GnRH-induced ovulation on subsequent PGF(2 alpha) release and luteal life span in anoestrous ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 67, n. 3-4, p. 245-252, 2001.

MAPLETOFT, R. J.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Control of ovarian function for assisted reproductive technologies in cattle. **Animal Reproduction**, v. 6, n. 1, p. 114-124, 2009.

MAPLETOFT, R. J.; STEWARD, K. B.; ADAMS, G. P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reprod Nutr Dev**, v. 42, n. 6, p. 601-611, 2002.

MARTINEZ, M. F.; COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effects of estradiol and progesterone on plasma steroid and gonadotropin concentrations in CIDR-treated ovariectomized cows. **Theriogenology**, v. 59, p. 224, 2003.

MARTINEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; BO, G. A.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R. J. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 86, n. 1-2, p. 37-52, 2005.

MCCRACKEN, J. A.; CARLSON, J. C.; GLEW, M. E.; GODING, J. R.; BAIRD, D. T.; GREEN, K.; SAMUELSSON, B. Prostaglandin F<sub>2</sub> identified as a luteolytic hormone in sheep. **Nat New Biol**, v. 238, n. 83, p. 129-134, 1972.

MUCCIOLO, R. G.; BARBEIRO, J. C. Níveis de progesterona no plasma sanguíneo, durante o ciclo estral ea gestacao de vacas nelore (*Bos indicus*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 7, p. 11-21, 1983.

MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine Chorionic-Gonadotropin. **Endocrine Reviews**, v. 12, n. 1, p. 27-44, 1991.

MURRAY, A. J.; CAVALIERI, J.; D'OCCHIO, M. J.; WHYTE, T. R.; MACLELLAN, L. J.; FITZPATRICK, L. A. Treatment with progesterone and 17 beta-oestradiol to induce emergence of a newly-recruited dominant ovulatory follicle during oestrus synchronisation with long-term use of norgestomet in Brahman heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 50, n. 1-2, p. 11-26, 1998.

PETERS, A. R.; MARTINEZ, T. A.; COOK, A. J. A meta-analysis of studies of the effect of GnRH 11-14 days after insemination on pregnancy rates in cattle. **Theriogenology**, v. 54, n. 8, p. 1317-1326, 2000.

RATHBONE, M. J.; KINDER, J. E.; FIKE, K.; KOJIMA, F.; CLOPTON, D.; OGLE, C. R.; BUNT, C. R. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, n. 3, p. 277-320, 2001.

RICHARDSON, A. P.; KIM, J. B.; BARNARD, G. J.; COLLINS, W. P.; MCCAPRA, F. Chemi-Luminescence Immunoassay of Plasma Progesterone, with Progesterone Acridinium Ester Used as the Labeled Antigen. **Clinical Chemistry**, v. 31, n. 10, p. 1664-1668, 1985.

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

SCHOENEMANN, H. M.; HUMPHREY, W. D.; CROWDER, M. E.; NETT, T. M.; REEVES, J. J. Pituitary luteinizing hormone-releasing hormone receptors in ovariectomized cows after challenge with ovarian steroids. **Biology of Reproduction**, v. 32, n. 3, p. 574-583, 1985.

SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. Cadmmus Professional Communication, 2003. 32 p.

SIMPSON, R. B.; CHASE, C. C.; SPICER, L. J.; VERNON, R. K.; HAMMOND, A. C.; RAE, D. O. Effect of Exogenous Insulin on Plasma and Follicular Insulin-Like Growth-Factor-I, Insulin-Like Growth-Factor Binding-Protein Activity, Follicular Estradiol and Progesterone, and Follicular-Growth in Superovulated Angus and Brahman Cows. **J Reprod Fertil**, v. 102, n. 2, p. 483-492, 1994.

SIQUEIRA, L. C.; OLIVEIRA, J. F. C.; LOGUÉRCIO, R. S.; LÕF, H. K.; GONÇALVES, P. B. D. Sistemas de inseminação artificial em dois dias com observação de estro ou em tempo fixo para vacas de corte amamentando. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 411-415, 2008.

SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biology of Reproduction**, v. 39, n. 2, p. 308-317, 1988.

SMITH, M. J.; JENNES, L. Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. **Reproduction**, v. 122, n. 1, p. 1-10, 2001.

SPICER, L. J.; ECHTERNKAMP, S. E. The Ovarian Insulin and Insulin-Like Growth-Factor System with an Emphasis on Domestic-Animals. **Domest Anim Endocrinol**, v. 12, n. 3, p. 223-245, 1995.

STAGG, K.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M.; ROCHE, J. F. Follicular development in long-term anoestrous suckler beef cows fed two levels of energy postpartum. **Animal Reproduction Science**, v. 38, n. 1, p. 49-61, 1995.

THOMAS, V. M. **Beef cattle Production**. London: Wave Land Press, 1992. 348 p.

TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; AYRES, H.; ARAÚJO, R. L.; MAGALHÃES, D. M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Dinâmica folicular de vacas nelore (*Bos indicus*) tratadas com dispositivo intravaginal auricular de norgestomet associado ao cipionato de estradiol e submetidas a administração de GnRH 48 ou 54 horas após a retirada do dispositivo intravaginal. . **Acta Science Veterinariae**, v. 35, p. 1111, 2007.

WEHRMAN, M. E.; ROBERSON, M. S.; CUPP, A. S.; KOJIMA, F. N.; STUMPF, T. T.; WERTH, L. A.; WOLFE, M. W.; KITTOCK, R. J.; KINDER, J. E. Increasing Exogenous Progesterone during Synchronization of Estrus Decreases Endogenous 17-Beta-Estradiol and Increases Conception in Cows. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 2, p. 214-220, 1993.

WETTEMANN, R. P. Postpartum endocrine function of cattle, sheep and swine. **Journal of Animal Science**, v. 51, n. Supplement II, p. 2-15, 1980.

WILTBANK, J. N.; ROWDEN, W. W.; INGALLS, J. E. Effects of Various Forms and Levels of Estrogens Alone or in Combinations with Gonadotrophins on Estrous Cycle of Beef Heifers. **Journal of Animal Science**, v. 20, n. 2, p. 341, 1961.

YAVAS, Y.; WALTON, J. S. Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: A review. **Theriogenology**, v. 54, n. 1, p. 1-23, 2000.

## **CAPÍTULO 1: Variáveis morfológica e hormonais ovariana e sanguínea de vacas Nelore submetidas a diferentes protocolos de IATF**

### **RESUMO**

O objetivo desse estudo foi verificar os efeitos que diferentes protocolos de indução e sincronização do estro e da ovulação, associando ou não o eCG, BE, CE ou GnRH com progestágeno sobre o crescimento e diâmetro do folículo pré-ovulatório, e suas relações com a concentração no fluido do folículo pré-ovulatório de progesterona, LH, insulina, cortisol, e com a concentração sérica de progesterona, cortisol e insulina das vacas submetidas aos protocolos. Foram utilizadas 90 vacas da raça Nelore solteiras, com mais de nove meses pós-parto, divididas em 6 grupos, sendo 15 vacas por protocolo. Todos os protocolos consistiam na colocação e retirada de um dispositivo intravaginal de progesterona (DIP) (0,75 gramas de Progesterona) no primeiro e no oitavo dia respectivamente; aplicação de prostaglandina ( $PGF_2\alpha$ ) no oitavo dia; e exceto no protocolo 1, foi utilizado benzoato de estradiol (BE) no dia 1. As outras diferenças no delineamento dos protocolos foram: protocolo 1 – dia 1 e dia 8 (GnRH); protocolo 2 – Dia 6 ( $PGF_2\alpha$ ), dia 8 ( $PGF_2\alpha$  + cipionato de estradiol (CE)); protocolo 3 – dia 8 (eCG + CE); protocolo 4 – dia 8 (eCG + BE); protocolo 5 – dia 8 (eCG), dia 9 (BE); protocolo 6 – dia 9 (BE). No geral, 93,3 % (84/90) de vacas responderam ao protocolo de sincronização. Entretanto, foi observado que 28,9 % das vacas (26/90) não tiveram uma eficiente sincronização de uma nova onda folicular, constatado pelo número de vacas que não desenvolveram um folículo dominante (5/26), com as vacas que ovularam precocemente (15/26), e as vacas que tiveram um folículo dominante que estava em processo de regressão (6/26). Não houve diferença estatística no crescimento e diâmetro do folículo pré-ovulatório entre os protocolos. Não houve efeito entre os protocolos na concentração no fluido folicular de progesterona, LH, insulina, cortisol, assim como na concentração sérica de cortisol e insulina. Contudo, no protocolo 2, foram verificadas menores concentrações ( $P < 0,05$ ) de progesterona na retirada do DIP. Foram recuperados 27 ovócitos, que foram classificados de acordo com a qualidade em 1 (n=12), 2 (n=6), 3 (n=7) e 4 (n=2). A antecipação na aplicação de prostaglandina em dois dias da retirada do DIP resulta em menores concentrações de progesterona circulantes.

**Palavras chave:** fluido folicular; inseminação artificial; sincronização do estro;

## **ABSTRACT**

This study was aimed to investigate the effects that different protocols for induction and synchronization of estrus and ovulation, either use of eCG, BE, CE or GnRH associated with progestin could have on the follicle growth and pre-ovulatory follicle diameter. Furthermore the relationship with progesterone, LH, insulin, cortisol in the follicular fluid concentration and progesterone, cortisol, insulin serum concentrations of cows submitted to protocols. Ninety Nelore suckled cows were used divided into 6 groups, 15 cows per protocol. All of the protocols consisted in the placement and removal of an intravaginal progesterone device (IPD) (0.75g of progesterone) in the first and eighth day respectively; application of prostaglandin (PGF2  $\alpha$ ) on the eighth day, and except in protocol 1 was used estradiol benzoate (EB) on day 1. The other differences in the delineation of protocols were: Protocol 1 – day 1 and day 8 (GnRH); Protocol 2 – day 6 (PGF2 $\alpha$ ), day 8 (PGF2 $\alpha$  + estradiol cypionate (EC)); Protocol 3 – day 8 (eCG + EC); Protocol 4 – day 8 (eCG + EB); Protocol 5 – day 8 (eCG), day 9 (EB); Protocol 6 – day 9 (EB). Overall 93.3% (84/90) of cows responded to synchronization protocol. However, it was observed that 28.9% of cows (26/90) were not efficient synchronization of a new follicular wave, verified by the number of cows which have not developed a dominant follicle (5/26), cows with early ovulation (15/26) and cows that had a dominant follicle in regression process (6/26). There was no statistical difference in growth and diameter of the pre-ovulatory follicle between protocols. There was not effect between protocols of progesterone, LH, insulin, cortisol concentrations on follicular fluid, as well as in cortisol and insulin serum concentration. Although, in protocol 2, lower progesterone concentrations ( $P < 0.05$ ) were observed in the withdrawal of IPD. Twenty seven oocytes were recovered, which were classified according to quality: 1 (n=12), 2 (n=6), 3 (n=7) e 4 (n=2). The anticipation in the prostaglandin application two days to withdrawal IPD results in lower circulating progesterone concentrations.

**Keywords :** follicular fluid , artificial insemination , estrus synchronization; beef cows

## INTRODUÇÃO

Os programas mais comuns de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), utilizados em bovinos de corte, são baseados na utilização de hormônios como estradiol, o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH – Gonadotropin-Releasing Hormone), a prostaglandina  $F_2\alpha$  ( $PGF_2\alpha$ ), e incluem o uso de um dispositivo intravaginal de liberação lenta de progesterona. As taxas de concepção reportadas com utilização desses protocolos têm sido entre 40 e 50%, variando de 27,8 a 75% (BO et al., 2002; BO et al., 2007). Diferentes programas de IATF foram comparados recentemente em um grande estudo, em que as taxas de concepção foram de, aproximadamente, 55% em vacas no pós-parto (BUSCH et al., 2008).

Vários fatores como composição e consumo de energia da dieta, manejo de vacas secas, estresse térmico, produção de leite, incidência de doenças, bem-estar geral, entre outros, podem afetar a reprodução, de forma independente ou correlacionada, tanto a curto (dias) como a médio (meses) prazo (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2008). As mudanças endócrinas e metabólicas são acompanhadas por alteração na composição do fluido folicular, que podem comprometer a capacidade de desenvolvimento dos ovócitos, visto que estes são altamente sujeitos a qualquer distúrbio no seu microambiente (LEROY et al., 2008). Entretanto, os fatores mais importantes que interferem nas taxas de prenhez são o escore de condição corporal (ECC) e a ciclicidade das vacas (BO et al., 2002; BO et al., 2007).

Os protocolos de IATF têm a função primordial de induzir e sincronizar a emergência e o crescimento de uma nova onda folicular, acompanhada da ovulação de um folículo dominante, em um curto espaço de tempo, que permita a inseminação de todos os animais em horários pré-determinados (BARUSELLI et al., 2006; SA FILHO et al., 2010). Entretanto, podem existir falhas nessas e em outras etapas, que, consequentemente, poderão afetar a taxa de prenhez.

Assim, o objetivo desse estudo foi verificar os efeitos que diferentes protocolos de indução e sincronização do estro e da ovulação, com utilização de um progestágeno associado ou não a eCG, BE, CE ou GnRH, sobre o crescimento e diâmetro do folículo pré-ovulatório, e suas relações com a concentração no fluido folicular de progesterona, LH, insulina, cortisol, e com a concentração sérica de progesterona, cortisol e insulina das vacas submetidas aos protocolos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa.

O experimento foi conduzido no município de Carlos Chagas, estado de Minas Gerais, Brasil, durante a estação de monta, no período de 15 de novembro a 6 de dezembro de 2013. Foram utilizadas 90 vacas da raça Nelore, multíparas não lactantes com mais de nove meses pós-parto, escore de condição corporal (ECC) entre 2,5 e 4,0 na escala de 1 a 5 (DIAS, 1991), criadas em condições de manejo extensivo, em pastagens de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizanta*, suplementadas com sal mineral e água *ad libitum*, distribuídas em seis grupos de 15 animais por protocolo de IATF.

### Protocolos

- **Protocolo 1:**

Dia 1 - Colocação de dispositivo intravaginal com 0,75 g de progestágeno (Prociclar<sup>®</sup>, Hertape Calier) e aplicação por via intramuscular, de 0,008 mg de acetato de buserelina (GnRH; Sincroforte<sup>®</sup>; Ouro Fino);

Dia 8 - Retirada do Prociclar<sup>®</sup> (Hertape Calier) e aplicação de 10 mg de Dinoprost Trometamina (Lutalyse<sup>®</sup>; Zoetis) por via intramuscular;

Dia 9 - Aplicação de 0,008 mg de acetato de buserelina (GnRH; Sincroforte<sup>®</sup>; Ouro Fino) por via intramuscular;

- **Protocolo 2:**

Dia 1 - Colocação do Prociclar<sup>®</sup> (Hertape Calier) e aplicação por via intramuscular de 2 mg de benzoato de estradiol (Estrogin<sup>®</sup>; Farmavet);

Dia 6 - Aplicação de 10 mg de Dinoprost Trometamina (Lutalyse<sup>®</sup>, Zoetis) por via intramuscular;

Dia 8 - Retirada do Prociclar<sup>®</sup> (Hertape Calier) e aplicação de 10 mg de Dinoprost Trometamina (Lutalyse<sup>®</sup>, Zoetis) e 1 mg de cipionato de estradiol (ECP<sup>®</sup>; Zoetis) por via intramuscular;

- **Protocolo 3:**

Dia 1 - Colocação do Prociclar<sup>®</sup> (Hertape Calier) e aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol (Estrogin<sup>®</sup>; Farmavet) por via intramuscular;

Dia 8 - Retirada do Prociclar<sup>®</sup> (Hertape Calier) e aplicação de 10 mg de Dinoprost Trometamina (Lutalyse<sup>®</sup>, Zoetis) por via intramuscular, 1 mg de cipionato de estradiol (ECP<sup>®</sup>; Zoetis) e 400 UI de PMSG (eCG; Sincro eCG<sup>®</sup>; Ouro Fino) por via intramuscular;

- **Protocolo 4:**

Dia 1 - Colocação do Prociclar<sup>®</sup> (Hertape Calier) e aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol (Estrogin<sup>®</sup>; Farmavet) por via intramuscular;

Dia 8 - Retirada do Prociclar<sup>®</sup> (Hertape Calier) e aplicação de 10 mg de Dinoprost Trometamina (Lutalyse<sup>®</sup>, Zoetis), 1 mg de benzoato de estradiol (Estrogin<sup>®</sup>; Farmavet) e 400 UI de PMSG (eCG; Sincro eCG<sup>®</sup>; Ouro Fino) por via intramuscular;

- **Protocolo 5:**

Dia 1 - Colocação do Prociclar<sup>®</sup> (Hertape Calier) e aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol (Estrogin<sup>®</sup>; Farmavet) por via intramuscular;

Dia 8 - Retirada do implante de progesterona e aplicação de 10 mg de Dinoprost Trometamina (Lutalyse<sup>®</sup>, Zoetis) e 400 UI de PMSG (eCG; Sincro eCG<sup>®</sup>; Ouro Fino) por via intramuscular;

Dia 9 – Aplicação de 1 mg de benzoato de estradiol (Estrogin<sup>®</sup>; Farmavet) por via intramuscular;

- **Protocolo 6:**

Dia 1 - Colocação do Prociclar<sup>®</sup> (Hertape Calier) e aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol (Estrogin<sup>®</sup>; Farmavet) por via intramuscular;

Dia 8 - Retirada do implante de progesterona e aplicação de 10 mg de Dinoprost Trometamina (Lutalyse<sup>®</sup>, Zoetis);

Dia 9 – Aplicação de 1 mg de benzoato de estradiol (Estrogin<sup>®</sup>; Farmavet) por via intramuscular.

### **Avaliação reprodutiva**

No primeiro dia do protocolo, sendo o dia da colocação do DIP, foi realizada uma avaliação reprodutiva, com auxílio de um ultrassom (Chison D600 VET), acoplado a uma probe linear transretal de sete mHz. Os animais foram avaliados quanto à presença

ou ausência de corpo lúteo (CL) e, no caso da ausência, foi mensurado o maior folículo de cada ovário. Apenas vacas com ausência de patologias uterinas e ovarianas foram utilizadas para este estudo.

### **Mensuração do crescimento folicular e diâmetro do folículo pré-ovulatório**

O diâmetro médio dos folículos foi mensurado no dia da retirada do DIP com auxílio de um ultrassom da marca Chison D600 VET, com uma probe linear transretal de sete mHz, e no dia da aspiração folicular com um ultrassom da marca DPS Mindray DP-2200VET, com uma probe microconvexa de oito MHz, acoplada a uma guia de aspiração folicular. Para estipular o crescimento do folículo dominante, foram mensurados e mapeados os dois ou três maiores folículos de cada ovário no dia da retirada do DIP, e mensurado o maior folículo, ou os dois maiores folículos, no dia da aspiração folicular. A partir da diferença de tamanho pelo número de horas entre as duas avaliações, foi obtido um valor, que foi multiplicado por 24 e, assim, foi calculado o crescimento médio do folículo dominante por dia.

Foram consideradas como vacas que responderam ao protocolo quando havia a presença de folículo com diâmetro maior que oito mm ou que já haviam ovulado no dia da aspiração folicular.

Foi considerada como ovulação precoce as vacas que ovularam antes do momento da aspiração folicular, que seria o momento da IA. Os folículos dominantes foram considerados como em fase de regressão quando apresentaram uma redução maior que 1,5 mm no tamanho, comparando as mensurações realizadas no dia da retirada do DIP e no dia da aspiração folicular.

### **Aspiração do folículo pré-ovulatório**

Entre 48 e 60 horas após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona (DIP), foi realizada a aspiração do folículo dominante. Para realização da aspiração folicular, as vacas foram contidas em troncos individuais. Foi feita a tricotomia da região sacro-coccígea e higienização com álcool iodado, seguidas por anestesia peridural intercoccígea com 3 mL de lidocaína a 2%. Para a aspiração, foi utilizado aparelho de ultrassom (DPS Mindray DP-2200VET), equipado com transdutor microconvexo, ajustado para oito mHz de frequência, e acoplado a uma guia de sonda intravaginal. Foram utilizadas agulhas 40x9 (20 G) e bomba de vácuo com pressão de vácuo de 80 mmHg, correspondente a um fluxo de 14 mL de água/min.

Imediatamente após as aspirações, o fluido recuperado foi rastreado, com auxílio de um microscópio estereoscópico, para identificação, isolamento e classificação morfológica dos ovócitos, que foi realizada de acordo com Loss et al., (1989). Posteriormente, o fluido folicular foi centrifugado por seis minutos a 1509 G para que as células foliculares fossem peletizadas e separadas. Após a centrifugação, o sobrenadante foi aspirado, acondicionado em tubo plástico de 1,5 mL (ependorph®) e estocado a -20 °C para posterior dosagem de progesterona, LH, insulina e cortisol.

### **Coleta de sangue e dosagem hormonal**

Foram coletadas amostras de sangue, por punção da veia coccígena, em tubos sem anti-coagulante, para dosagem da concentração sérica de progesterona, nos dias da colocação e retirada do DIP, e para dosagem de progesterona, insulina e cortisol no dia da aspiração folicular. No protocolo 2, ainda foi obtida mais uma amostra de sangue, no dia da primeira aplicação de PGF<sub>2</sub>α, para dosagem de progesterona.

Após as coletas, os tubos foram deixados à temperatura ambiente até a formação do coágulo. Posteriormente, foram centrifugados a 1509 G por 15 minutos. Em seguida, o soro foi removido e armazenado em tubo plástico de 1,5 mL (ependorph®) a - 20 °C, até o momento das análises.

A dosagem de progesterona, LH, insulina, e cortisol foi realizada pelo método quimioluminescente, técnica imunoenzimática com kits Access® (Beckman Coulter) e os procedimentos realizados de acordo com as recomendações do fabricante.

### **Análises Estatísticas**

Para análise dos dados, foi utilizado o programa SAEG (SAEG-UFV, 2007).

Foi realizada estatística descritiva (média e desvio padrão) para todas as variáveis.

Para variáveis qualitativas (taxa de sincronização, qualidade ovocitária), os dados foram arranjados em tabela de contingência e analisados pelo teste de qui-quadrado, com 5% de probabilidade de erro.

Para as variáveis quantitativas (estudo hormonal, diâmetro folicular) foram efetuados o teste de Lilliefors e Cochran e Bartlett, para verificar a normalidade da distribuição dos dados e a homogeneidade das variâncias, respectivamente. Posteriormente, foi realizada análise de variância para verificar os efeitos dos tratamentos e, com o valor de F significativo, foi feita comparação de média pelo teste de Tukey, com 5 % de probabilidade de erro. Quando não atenderam as premissas da

ANOVA, os dados foram analisados por análise não paramétrica e as médias comparadas pelo teste de Kruskal Wallis. Correlações Simples de Person foram realizadas entre todas as características quantitativas e a Correlação de Spearman foi realizada para as características quantitativas com as características categóricas.

## **RESULTADOS**

No dia da inserção do DIP, foi verificada a presença de corpo lúteo em 82% (74/90) dos animais, sendo 73% (11/15) dos animais nos protocolos 1 e 2, 87% (13/15) dos animais nos protocolos 3 e 5, 80% (12/15) dos animais no protocolo 4 e 93% (14/15) dos animais no protocolo 6.

No geral, desconsiderando os efeitos dos protocolos, foi observado que 28,9 % das vacas (26/90) não tiveram uma eficiente sincronização de uma nova onda folicular. Este resultado é a soma das vacas que não desenvolveram um folículo dominante (5/26), com as vacas que ovularam precocemente (15/26), e as vacas que tiveram um folículo dominante que estava em processo de regressão (6/26) e que por isso poderiam não resultar em ovulação.

Foi verificado que todas as ovulações precoces foram de folículos que tinham diâmetro maior que 10 mm no dia da retirada do DIP, exceto uma vaca no protocolo 3, que ovulou precocemente um folículo de 8,7 mm de diâmetro. Portanto, para estudar as ovulações precoces, foi considerado o número de vacas que tinham ovulado precocemente, em relação ao número total de vacas que tinham folículo com diâmetro maior que 10 mm no dia da retirada do DIP. Assim, foram observadas as seguintes proporções 4/7, 2/11, 3/9, 3/7, 1/7 e 1/9 nos protocolos 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente. Entretanto, também no dia da retirada do DIP, foi avaliada a frequência de folículos com tamanho superior a 10 mm que não ovularam precocemente ou que não regrediram e continuaram o seu crescimento até o momento da aspiração, que foi de sete vacas nos protocolos 2, 3 e 6, quatro vacas no protocolo 5 e três vacas nos protocolos 1 e 4.

Não houve a indução do crescimento de nenhum folículo maior que oito mm no momento da retirada do DIP ou no momento da aspiração folicular, em duas vacas do protocolo 1 e, nos protocolos 2, 3 e 4, apenas em uma vaca de cada protocolo. Nesse caso, foi considerada como falha do protocolo, por não induzir a formação de um folículo dominante.

Os resultados das dosagens das médias da concentração sérica de progesterona estão sumarizados na Tabela 1. Os resultados das dosagens de cortisol, insulina, LH e

progesterona no fluido folicular estão na Tabela 2. E na Tabela 3, constam os resultados referentes aos dados de número e crescimento de folículos, tamanho e classificação dos ovócitos.

**Tabela 1:** Concentração média\* de progesterona sérica (ng/mL) de vacas da raça Nelore, multíparas e solteiras, criadas extensivamente e submetidas a diferentes protocolos de IATF.

Manejo	Geral	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4	Protocolo 5	Protocolo 6
Colocação do dispositivo de P4	24,0±15,3	26,0±16,4ab	27,3±13,8ab	24,3±15,9ab	34,0±11,9a	21,2±16,1bc	12,8±10,9c
Antecipação da aplicação de prostaglandina	-----	-----	12,7±13,6	-----	-----	-----	-----
Retirada do dispositivo de P4	11,5±12,0	17,2±11,7a	4,4±3,6b	11,0±13,8a	9,5±10,7a	11,1±12,4a	16,2±13,6a
Aspiração folicular	4,8±8,2	5,3±9,9a	4,3±4,3a	7,6±10,9a	1,8±1,8a	2,3±2,6a	5,4±10,0a

\***P<0,05; Protocolo 1:** D1= inserir DIP e aplicar GnRH; D8= retirar DIP e aplicar PGF<sub>2</sub>α; D9= aplicar GnRH; **Protocolo 2:** D1= inserir DIP e aplicar BE; D6= aplicar PGF<sub>2</sub>α; D8= retirar DIP, aplicar CE e PGF<sub>2</sub>α; **Protocolo 3:** D1= inserir DIP e aplicar BE; D8= retirar DIP, aplicar CE, eCG e PGF<sub>2</sub>α; **Protocolo 4:** D1= inserir DIP e aplicar BE; D8= retirar DIP e aplicar BE, eCG e PGF<sub>2</sub>α; **Protocolo 5:** D1= inserir DIP e aplicar BE; D8= retirar DIP, aplicar eCG e PGF<sub>2</sub>α; D9= aplicar BE; **Protocolo 6:** D1= inserir DIP e aplicar BE; D8= retirar DIP e aplicar PGF<sub>2</sub>α; D9= aplicar BE. Em todos os protocolos a aspiração folicular foi realizada entre 48 a 60 horas após a retirada do DIP.

**Tabela 2:** Concentrações médias\* de cortisol, insulina, LH e progesterona do líquido folicular de vacas da raça Nelore, multíparas e solteiras, criadas extensivamente e submetidas a diferentes protocolos de IATF.

Fluido folicular	Geral	Protocolos					
		1	2	3	4	5	6
Progesterona	39,2±4,9	40±0,0	40±0,0	40±0,0	40±0,0	37,4±9,8	39,3±2,5
LH	1,3±3,5	1,2±0,8	3,5±7,8	1,0±2,5	0,5±0,7	1,2±2,3	0,6±1,1
Insulina	0,5±0,6	0,3±0,3	0,4±0,3	0,5±0,7	0,4±0,3	0,6±1,0	0,5±0,6
Cortisol	61,6±55,0	42,8±19,4	110,9±103,5	60,5±36,2	34,5±17,9	51,9±29,0	51,8±33,8

\***P>0,05; Protocolo 1:** D1= inserir DIP e aplicar GnRH; D8= retirar DIP e aplicar PGF<sub>2</sub>α; D9= aplicar GnRH; **Protocolo 2:** D1= inserir DIP e aplicar BE; D6= aplicar PGF<sub>2</sub>α; D8= retirar DIP, aplicar CE e PGF<sub>2</sub>α; **Protocolo 3:** D1= inserir DIP e aplicar BE; D8= retirar DIP, aplicar CE, eCG e PGF<sub>2</sub>α; **Protocolo 4:** D1= inserir DIP e aplicar BE; D8= retirar DIP e aplicar BE, eCG e PGF<sub>2</sub>α; **Protocolo 5:** D1= inserir DIP e aplicar BE; D8= retirar DIP, aplicar eCG e PGF<sub>2</sub>α; D9= aplicar BE; **Protocolo 6:** D1= inserir DIP e aplicar BE; D8= retirar DIP e aplicar PGF<sub>2</sub>α; D9= aplicar BE. Em todos os protocolos a aspiração folicular foi realizada entre 48 a 60 horas após a retirada do DIP.

**Tabela 3:** Dados referentes ao número e crescimento de folículos\*, tamanho e classificação dos ovócitos de vacas da raça Nelore, multíparas e solteiras, criadas extensivamente e submetidas a diferentes protocolos de IATF.

	Geral	Protocolos					
		1	2	3	4	5	6
Número de folículos							
Dia 0	9,7±7,6	10,1±4,6B	13,4±9,6B	6,4±4,3B	10,1±11,7B	10,3±9,1B	8,3±5,0B
Dia 8	26,1±14,9	18,5±14,1A	30,3±13,0A	25,1±16,2A	24,7±12,3A	32,6±14,8A	25,3±16,6A
Diferença do número de folículos entre o dia 0 e o dia 8	16,4	8,4	16,9	18,7	14,6	22,3	17,0
Número de vacas que responderam ao protocolo de sincronização	84/90 (93,3 %)	14/15 (93,3 %)	14/15 (93,3 %)	14/15 (93,3 %)	12/15 (80,0%)	15/15 (100,0%)	15/15 (100,0%)
Frequência de vacas com folículos em regressão, somado às que não tiveram folículo dominante, e às que tiveram ovulação precoce	26/90	6/15	4/15	5/15	6/15	3/15	2/15
Crescimento do folículo dominante (mm/dia)	1,1±0,9	0,46±0,4	1,0±0,8	1,0±0,7	1,0±0,9	1,8±1,2	1,0±0,8
Diâmetro médio do maior folículo no dia da retirada do DIP	11,1±3,1	10,8±3,2	11,1±3,3	11,6±3,8	11,1±3	11,0±3,2	11,1±2,6
Diâmetro médio do folículo pré ovulatório (mm)	11,5±3,5	10,1±2,6	12,6±2,22	12,3±2,6	11,2±3	12,4±2,8	12,2±2,8
Frequência de vacas com folículos de diâmetro > 10 mm na retirada do implante de P4		8/15	10/15	10/15	7/15	7/15	9/15
Tamanho do Ovócito (mm)	0,7±0,2	0,7±0,1	0,7±1,4	0,7±1,9	0,7±0,5	0,6±0,2	0,7±0,2
Classificação do ovócito							
1	12/27	2/2	2/4	1/5	1/4	2/3	4/9
2	6/27	0/2	2/4	1/5	1/4	0/3	2/9
3	7/27	0/2	0/4	3/5	1/4	1/3	2/9
4	2/27	0/2	0/4	0/5	1/4	0/3	1/9

\***P<0,05; Protocolo 1:** D1= inserir DIP e aplicar GnRH; D8= retirar DIP e aplicar PGF<sub>2</sub>α; D9= aplicar GnRH; **Protocolo 2:** D1= inserir DIP e aplicar BE; D6= aplicar PGF<sub>2</sub>α; D8= retirar DIP, aplicar CE e PGF<sub>2</sub>α; **Protocolo 3:** D1= inserir DIP e aplicar BE; D8= retirar DIP, aplicar CE, eCG e PGF<sub>2</sub>α; **Protocolo 4:** D1= inserir DIP e aplicar BE; D8= retirar DIP e aplicar BE, eCG e PGF<sub>2</sub>α; **Protocolo 5:** D1= inserir DIP e aplicar BE; D8= retirar DIP, aplicar eCG e PGF<sub>2</sub>α; D9= aplicar BE; **Protocolo 6:** D1= inserir DIP e aplicar BE; D8= retirar DIP e aplicar PGF<sub>2</sub>α; D9= aplicar BE. Em todos os protocolos a aspiração folicular foi realizada entre 48 a 60 horas após a retirada do DIP.

## DISCUSSÃO

Na avaliação geral, 93,3% (84/90) de vacas responderam ao protocolo de sincronização. Esse resultado é igual ao reportado por Sales et al. (2012) (93,3 %) e similar aos resultados de sincronização obtidos em outros estudos, 93,8% (BO et al., 1995) e 95,3% (MARTINEZ et al., 2005). Portanto, em condições normais, protocolos baseados no uso de progesterona e estradiol são eficientes em sincronizar uma nova onda de crescimento folicular. No presente estudo, verificou-se que não houve diferença no número de vacas que responderam ao protocolo, quando foi utilizada a associação de progesterona e GnRH no início do protocolo ( $P>0,05$ ), porém, o uso do estradiol pode ser vantajoso por ser um hormônio de menor custo em relação ao GnRH.

Souza et al. (2009) estudaram a sincronização da emergência de uma nova onda folicular em protocolos de IATF, e observaram que 84,4% (38/45) das vacas tiveram uma eficiente emergência da onda folicular entre um a cinco dias após o tratamento com progesterona e BE. Esses autores detectaram que as principais causas de falhas foram a não emergência de uma nova onda folicular ( $n=2$ ), falta de regressão do folículo dominante ( $n=3$ ) e a emergência tardia (mais que cinco dias após aplicação de progesterona e BE) da nova onda folicular ( $n=2$ ). No presente estudo, verificou-se que houve aumento ( $P<0,05$ ) do número de folículos, entre o dia da colocação do DIP ( $9,7\pm 7,6$ ), e o dia da retirada do DIP ( $26,1\pm 14,9$ ), sendo semelhantes aos valores obtidos por Alvarez et al., (2000) que avaliaram o número de folículos após a emergência da onda folicular, em vacas das raças Brahman ( $39\pm 4$ ), Senepol ( $33\pm 4$ ) e em mestiças Angus ( $21\pm 4$ ).

Apesar da alta taxa de vacas que responderam aos protocolos de IATF, a soma das vacas que não responderam 6/90 (6,7 %), com as vacas que tiveram ovulação precoce 15/90 (16,7%) ou regressão do folículo dominante no final do protocolo 6/90 (6,7 %), juntas, foram responsáveis por 28,9 % (26/90) das falhas dos protocolos utilizados nesse estudo. O primeiro passo a ser avaliado é que, no presente estudo, foram utilizados diferentes indutores de ovulação, em diferentes momentos.

No protocolo 1, foi utilizado o GnRH e, nos protocolos 5 e 6, o benzoato de estradiol (BE), todos aplicados 24 horas após a retirada do DIP. Nos protocolos 2 e 3, foi utilizado o cipionato de estradiol (CE) e, no protocolo 4, foi utilizado o BE, todos aplicados no momento da retirada do DIP. Duas importantes diferenças da utilização desses hormônios

indutores de ovulação relacionam-se à taxa e ao intervalo de ovulações. Entretanto, neste estudo, foi possível mensurar somente a taxa de ovulação precoce, pois, no momento em que seria realizada a inseminação artificial (IA), todos os folículos dominantes foram aspirados para estudos do fluido folicular e qualidade ovocitária.

Foi verificada maior proporção de ovulação precoce nas vacas dos protocolos 1 (4/8) e 4 (3/7), comparados aos demais protocolos. Avaliando os efeitos dos diferentes hormônios utilizados nos protocolos desse estudo, foi verificado que a utilização do GnRH como indutor de ovulação, administrado 24 horas após a retirada do DIP (protocolo 1), resultou na ovulação precoce em quatro de oito vacas que estavam com folículo maior que 10 mm no dia da retirada do DIP. Isso pode acontecer porque a administração de GnRH induz a ovulação ou regressão, dependendo do estágio do desenvolvimento folicular (STEVENSON et al., 1993; TWAGIRAMUNGU et al., 1994; TWAGIRAMUNGU et al., 1995). Além disso, o momento em que esse hormônio é aplicado durante a execução do protocolo de IATF também é importante, porque conforme observado no estudo de Dias et al. (2010), a concentração de LH é maior uma e duas horas, comparada às concentrações observadas nos tempos 0, três e quatro horas após a aplicação de GnRH, indicando rápida ação desse hormônio, logo após sua administração. Portanto, o momento em que o GnRH é aplicado está relacionado ao momento da ovulação.

Em geral, o intervalo do pico de LH à ovulação tem sido de 22 a 26 horas (MIKESKA; WILLIAMS, 1988; DUCHENS et al., 1994). No entanto, a ovulação depende, também, da aquisição de receptores de LH no folículo dominante (XU et al., 1995), que ocorre quando os folículos dominantes alcançam o diâmetro de, aproximadamente, 8,5 mm (GINTHER et al., 2001). De acordo com Gimenes (2008), a capacidade ovulatória do folículo, em um protocolo hormonal de IATF, depende do tamanho folicular quando o indutor da ovulação é aplicado, sendo essa uma das causas da grande variação da resposta aos protocolos hormonais. Em vacas da espécie *Bos taurus indicus*, os folículos adquirem capacidade de ovular quando atingem o diâmetro de, aproximadamente, 10 mm (GIMENES et al., 2008). Silcox et al. (1993) reportaram que o GnRH induziu a ovulação em 100% de folículos em crescimento com tamanho maior que 10 mm.

Quando o GnRH é administrado 24 horas após a remoção do DIP, pode ocorrer maior taxa de ovulação precoce. Por isso, tradicionalmente, o GnRH é administrado 48 horas após

a indução da luteólise e a retirada do DIP, com a IA 16 horas após a aplicação do GnRH. Outros estudos têm indicado que a aplicação do GnRH pode ser realizada no momento da IA, resultando em taxas de fertilidade aceitáveis (GEARY et al., 2001). Todavia, no protocolo 1 do presente estudo, foi utilizado o GnRH 24 horas após a retirada do DIP, como indutor de ovulação, porque esse procedimento tem sido recomendado com o objetivo de melhorar a sincronia da ovulação e garantir a existência de um folículo sensível a LH (BO et al., 2006; BORGES et al., 2008).

Portanto, para um melhor aproveitamento da ação do GnRH, a recomendação do momento mais adequado para a sua aplicação no final de um protocolo de IATF deve estar relacionada com o tamanho do folículo no momento em que for administrado esse hormônio. Para vacas da raça Nelore, que tiverem folículos maiores que 10 mm de diâmetro no dia da retirada do DIP, o GnRH pode ser aplicado após 48 horas, e quando os folículos forem menores que 10 mm de diâmetro no dia da retirada do DIP, o GnRH pode ser aplicado após 24 horas. No entanto, podem ocorrer variações em função de outros fatores que também podem afetar a reprodução e que podem interferir na recomendação do melhor momento da aplicação do GnRH, como por exemplo, em novilhas *Bos taurus indicus*, nos quais os folículos dominantes adquirem capacidade ovulatória quando alcançam o tamanho entre 7,0 e 8,4 mm (média de 7,6 mm) (GIMENES et al., 2008).

Em outros estudos com protocolos de IATF, baseados no uso de GnRH sem associação com progesterona, utilizados em bovinos de corte, tem-se observado resultados inconsistentes, principalmente por falhas na indução da emergência de uma nova onda folicular após a aplicação da primeira dose de GnRH, nos protocolos Ovsynch (GEARY et al., 1998; MARTINEZ et al., 1999; BARUSELLI et al., 2000; BO et al., 2003; COLAZO et al., 2009). Essa situação acontece, principalmente, em vacas em anestro, mas, com os resultados do presente estudo, com vacas da raça Nelore cíclicas, no protocolo 1, em que foi utilizado o GnRH associado à progesterona, no início do protocolo, apesar de que duas vacas não tiveram folículo dominante, a maior causa do insucesso na sincronização do estro foi a ovulação precoce do folículo dominante. Contudo, conforme abordado anteriormente, a causa da ovulação precoce nesse protocolo não está associada à utilização de GnRH no início do protocolo.

Assim como o GnRH, o BE é outro hormônio que pode ser aplicado em diferentes momentos, quando for utilizado como indutor de ovulação, em protocolos de IATF. O BE normalmente é aplicado no momento da retirada do DIP (BE0) ou 24 horas após a retirada (BE24). O resultado de maior proporção de ovulação precoce, também observado no protocolo 4, pode ter ocorrido devido à aplicação do BE0. Isso acontece porque os picos de LH (SALES et al., 2012) e a ovulação (HANLON et al., 1997) ocorrem aproximadamente 19,6 e 40 horas, respectivamente, após a aplicação do BE em vacas *Bos taurus indicus*. Este fato também explica a menor proporção de ovulações precoces nos protocolos 5 (1/7) e 6 (1/9), em que foi utilizado BE24. Além disso, Cutiaia (2001) observou maior variação no intervalo das ovulações em protocolos que utilizaram BE0, comparados a protocolos que utilizaram BE24, em vacas de corte que estavam ciclando.

No presente estudo, os protocolos 4 e 5 diferiram apenas pela aplicação de BE0 e BE24, respectivamente. Os resultados da média do diâmetro dos folículos pré-ovulatórios foram de 11,2 e 12,4 mm respectivamente, nos protocolos 4 e 5. Entretanto, não houve diferença nesses valores, mas houve tendência dos diâmetros dos folículos pré-ovulatórios se mostrarem maiores com a aplicação de BE24 (protocolos 4 e 5) ou CE (protocolos 2 e 3) ( $P = 0,09$ ). Este comportamento também foi observado por Ross et al. (2004), com maior diâmetro do folículo ovulatório com a aplicação de BE24 ( $10,6 \pm 0,9$  mm) comparada a aplicação de BE0 ( $8,4 \pm 0,4$  mm), em novilhas da raça Angus em anestro ( $P=0,09$ ), e não observaram diferença na taxa de prenhez 51,4% e 52,9%, respectivamente. Em outro estudo, Ayres et al. (2008) observaram que a administração de BE0 resultou em folículos pré-ovulatórios de menor diâmetro e menor taxa de prenhez, em vacas da raça Nelore inseminadas 54 horas após a remoção do DIP.

No presente estudo, duas vacas apresentaram regressão do folículo dominante e uma vaca não apresentou folículo dominante no dia da aspiração folicular. Quando o BE é administrado no momento da remoção do progestágeno, é possível que as concentrações de progestágeno ainda estejam elevadas e, na presença de concentrações elevadas de progesterona, o BE pode induzir um declínio na concentração de gonadotrofinas e, consequentemente, pode causar atresia folicular (BO et al., 1995) e redução do crescimento e diâmetro do folículo dominante (SIROIS; FORTUNE, 1990; SAVIO et al., 1993).

Portanto, a aplicação do BE 24 horas após a retirada do DIP e entre 30 e 36 horas antes do momento da IA, pode ser o momento mais adequado para utilização desse hormônio como indutor de ovulação, em protocolos de IATF (PURSLEY et al., 1995), considerando que, em algumas situações, o BE24 apresenta melhores resultados comparado ao BE0. Adicionalmente, na literatura consultada, não houve nenhum estudo apresentando melhores resultados com uso do BE0 quanto ao diâmetro do folículo pré-ovulatório ou taxa de prenhez, apesar que o BE0 tem como vantagem, a redução de um manejo dos animais no curral durante a execução do protocolo, comparado ao BE24.

As proporções de ovulação precoce das vacas dos protocolos 2 (2/11) e 3 (3/9), que utilizaram o CE no momento da retirada do DIP, também foram menores, comparada àquelas dos protocolos 1 (4/7) e 4 (3/7). Diferentemente do BE, com a aplicação do CE no momento da retirada do DIP, os picos de LH e a ovulação ocorrem após 20,4 (MARTINEZ et al., 2007) e 54,6 horas (COLAZO et al., 2003), respectivamente, em novilhas mestiças. Isso se deve à diferença na farmacocinética desses dois ésteres de estradiol. O CE é formado pela esterificação do ácido propiônico ciclopentano, resultando em baixa solubilidade em água e, conseqüentemente, liberação mais lenta no local de administração e prolongada atividade biológica, comparada à do BE (VYNCKIER et al., 1990).

O conhecimento dessas diferenças é importante para determinar o momento mais adequado para administração desses dois ésteres do estradiol como indutores de ovulação, em protocolos de IATF, pois a utilização de um ou outro pode ser estratégica, dentro de um programa de IATF, e pode resultar em semelhante crescimento e diâmetro do folículo dominante, conforme verificado no presente estudo, além de semelhantes taxas de ovulação, 77,8% com BE e 82,8% com CE, e taxas de prenhez (MENEGETTI et al., 2009; SALES et al., 2012).

Embora não tenha ocorrido diferença nos resultados de diâmetro entre os folículos pré-ovulatórios, no dia da aspiração folicular, entre os diferentes protocolos de IATF do presente estudo (Tabela 3), pode haver significância quando forem observados folículos pré-ovulatórios de tamanho semelhante aos valores médios de 10,1 e 11,2 mm, observados nos protocolos 1 e 4, respectivamente. Isso porque, diferente do GnRH, nos protocolos que utilizam como indutor de ovulação o BE ou CE, é importante que os folículos dominantes alcancem maior diâmetro, pois, apesar dos folículos adquirirem capacidade de ovulação

com, aproximadamente, 10 mm de diâmetro (GIMENES et al., 2008), melhores taxas de ovulação são observadas com folículos de maior diâmetro (MENEGHETTI et al., 2009; SA FILHO, O. G. et al., 2009). Provavelmente, a ausência de diferença estatística foi devida ao reduzido número de animais utilizados e ao alto coeficiente de variação observado no presente estudo para essa variável.

Corroborando com essas informações, nos dados de um estudo com novilhas *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*, foi verificado que os animais com folículos pré-ovulatórios entre 7 e 10 mm tiveram taxa de concepção de 11,1%, aqueles com folículos de 10 a 13 mm alcançaram taxa de concepção de 63,8 %, enquanto naqueles com folículos de 13 a 19 mm, foi verificada taxa de concepção de 88,2% (BORSATO et al., 2004). Os resultados do estudo de SA Filho et al. (2010) também confirmam a informação de que existe relação entre o diâmetro do folículo pré-ovulatório e a probabilidade de concepção, em fêmeas zebuínas submetidas a protocolos de IATF.

Entretanto, em um estudo em que a ovulação foi induzida com GnRH, verificou-se que não houve efeito do diâmetro do folículo na concepção de vacas que exibiram comportamento de estro (MENEGHETTI et al., 2009). Isso indica que alcançar maior diâmetro do folículo pré-ovulatório é mais importante quando for utilizado BE ou CE como indutor de ovulação, pelo fato de serem observadas maiores taxas de ovulação nessa situação. No entanto, isso não é necessário quando for utilizado o GnRH na presença de folículos maiores que 10 mm de diâmetro, pois, normalmente, nessa situação, já são observadas altas taxas de ovulação (SILCOX et al., 1993).

Portanto, quando ocorrer uma alta frequência de folículos maiores que 10 mm de diâmetro, no momento da retirada do DIP, pode-se ter maiores taxas de ovulação precoce com a aplicação do GnRH 24 horas após a retirada do DIP. Assim, nessas circunstâncias, o GnRH deve ser aplicado 48 horas após a retirada do DIP ou no momento da IA, ou ainda, pode-se utilizar o CE ou BE24 como indutores de ovulação. Porém, quando no momento da retirada do DIP, for observada alta frequência de folículos com diâmetro menor que 10 mm, pode ser indicada a utilização de GnRH para melhorar a sincronia da ovulação e aumentar a possibilidade de existência de um folículo sensível a LH (BO et al., 2006; BORGES et al., 2008).

Outro aspecto a ser levado em consideração é que, mesmo em protocolos com GnRH, pode haver efeitos benéficos quando os folículos alcançam um maior diâmetro, porque alguns estudos reportaram que a ovulação de pequenos folículos tiveram correlação com menores concentrações séricas pré-ovulatórias de estradiol (VASCONCELOS et al., 2001; ATKINS et al., 2010). Adequada concentração pré-ovulatória de estradiol é necessária para melhorar a responsividade da hipófise aos estímulos do GnRH (NETT et al., 2002) e, assim, melhorar a secreção pré-ovulatória de LH (BARATTA et al., 2001), promover um ambiente da tuba uterina e do útero mais adequados (MANN; LAMMING, 2000), e para que ocorram mudanças fisiológicas nas células da granulosa (PARROTT; SKINNER, 1998), que podem ter influência na subsequente função luteal. A presença de folículos de maior diâmetro também é importante no momento da remoção do DIP, em protocolos de IATF, pois está associada com uma alta ocorrência de estro, além de uma alta capacidade ovulatória e uma elevada probabilidade de prenhez em vacas zebuínas (SA FILHO et al., 2011).

No presente estudo, o uso do eCG na retirada do protocolo, não foi eficaz em aumentar o diâmetro do folículo pré-ovulatório, quando comparado ao emprego do BE e CE, ou mesmo GnRH (tabela 3). Entretanto, em outros estudos, o mesmo mostrou-se vantajoso em relação aos demais hormônios empregados nos protocolos para induzir o crescimento e a ovulação. Estudos em bovinos de corte evidenciam que a utilização de eCG em protocolos de IATF à base de progesterona, melhoram o crescimento folicular, conseqüentemente resultam no aumento do diâmetro do folículo dominante e na responsividade à ovulação (PERES et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2009). Por isso, o eCG pode aumentar a porcentagem de vacas que ovulam ao final do protocolo (SARTORI et al., 2001; GIMENES et al., 2008), além de aumentar a circulação de P4 no diestro (VASCONCELOS et al., 2001; BARUSELLI et al., 2004) e a fertilidade após a IA (BARUSELLI et al., 2004; PERES et al., 2009). Isso ocorre pelo fato do eCG ter a capacidade de se ligar a receptores de FSH e LH (MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D., 1991) e, por isso, pode estimular as células da teca e da granulosa do folículo dominante (CAMERON; BATT, 1991; KURAN et al., 1996).

No presente estudo os protocolos 5 e 6 diferiram apenas pelo uso ou não do eCG no momento da retirada do DIP, e os resultados de crescimento e diâmetro do folículo

dominante não diferiram estatisticamente nos dois protocolos, corroborando com os dados de Souza et al. (2009). Entretanto, os valores médios de crescimento do folículo dominante, de 1,84 e 1,05 mm por dia, nos protocolos 5 e 6 respectivamente (Tabela 3), poderiam ter importância, pois seria equivalente a uma diferença maior que 1,5 mm no diâmetro do folículo pré-ovulatório no momento da IA. Porém, não houve diferença também nos valores médios do diâmetro do folículo dominante observados no dia da retirada do DIP e no dia da aspiração folicular nos protocolos 5 e 6, indicando que esses dois protocolos tiveram resultados absolutamente iguais.

Por outro lado, quando se faz a mesma analogia entre os protocolos 1 e 6, em que não foi utilizado o eCG, com os protocolos 3 e 5 em que foi utilizado o eCG, observou-se que, no protocolo 1, não apenas o valor de 0,45 mm na taxa de crescimento, mas, também a diferença do tamanho da média dos folículos dominantes, de 10,8 mm de diâmetro, no dia da retirada do DIP, e 10,1 mm de diâmetro, no dia da aspiração folicular, indicam que, fisiologicamente foi importante o menor valor médio de crescimento do folículo após a retirada do DIP, conforme discutido anteriormente. A redução na média do diâmetro do folículo dominante, observada no protocolo 1, deve-se ao fato de que ocorreu a ovulação precoce de alguns folículos observados no dia da retirada do DIP, que ovularam antes da aspiração folicular. Apesar disso, houve folículos menores que continuaram o crescimento até o momento da aspiração folicular. Entretanto, a diferença observada no protocolo 1 não está relacionada à utilização de eCG, porque os resultados do protocolo 6 não foram diferentes dos protocolos 3 e 5. Assim, essa diferença pode ser relacionada à utilização do GnRH, aplicado 24 horas após a retirada do DIP. Os resultados do protocolo 4, em que também foi utilizado eCG, foram excluídos dessa análise, pois as diferenças observadas foram relacionadas à utilização de BE0, e não à utilização de eCG, conforme discutido anteriormente.

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho e de outros estudos (SA FILHO et al., 2004; MARAÑA et al., 2006), os protocolos empregando eCG apresentam diferentes resultados, e seu uso em animais ciclando resultam em pouco ou nenhum benefício. Corroborando com Baruselli et al. (2003; 2004), a utilização desse hormônio é mais recomendada para animais que não estejam ciclando.

Com o mesmo objetivo da utilização do eCG, uma estratégia alternativa pode ser antecipar a aplicação de prostaglandina, para que o crescimento do folículo dominante aconteça em menores concentrações circulantes de P4 e que, assim, resulte em maior crescimento e diâmetro do folículo pré-ovulatório. Conforme verificado em outros estudos, maiores concentrações de P4 circulante, durante o tratamento com implante de P4, causam reduzida pulsatilidade de LH (IRELAND; ROCHE, 1982; ROBERSON et al., 1989), reduzido crescimento folicular (SIROIS; FORTUNE, 1990; SAVIO et al., 1993), e Kasimanickam et al. (2009) observaram uma diferença de, aproximadamente, 15% na taxa de prenhez em vacas que receberam duas doses de prostaglandina, sendo a primeira dose aplicada no momento da remoção do DIP (dia cinco do protocolo), e a segunda sete horas após. Por isso, no presente estudo, no protocolo 2, foram realizadas duas aplicações de prostaglandina, sendo a primeira dois dias antes e a segunda no momento da retirada do DIP, com o intuito de avaliar as diferenças em relação aos demais protocolos.

Foi observado que, após a aplicação da primeira dose de prostaglandina, no protocolo 2, houve uma menor concentração de progesterona ( $P < 0,05$ ) no dia da retirada do DIP em relação aos demais protocolos. Em outro estudo, foi observado que novilhas tratadas com prostaglandina dois dias antes da retirada do DIP tiveram menores concentrações circulantes de progesterona (MANTOVANI et al., 2004). Entretanto, ao contrário dos resultados do protocolo 2, no estudo de Mantovani et al. (2004) foi observado maior crescimento folicular, além de maior taxa de ovulação nos animais que tiveram a antecipação na aplicação de prostaglandina.

A redução da concentração de P4 circulante é importante para que se dê o início ao pró-estro (MENEGETTI et al., 2009). De acordo com Carvalho (2008), menores concentrações de P4, no pró-estro, estão relacionadas com maior desenvolvimento e diâmetro dos folículos, e vacas que, no pró-estro, apresentaram concentração sérica de P4 entre 1 e 2 ng/mL desenvolveram folículos com maior diâmetro, comparadas às vacas que tinham concentração de P4 de 5 a 6 ng/mL. Além disso, a concentração de progesterona sub-luteal está associada com aumento da frequência de pulsos de LH (IRELAND; ROCHE, 1982; ROBERSON et al., 1989). No presente estudo, não foi mensurada a frequência de pulsos de LH, mas, observou-se que não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os

protocolos na concentração de LH do fluido folicular dos folículos dominantes, aspirados no momento em que seria realizada a IA (Tabela 3).

Não houve diferença também ( $P>0,05$ ) entre todos os protocolos, nas concentrações séricas de progesterona no dia da aspiração folicular e nas concentrações de progesterona do fluido folicular. Apenas uma vaca, no protocolo 5, e uma, no protocolo 6, tiveram valores de progesterona no fluido folicular menor que 40 ng/mL, sendo 3,5 e 30,5 ng/mL, respectivamente. Altas concentrações de progesterona no fluido são esperadas, porque, após 18 horas do pico de LH, a progesterona constitui, aproximadamente, 90% do conteúdo de esteróides no fluido folicular (SILVA; KNIGHT, 2000). Assim, os valores de progesterona foram superiores aos observados em um estudo em que foram aspirados folículos pós-divergência, em vacas das raças Holandesa (21,9 ng/mL) e Gir (15,4 ng/mL), pré-sincronizadas com DIP e BE (ARASHIRO, 2012). No entanto, ressalta-se que os autores empregaram o método de radioimunoensaio para a determinação da concentração de progesterona, sendo diferente do método de quimioluminescência, empregado no presente estudo. Adequada concentração pré-ovulatória de progesterona é de grande importância, pois está envolvida em importantes processos fisiológicos, relacionados à expressão gênica dos ovócitos, além de que a progesterona e o estrógeno estão envolvidos no processo de interrupção e retomada da meiose no ovócito (MCEVOY et al., 1995).

Entretanto, os valores de algumas concentrações de progesterona, dosadas por quimioluminescência neste estudo, estão acima das concentrações observadas em outros estudos. Se forem consideradas as médias obtidas, haveria uma grande importância fisiológica relacionada ao crescimento, diâmetro do folículo ovulatório e, conseqüentemente, na taxa de ovulação desses animais se fossem inseminados.

Contudo, em outros estudos, foi verificado que a técnica de quimioluminescência é um método confiável para mensurar a concentração de progesterona plasmática em ovinos (LIMA, 2012) e em bovinos (ARASHIRO, 2012). Todavia, para que se tenha uma maior confiabilidade, recomenda-se que os resultados do presente estudo sejam confirmados por radioimunoensaio, que é a técnica utilizada em outros estudos. Assim, os valores absolutos, obtidos nas dosagens de progesterona, não foram discutidos no presente estudo. As discussões sobre progesterona foram feitas baseando-se na comparação entre maiores e menores resultados, e essas comparações estão em conformidade com resultados de outros

estudos e de acordo com a fisiologia normal. Por exemplo, esperava-se que, após a aplicação de prostaglandina, houvesse redução da concentração sanguínea de progesterona, e assim avaliando os resultados, de modo que os mesmos mostraram-se consistentes.

A qualidade do ovócito pode estar relacionada a vários fatores (FAIR, 2010), incluindo o emprego de protocolos de IATF (KINDER et al., 1996). Em geral, no presente estudo, verificou-se que, dos 27 ovócitos recuperados pela técnica de aspiração folicular (Tabela 3), sete foram classificados como ruins (classificação 3) e 2 como degenerados (classificação 4). Apenas um baixo percentual de ovócitos foi considerado normal (66,7%), sendo doze ovócitos de classificação 1 e seis de classificação 2.

No protocolo 2, em que foi realizada a antecipação da prostaglandina, observou-se que o crescimento do folículo dominante aconteceu em menor concentração de P4, comparada à dos demais protocolos, mas resultou em crescimento e diâmetro do folículo dominante iguais aos protocolos 3, 5 e 6, que tinham em comum a utilização do eCG. Entretanto, não foi recuperado nenhum ovócito ruim ou degenerado, no protocolo 2. Diferente dos resultados de classificação dos ovócitos recuperados nos protocolos 3, 4, 5 e 6, nos quais foram recuperados os sete ovócitos ruins, dois degenerados e apenas seis de classificação 1 e quatro de classificação 2.

No protocolo 1, assim como no protocolo 2, não foi recuperado nenhum ovócito classificado como ruim ou degenerado. O que diferencia o protocolo 1 dos demais protocolos é que não houve a utilização de estrógeno ou eCG. E, por isso, nesse protocolo, foi verificado que os folículos tinham diâmetro de 10,1 mm, em média no momento da aspiração. Os únicos dois ovócitos que foram recuperados, no grupo de vacas do protocolo 1, coincidentemente, foram aspirados de folículos com diâmetro de 10,5 mm e foram classificados como normais ou bons (classificação 1).

Perante essa análise, os resultados do protocolo 1 corroboram com a inexistência de correlação ( $P > 0,16$ ) entre o diâmetro do folículo pré-ovulatório e a classificação dos ovócitos, verificada a partir da análise dos 27 ovócitos recuperados. Entretanto, Filho et al. (2013) sugeriram que o sucesso dos protocolos de IATF depende do crescimento e desenvolvimento do folículo dominante, e complementaram que, quanto maior o diâmetro do folículo pré-ovulatório, maior a probabilidade desse folículo ovular, o que pode justificar a maior taxa de concepção em fêmeas com maior diâmetro folicular. Perry et al.,

(2005) e Perry et al., (2007) reportaram que a taxa de concepção foi menor em vacas de corte que ovularam pequenos folículos.

Todavia, conforme discutido anteriormente, alcançar maior diâmetro do folículo pré-ovulatório pode ser importante em protocolos de IATF que utilizam BE ou CE como indutores de ovulação, pois, nesse caso, normalmente são observadas maiores taxas de ovulação com folículos maiores. No estudo de Colazo et al. (2008), também não foi observada correlação do tamanho do folículo com a taxa de ovulação, em um protocolo de IATF em que foi utilizado GnRH como indutor de ovulação. Os mesmos autores ainda observaram que quase todos os animais com baixa concentração de P4 ovularam em resposta ao GnRH, e que menores taxas de ovulação foram correlacionadas com maiores concentrações de P4 circulantes, independente do tamanho do folículo. Outros autores também corroboram com os dados relatados acima. Silcox (1993) reportaram que após a aplicação de GnRH, ocorreu a ovulação em 100 % dos animais que tinham folículos em fase de crescimento com diâmetro maior que 10 mm. Mantovani et al. (2010) verificaram que, apesar do maior diâmetro do folículo dominante em novilhas com menor concentração de P4 no plasma, não houve diferença estatística entre as taxas de ovulação. E, ainda, Meneghetti et al. (2009) constataram que não houve efeito do diâmetro do folículo dominante na taxa de concepção. Assim, pode-se concluir que não é fundamental que o diâmetro do folículo ovulatório seja superior a 10 mm, e que menores folículos podem resultar na ovulação de um ovócito de boa qualidade, conforme observado no protocolo 1.

A ovulação de um folículo muito grande pode também estar associada com redução da fertilidade, possivelmente devido a uma excessiva duração do desenvolvimento do folículo dominante (TOWNSON et al., 2002; BLEACH et al., 2004; CERRI et al., 2009). Em geral, uma desvantagem com o uso de progestágenos é que a fertilidade da ovulação sincronizada é reduzida devido à extensão do tempo de vida do folículo dominante e da ovulação de ovócitos subférteis (AHMAD et al., 1995; KINDER et al., 1996). Portanto, embora o maior diâmetro do folículo ovulatório possa resultar em maior circulação de P4 após a IA (DEMETRIO et al., 2007; FORRO et al., 2012; WILTBANK et al., 2012), no estudo de Vasconcelos et al. (2013) vacas que ovularam folículos maiores (> 17 mm) tiveram maior concentração de P4 no dia 7, porém, menor taxa de prenhez aos 60 dias, comparadas às vacas que ovularam folículos entre 11 a 17 mm.

Portanto, não basta apenas induzir maior crescimento do folículo. Todos os fatores discutidos têm que atuar com sincronia para que esse complexo sistema reprodutivo desenvolva suas funções regularmente (SARTORI et al., 2013). Vasconcelos et al. (2013) concluíram que a otimização do tamanho do folículo, em programas de IATF, é claramente um equilíbrio complicado entre a qualidade do ovócito, a circulação adequada de estrógeno, próximo ao momento da IA, e a circulação adequada de P4 após a IA. Esses fatores ajudam a explicar porque em alguns casos ocorrem baixas taxas de concepção em animais submetidos a protocolos de IATF.

A avaliação proposta no presente estudo foi verificar alguns dos diversos fatores relacionados à eficiência de protocolos de IATF ou à utilização de eCG, BE, CE ou GnRH sobre os aspectos relacionados ao crescimento folicular até o estágio pré-ovulatório. Assim, poderiam ajudar a explicar porque, em média, mais de 90% das vacas respondem aos protocolos de IATF e apenas 50% ficam gestantes. Verifica-se que as maiores falhas foram relacionadas à ovulação precoce (28,9%) e à qualidade do ovócito, que somando os valores de ovócitos classificados como ruins e degenerados resultaram em 33,3%. Além disso, fatores como falha de ovulação, mortalidade embrionária precoce, entre outros, também estão relacionados às falhas nos protocolos de IATF.

Entre os outros fatores que podem interferir na reprodução, no presente estudo foram verificadas algumas tendências e correlações importantes, referentes às dosagens de progesterona, cortisol e insulina no soro sanguíneo, e cortisol, insulina e LH no fluido folicular. Houve correlação negativa ( $r = -0,28$ ) entre a concentração de P4 e o número de folículos, corroborando com o estudo de Dias et al. (2009), que reportaram que altas concentrações de P4 causam efeitos negativos no desenvolvimento dos folículos. Verificou-se que houve correlação negativa ( $r = -0,58$ ), também da concentração de cortisol sérico com a classificação dos ovócitos, e correlação positiva ( $r = 0,15$ ) do cortisol sérico com a concentração de P4 sérica, no dia da aspiração folicular. A concentração de P4 no soro, no dia da aspiração folicular, teve tendência ( $P = 0,055$ ) negativa ( $r = -0,31$ ) com a classificação dos ovócitos.

Observou-se, também, que houve correlação positiva ( $r = 0,60$ ) da concentração de cortisol no soro com a concentração de cortisol no fluido folicular. A composição do fluido folicular é resultado da atividade secretora das células da teca e da granulosa, e da

transferência de constituintes do plasma sanguíneo que extravasam dos capilares foliculares (GOSDEN et al., 1988).

Adicionalmente, os resultados das concentrações de cortisol e insulina no fluido folicular, não foram diferentes ( $P>0,05$ ) entre os protocolos de IATF utilizados no presente estudo (Tabela 2), indicando que os protocolos de IATF não interferem nas concentrações desses dois hormônios no fluido folicular.

No presente estudo, foi verificada correlação positiva ( $r=0,58$ ) da concentração de insulina no soro e LH no fluido folicular, e correlação positiva ( $r=0,74$ ) das concentrações de insulina no soro e no fluido folicular. Tais correlações estão de acordo com a dinâmica de crescimento folicular, em que a concentração de insulina, no fluido folicular, juntamente com a IGF-1, estimulam a proliferação das células foliculares e a esteroidogênese (SPICER et al., 1993; SPICER; STEWART, 1996). Deste modo, a capacidade dos folículos de produzir estradiol suficiente para desencadear a onda pré-ovulatória de LH e a ovulação, depende da disponibilidade de insulina e de IGF-1 circulantes (BUTLER, 2003).

Assim, o aumento de insulina pode ser benéfico para a retomada dos ciclos estrais pós-parto, mas há evidências de que a alta concentração de insulina no plasma pode ter efeitos prejudiciais sobre a função ovariana (BOLAND et al., 2001; WEBB et al., 2004; GARNSWORTHY et al., 2008) e na competência e desenvolvimento do ovócito (FOULADI-NASHTA et al., 2005). Esses dados são corroborados com os resultados do presente estudo, em que foi verificada tendência ( $P=0,06$ ) negativa ( $r=- 0,33$ ) da concentração de insulina no fluido folicular com o diâmetro ovocitário.

Além disso, quando se agruparam os diâmetros dos folículos dominantes mensurados no dia da aspiração folicular em quatro classes, sendo classe 1 folículos com diâmetro maior que 12 mm, classe 2 entre 10 e 12 mm, classe 3 entre 8 e 9,9 mm e classe 4 menor que 8 mm, verificou-se que houve correlação positiva, porém baixa ( $r=0,24$ ) da classe dos folículos com a concentração de insulina no fluido folicular. Houve, também, tendência ( $P=0,053$ ) negativa ( $r=- 0,32$ ) da concentração sérica de insulina com o ECC da vacas, e o ECC teve correlação positiva ( $r=0,20$ ) com o diâmetro do folículo dominante. Contudo, essas correlações mostram-se baixas. Isso pode ser devido ao fato de que foram utilizadas vacas solteiras no presente estudo, e com ECC médio de 3,15, com variação de 2,5 a 4,0. Vários estudos com vacas de corte relataram que animais com baixos ECC, no início dos

protocolos de IATF, têm menor fertilidade (MENEGETTI et al., 2009; SA FILHO, O.G. et al., 2009; SA FILHO et al., 2011). Assim, técnicas de manejo com o objetivo de manter ou melhorar o ECC antes e, principalmente, peri-parto são importantes para a garantia do futuro da fertilidade de rebanhos bovinos.

Portanto, o sucesso dos protocolos de IATF está associado a diversos fatores, e de acordo com cada situação, pode ser indicado o uso de um ou outro hormônio, em diferentes momentos. Mas, em geral, para que se tenham bons resultados de prenhez, qualquer protocolo de IATF precisa induzir a ovulação de um folículo saudável, com um ovócito de boa qualidade, e que resulte na formação de um corpo lúteo funcional, que produza adequadas concentrações de P4 durante o diestro, para que haja estímulo das secreções endometriais favorecendo assim o desenvolvimento embrionário normal para que ocorra o reconhecimento materno e manutenção da prenhez (TORTORELLA et al., 2013).

## **CONCLUSÕES**

Os diferentes hormônios utilizados em protocolos de IATF, e suas associações, resultam em diferente crescimento médio do folículo dominante e, conseqüentemente, interferem no diâmetro do folículo no momento da inseminação artificial.

A antecipação na aplicação da prostaglandina, em dois dias da retirada do DIP, resulta em menor concentração de progesterona circulante até o dia da retirada do DIP, quando comparado aos protocolos em que a primeira aplicação da prostaglandina é feita no mesmo momento da retirada do DIP. No protocolo 2, em que há a antecipação na aplicação de prostaglandina, e por não utilizar GnRH ou eCG é o protocolo de menor custo, pode ser utilizado para vacas Nelore cíclicas com bons resultados de sincronização e com a ovulação de um ovócito de boa qualidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Bovine model for study of ovarian follicular dynamics in humans. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 113-120, 1995.

AHMAD, N.; SCHRICK, F. N.; BUTCHER, R. L.; INSKEEP, E. K. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. 5, p. 1129-1135, 1995.

ARASHIRO, E. K. N. **Adequação de metodologias para o estudo in vivo da vascularização e da caracterização do fluido folicular e células da granulosa** 2012. 64 f. (Doutorado) - UFMG, Belo Horizonte, 2012.

ARIAS, P.; RODRIGUEZ, M.; SZWARCFARB, B.; SINAY, I. R.; MOGUILEVSKY, J. A. Effect of Insulin on Lhrh Release by Perfused Hypothalamic Fragments. **Neuroendocrinology**, v. 56, n. 3, p. 415-418, 1992.

ATKINS, J. A.; SMITH, M. F.; WELLS, K. J.; GEARY, T. W. Factors affecting preovulatory follicle diameter and ovulation rate after gonadotropin-releasing hormone in postpartum beef cows. Part I: Cycling cows. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 7, p. 2300-2310, 2010.

AYRES, H.; MARTINS, C. M.; FERREIRA, R. M.; MELLO, J. E.; DOMINGUEZ, J. H.; SOUZA, A. H.; VALENTIN, R.; SANTOS, I. C.; BARUSELLI, P. S. Effect of timing of estradiol benzoate administration upon synchronization of ovulation in suckling Nelore cows (*Bos indicus*) treated with a progesterone-releasing intravaginal device. **Animal Reproduction Science**, v. 109, n. 1-4, p. 77-87, 2008.

AYRES, H.; TORRES-JUNIOR, J. R. S.; PENTEADO, L.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Efeito do momento da inseminação e do tratamento com GnRH na IATF sobre a taxa de concepção de vacas de corte lactantes sincronizadas com norgestomet e valerato de estradiol. **Acta Science Veterinariae**, v. 34, p. 408, 2006.

BABCOCK, J. C. Group discussion of 'Luteotrophic and luteolytic mechanisms in bovine corpora lutea' by W. Hansel. **J Reprod Fertil**, v. 47, n. 1, 1966.

BARATTA, M.; WEST, L. A.; TURZILLO, A. M.; NETT, T. M. Activin modulates differential effects of estradiol on synthesis and secretion of follicle-stimulating hormone in ovine pituitary cells. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 2, p. 714-719, 2001.

BARROS, C. M. **Técnica cada vez mais utilizadas nos rebanhos brasileiros permite economia.**, Acesso em: 11 janeiro 2010.

BARROS, C. M.; FERNANDEZ, P. **Inseminação artificial com tempo fixo em zebuínos.** <http://www.abcz.org.br/eventos/anais/1998/112-127.doc>, Disponível em: < <http://www.abcz.org.br/eventos/anais/1998/112-127.doc> >. Acesso em: 3 de dezembro 2013.

BARTOLOMEU, C. C.; DEL REI, A. J.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; SILVA, J. E. Inseminação artificial em tempo fixo de vacas leiteiras mestiças Holando-Zebu no pós-parto com emprego de CIDR reutilizado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 426-427, 2003.

BARUSELLI, P. S.; AYRES, H.; SOUZA, A. H.; MARTINS, C. M.; GIMENES, L. V.; TORRES JR, J. R. S. Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovino de corte. In: 2º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2006, Paraná. **Anais**. Paraná, 2006. p. 113-128.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, N. A. T.; MADUREIRA, E. H.; CAMPOS FILHO, E. P. Efeito de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo na eficiência reprodutiva de vacas de corte lactantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, p. 218-221, 2002.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, N. A. T.; VALENTIN, R.; CARVALHO, A. F.; MADUREIRA, E. H.; COSTA NETO, W. P. Dinâmica folicular em novilhas receptoras de embrião bovino submetidas à sincronização da ovulação para inovulação em tempo fixo. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 28, p. 223, 2000.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; REIS, E. L.; BÓ, G. A. Effect of eCG on pregnancy rates of lactating zebu beef cows treated with CIDR-B devices for timed artificial insemination. **Theriogenology**, v. 59, n. 1, p. 214, 2003.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BO, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 479-486, 2004.

BINELLI, M.; IBIAPINA, B. T.; BISINOTTO, R. S. Bases fisiológicas, farmacológicas e endócrinas dos tratamentos de sincronização do crescimento folicular e da ovulação. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. Supl 1, p. 1-7, 2006.

BLEACH, E. C.; GLENCROSS, R. G.; KNIGHT, P. G. Association between ovarian follicle development and pregnancy rates in dairy cows undergoing spontaneous oestrous cycles. **Reproduction**, v. 127, n. 5, p. 621-629, 2004.

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

BO, G. A.; ADAMS, G. P.; NASSER, L. F.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Effect of Estradiol Valerate on Ovarian Follicles, Emergence of Follicular Waves and Circulating Gonadotropins in Heifers. **Theriogenology**, v. 40, n. 2, p. 225-239, 1993.

BO, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 31-40, 1995.

BO, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; TRIBULO, H. E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R. J. Follicular Wave Dynamics after Estradiol-17-Beta Treatment of Heifers with or without a Progestogen Implant. **Theriogenology**, v. 41, n. 8, p. 1555-1569, 1994.

BO, G. A.; BARUSELLI, P. S.; CHESTA, P. M.; MARTINS, C. M. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 89-101, 2006.

BO, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTINEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 307-326, 2003.

BO, G. A.; CUTAIA, L.; PERES, L. C.; PINCINATO, D.; MARANA, D.; BARUSELLI, P. S. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. **Society for the Study of Reproduction and Fertility**, v. 64, p. 223-236, 2007.

BO, G. A.; CUTAIA, L.; TRIBULO, R. Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos para carne: algunas experiencias realizadas en Argentina. **Taurus**, v. 15, n. 15, p. 17-32, 2002.

BO, G. A.; CUTAIA, L.; TRIBULO, R. Critérios em La eleccion de los programas de IATF em los rodeos para carne **Taurus**, 2002b.

BOLAND, M. P.; LONERGAN, P.; O'CALLAGHAN, D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1323-1340, 2001.

BORGES, L. F. K.; FERREIRA, R.; SIQUEIRA, L. C.; BOHRER, R. C.; BORSTMANN, J. W.; OLIVEIRA, J. F. C.; GONÇALVES, P. B. D. Artificial insemination system without estrous observation in suckled beef cows. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 496-501, 2008.

BORSATO, E. A.; LUDWING, J. R.; RUBIN, K. C. P.; SAUT, J. P. E.; BARREIROS, T. R. R.; SENEDA, M. M. Relação entre o tamanho do folículo ovulatório e taxa de concepção em novilhas *Bos taurus* x *Bos indicus* submetidas a inseminação artificial em tempo fixo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 3, p. 137-142, 2004.

BUSCH, D. C.; SCHAFER, D. J.; WILSON, D. J.; MALLORY, D. A.; LEITMAN, N. R.; HADEN, J. K.; ELLERSIECK, M. R.; SMITH, M. F.; PATTERSON, D. J. Timing of artificial insemination in postpartum beef cows following administration of the CO-Synch + controlled internal drug-release protocol. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 7, p. 1519-1525, 2008.

BUTLER, W. R. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. **Livestock Production Science**, v. 83, n. 2-3, p. 211-218, 2003.

CAMERON, A. W. N.; BATT, P. A. PMSG may directly stimulate ovulation in female goats. **Animal Reproduction Science**, v. 25, n. 3, p. 233-239, 1991.

CARVALHO, J. B.; CARVALHO, N. A.; REIS, E. L.; NICHI, M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, n. 2, p. 167-175, 2008.

CERRI, R. L.; RUTIGLIANO, H. M.; CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E. Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows. **Reproduction**, v. 137, n. 5, p. 813-823, 2009.

CIARLINI, L. D. R. P.; CIARLINI, P. C.; FEITOSA, F. L. F. Quimiluminescência: princípio e aplicações. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 5, n. 2, p. 181-187, 2002.

CLIMENI, B. S. O.; PICCININ, A. A implantação de IATF (inseminação em tempo fixo) juntamente da IA (inseminação tradicional) como mecanismos alternativos o para manejo reprodutivo de bovinos. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, v. 10, 2008.

COLAZO, M. G.; GORDON, M. B.; RAJAMAHENDRAN, R.; MAPLETOFT, R. J.; AMBROSE, D. J. Pregnancy rates to timed artificial insemination in dairy cows treated with gonadotropin-releasing hormone or porcine luteinizing hormone. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 262-270, 2009.

COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; DAVIS, H.; RUTLEDGE, M. D.; MARTINEZ, M. F.; SMALL, J. A.; MAPLETOFT, R. J. Effects of plasma progesterone concentrations on LH release and ovulation in beef cattle given GnRH. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 34, n. 1, p. 109-117, 2008.

COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. **Theriogenology**, v. 60, n. 5, p. 855-865, 2003.

CUTAIA, L.; MORENO, D.; VILLATA, L.; BO, G. Synchrony of ovulation in beef cows treated with progesterone vaginal devices and estradiol benzoate administered at device removal or 24 h later. **Theriogenology**, v. 55, p. 244, 2001.

DANIEL, J. A.; THOMAS, M. G.; HALE, C. S.; SIMMONS, J. M.; KEISLER, D. H. Effect of cerebroventricular infusion of insulin and (or) glucose on hypothalamic expression of leptin receptor and pituitary secretion of LH in diet-restricted ewes. **Domest Anim Endocrinol**, v. 18, n. 2, p. 177-185, 2000.

DAY, M. L. Hormonal induction of estrous cycles in anestrous *Bos taurus* beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 487-494, 2004.

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

DIAS, C. C.; WECHSLER, F. S.; DAY, M. L.; VASCONCELOS, J. L. Progesterone concentrations, exogenous equine chorionic gonadotropin, and timing of prostaglandin F(2alpha) treatment affect fertility in postpuberal Nelore heifers. **Theriogenology**, v. 72, n. 3, p. 378-385, 2009.

DIAS, F. C.; COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J.; ADAMS, G. P.; SINGH, J. Progesterone concentration, estradiol pretreatment, and dose of gonadotropin-releasing hormone affect gonadotropin-releasing hormone-mediated luteinizing hormone release in beef heifers. **Domest Anim Endocrinol**, v. 39, n. 3, p. 155-162, 2010.

DIAS, F. M. G. N. **Efeito da condição corporal, razão peso/altura e peso vivo sobre o desempenho reprodutivo pós-parto de vacas de corte zebuínas**. 1991. 98 f. Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1991.

DISKIN, M. G.; AUSTIN, E. J.; ROCHE, J. F. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. **Domest Anim Endocrinol**, v. 23, n. 1-2, p. 211-228, 2002.

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1211-1239, 2001.

DUCHENS, M.; FORSBERG, M.; EDQVIST, L. E.; GUSTAFSSON, H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of induced suprabasal progesterone levels around estrus on plasma concentrations of progesterone, estradiol-17beta and LH in heifers. **Theriogenology**, v. 42, n. 7, p. 1159-1169, 1994.

FAIR, T. Mammalian oocyte development: checkpoints for competence. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 1, p. 13-20, 2010.

FILHO, A. L. R.; FERRAZ, P. A.; RODRIGUES, A. S.; CALMON, T. C. B. S.; BITTENCOURT, M. V. G.; LOIOLA, M. C. 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, 2013.

FORRO, A.; TSOUSIS, G.; BEINDORFF, N.; SHARIFI, R.; JAKEL, L.; BOLLWEIN, H. Combined use of Ovsynch and progesterone supplementation after artificial insemination in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 8, p. 4372-4381, 2012.

FOULADI-NASHTA, A. A.; GUTIERREZ, C. G.; GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. Effects of dietary carbohydrate source on oocyte/embryo quality and development in high-yielding, lactating dairy cattle. **Biology of Reproduction**, p. 135-136, 2005.

GARNSWORTHY, P. C.; LOCK, A.; MANN, G. E.; SINCLAIR, K. D.; WEBB, R. Nutrition, metabolism, and fertility in dairy cows: 1. Dietary energy source and ovarian function. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 10, p. 3814-3823, 2008.

GEARY, T. W.; WHITTIER, J. C.; DOWNING, E. R.; LEFEVER, D. G.; SILCOX, R. W.; HOLLAND, M. D.; NETT, T. M.; NISWENDER, G. D. Pregnancy rates of postpartum beef cows that were synchronized using Syncro-Mate-B or the Ovsynch protocol. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 6, p. 1523-1527, 1998.

GEARY, T. W.; WHITTIER, J. C.; HALLFORD, D. M.; MACNEIL, M. D. Calf removal improves conception rates to the Ovsynch and CO-Synch protocols. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 1, p. 1-4, 2001.

GIMENES, L. U.; SA FILHO, M. F.; CARVALHO, N. A.; TORRES-JUNIOR, J. R.; SOUZA, A. H.; MADUREIRA, E. H.; TRINCA, L. A.; SARTORELLI, E. S.; BARROS, C. M.; CARVALHO, J. B.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 852-858, 2008.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; KOT, K. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 1, p. 197-205, 2001.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, v. 52, n. 6, p. 1079-1093, 1999.

GONÇALVES, P. B. D. Anestro pós parto em vacas de corte. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2004, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. **Anais**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004. p. 105 - 116.

GOSDEN, R. G.; HUNTER, R. H.; TELFER, E.; TORRANCE, C.; BROWN, N. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. **J Reprod Fertil**, v. 82, n. 2, p. 813-825, 1988.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. Manole, 1995.

HANLON, D. W.; WILLIAMSON, N. B.; WICHTEL, J. J.; STEFFERT, I. J.; CRAIGIE, A. L.; PFEIFFER, D. U. Ovulatory responses and plasma luteinizing hormone concentrations in dairy heifers after treatment with exogenous progesterone and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 47, n. 5, p. 963-975, 1997.

HARRISON, L. M.; RANDEL, R. D. Influence of Insulin and Energy-Intake on Ovulation Rate, Luteinizing-Hormone and Progesterone in Beef Heifers. **Journal of Animal Science**, v. 63, n. 4, p. 1228-1235, 1986.

IRELAND, J. J.; ROCHE, J. F. Effect of progesterone on basal LH and episodic LH and FSH secretion in heifers. **J Reprod Fertil**, v. 64, n. 2, p. 295-302, 1982.

KASIMANICKAM, R.; DAY, M. L.; RUDOLPH, J. S.; HALL, J. B.; WHITTIER, W. D. Two doses of prostaglandin improve pregnancy rates to timed-AI in a 5-day progesterone-based synchronization protocol in beef cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 762-767, 2009.

KASTELIC, J. P.; GINTHER, O. J. Factors Affecting the Origin of the Ovulatory Follicle in Heifers with Induced Luteolysis. **Animal Reproduction Science**, v. 26, n. 1-2, p. 13-24, 1991.

KINDER, J. E.; KOJIMA, F. N.; BERGFELD, E. G.; WEHRMAN, M. E.; FIKE, K. E. Progesterin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 6, p. 1424-1440, 1996.

KURAN, M.; HUTCHINSON, J. S.; BROADBENT, P. J. The response of bovine granulosa cells to different gonadotrophins in culture. **Animal Reproduction Science**, v. 45, n. 1-2, p. 1-12, 1996.

LAMMOGLIA, M. A.; SHORT, R. E.; BELLOWS, S. E.; BELLOWS, R. A.; MACNEIL, M. D.; HAFS, H. D. Induced and synchronized estrus in cattle: Dose titration of estradiol benzoate in peripubertal and postpartum cows after treatment with an intravaginal progesterone-releasing insert and prostaglandin F-2 alpha. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 6, p. 1662-1670, 1998.

LEE, H.; PARK, C. J.; LEE, G. Measurement of progesterone in human serum by isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry and comparison with the commercial chemiluminescence immunoassay. **Anal Bioanal Chem**, v. 396, n. 5, p. 1713-1719, 2010.

LEROY, J. L.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; GOOVAERTS, I. G.; BOLS, P. E. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I. The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 5, p. 612-622, 2008.

LIMA, H. L. S. **Avaliação do perfil de progesterona plasmático em ovinos por quimioluminescência durante a gestação**. 2012. 40 f. - UFMG, Belo Horizonte, 2012.

LOPEZ, J. P. S. **Ovarian and hormonal events during synchronization of ovulation and timed appointment breeding of Bos indicus- influenced cattle using intravaginal**

**progesterone, GnRH and prostaglandin F2 $\alpha$** . 2005. 96 f. (Master of Science) - Texas A&M University 2005.

LOSS, F.; VAN VIETLE, C.; VAN MAURIK, P.; KRUIP, T. A. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**, v. 24, p. 197-204, 1989.

LUCY, M. C. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. **Reproduction**, v. 61, p. 415-427, 2002.

MACMILLAN, K. L.; BURKE, C. R. Effects of oestrous cycle control on reproductive efficiency. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1, p. 307-320, 1996.

MADUREIRA, E. H. Sincronização com Progestágenos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2004, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. **Anais**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004. p. 117-128.

MADUREIRA, E. H.; FERNANDES, R. H. R.; ROSSA, L. A. F. Anestro pós-parto em bovinos: a suplementação com óleos vegetais pode encurtá-los. In: II SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2006, Londrina. **Anais**. Londrina, 2006. p. 63-70.

MANN, G. E.; HARESIGN, W. Effect of oestradiol treatment during GnRH-induced ovulation on subsequent PGF(2  $\alpha$ ) release and luteal life span in anoestrous ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 67, n. 3-4, p. 245-252, 2001.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrous cycle in the cow. **Animal Reproduction Science**, v. 64, n. 3-4, p. 171-180, 2000.

MANTOVANI, A. P.; NICHI, M.; SÁ FILHO, M. F.; AYRES, H.; VETTORATO, L. F.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Follicular growth and plasma progesterone patterns in *Bos indicus* × *Bos taurus* heifers submitted to different PGF2 $\alpha$ /progesterone-based synchronization protocols. **Animal Reproduction**, v. 7, n. 2, p. 91-96, 2010.

MANTOVANI, A. P.; SÁ FILHO, M. F.; REIS, E. L.; NICHI, M.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Efeito da concentração plasmática de progesterona na dinâmica folicular em novilhas *Bos indicus* × *Bos taurus*. **Acta Science Veterinariae**, v. 32, p. 232, 2004.

MAPLETOFT, R. J.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Control of ovarian function for assisted reproductive technologies in cattle. **Animal Reproduction**, v. 6, n. 1, p. 114-124, 2009.

MAPLETOFT, R. J.; STEWARD, K. B.; ADAMS, G. P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reprod Nutr Dev**, v. 42, n. 6, p. 601-611, 2002.

MARAÑA, D.; CUTAIA, L.; PERES, L.; PINCINATO, D.; BORGES, L. F. K.; BO, G. A. Ovulation and pregnancy rates in postpartum *Bos indicus* cows treated with progesterone vaginal inserts and estradiol benzoate, with or without eCG and temporary weaning. **Reproduction Fertility and Development**, v. 18, p. 116-117, 2006.

MARTINEZ, M. F.; ADAMS, G. P.; BERGFELT, D. R.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 57, n. 1-2, p. 23-33, 1999.

MARTINEZ, M. F.; COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effects of estradiol and progesterone on plasma steroid and gonadotropin concentrations in CIDR-treated ovariectomized cows. **Theriogenology**, v. 59, p. 224, 2003.

MARTINEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; BO, G. A.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R. J. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 86, n. 1-2, p. 37-52, 2005.

MARTINEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; COLAZO, M. G.; MAPLETOFT, R. J. Effects of estradiol on gonadotrophin release, estrus and ovulation in CIDR-treated beef cattle. **Domest Anim Endocrinol**, v. 33, n. 1, p. 77-90, 2007.

MCCRACKEN, J. A.; CARLSON, J. C.; GLEW, M. E.; GODING, J. R.; BAIRD, D. T.; GREEN, K.; SAMUELSSON, B. Prostaglandin F<sub>2</sub> identified as a luteolytic hormone in sheep. **Nat New Biol**, v. 238, n. 83, p. 129-134, 1972.

MCEVOY, T. G.; ROBINSON, J. J.; AITKEN, R. P.; FINDLAY, P. A.; PALMER, R. M.; ROBERTSON, I. S. Dietary-induced suppression of pre-ovulatory progesterone concentrations in superovulated ewes impairs the subsequent in vivo and in vitro development of their ova. **Animal Reproduction Science**, v. 39, n. 2, p. 89-107, 1995.

MENEGHETTI, M.; SA FILHO, O. G.; PERES, R. F.; LAMB, G. C.; VASCONCELOS, J. L. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: basis for development of protocols. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 179-189, 2009.

MIKESKA, J. C.; WILLIAMS, G. L. Timing of preovulatory endocrine events, estrus and ovulation in Brahman x Hereford females synchronized with norgestomet and estradiol valerate. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 4, p. 939-946, 1988.

MUCCIOLO, R. G.; BARBEIRO, J. C. Níveis de progesterona no plasma sanguíneo, durante o ciclo estral ea gestacao de vacas nelore (*Bos indicus*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 7, p. 11-21, 1983.

MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine Chorionic-Gonadotropin. **Endocrine Reviews**, v. 12, n. 1, p. 27-44, 1991.

MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine chorionic gonadotropin. **Endocr Rev**, v. 12, n. 1, p. 27-44, 1991.

MURRAY, A. J.; CAVALIERI, J.; D'OCCHIO, M. J.; WHYTE, T. R.; MACLELLAN, L. J.; FITZPATRICK, L. A. Treatment with progesterone and 17 beta-oestradiol to induce emergence of a newly-recruited dominant ovulatory follicle during oestrus synchronisation with long-term use of norgestomet in Brahman heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 50, n. 1-2, p. 11-26, 1998.

NETT, T. M.; TURZILLO, A. M.; BARATTA, M.; RISPOLI, L. A. Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. **Domest Anim Endocrinol**, v. 23, n. 1-2, p. 33-42, 2002.

PARROTT, J. A.; SKINNER, M. K. Developmental and hormonal regulation of keratinocyte growth factor expression and action in the ovarian follicle. **Endocrinology**, v. 139, n. 1, p. 228-235, 1998.

PERES, R. F.; CLARO, I., JR.; SA FILHO, O. G.; NOGUEIRA, G. P.; VASCONCELOS, J. L. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v. 72, n. 5, p. 681-689, 2009.

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

PERRY, G. A.; SMITH, M. F.; ROBERTS, A. J.; MACNEIL, M. D.; GEARY, T. W. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 3, p. 684-689, 2007.

PETERS, A. R.; MARTINEZ, T. A.; COOK, A. J. A meta-analysis of studies of the effect of GnRH 11-14 days after insemination on pregnancy rates in cattle. **Theriogenology**, v. 54, n. 8, p. 1317-1326, 2000.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF<sub>2</sub>alpha and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915-923, 1995.

RATHBONE, M. J.; KINDER, J. E.; FIKE, K.; KOJIMA, F.; CLOPTON, D.; OGLE, C. R.; BUNT, C. R. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, n. 3, p. 277-320, 2001.

RICHARDSON, A. P.; KIM, J. B.; BARNARD, G. J.; COLLINS, W. P.; MCCAPRA, F. Chemi-Luminescence Immunoassay of Plasma Progesterone, with Progesterone Acridinium Ester Used as the Labeled Antigen. **Clinical Chemistry**, v. 31, n. 10, p. 1664-1668, 1985.

ROBERSON, M. S.; WOLFE, M. W.; STUMPF, T. T.; KITOK, R. J.; KINDER, J. E. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. **Biology of Reproduction**, v. 41, n. 6, p. 997-1003, 1989.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; HULTGREN, J.; BAGE, R.; BERGQVIST, A. S.; SVENSSON, C.; BERGSTEN, C.; LIDFORS, L.; GUNNARSSON, S.; ALGERS, B.; EMANUELSON, U.; BERGLUND, B.; ANDERSSON, G.; LINDLE, B.; STALHAMMAR, H.; GUSTAFSSON, H. Reproductive performance in high-producing dairy cows: can we sustain it under current practice? In: INTERNATIONAL VETERINARY INFORMATION SERVICE, 2008, New York. **Anais**. New York, 2008. p.

ROSS, P. J.; ALLER, J. F.; CALLEJAS, S. S.; BUTLER, H.; ALBERIO, R. H. Estradiol benzoate given 0 or 24 h after the end of a progestagen treatment in postpartum suckled beef cows. **Theriogenology**, v. 62, n. 1-2, p. 265-273, 2004.

SA FILHO, M. F.; CRESPILO, A. M.; SANTOS, J. E.; 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, n. 1-4, p. 23-30, 2010.

SA FILHO, M. F.; REIS, E. L.; VIEL JR, J. O.; NICHI, M.; MADUREIRA, E. H.; BARUSELLI, P. S. Follicular dynamics in anestrous lactating Nelore treated with ear implant, eCG and GnRH. **Acta Science Veterinariae**, v. 32, p. 235, 2004.

SA FILHO, M. F.; SANTOS, J. E.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N.; BARUSELLI, P. S. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 455-463, 2011.

SA FILHO, O. G.; MENEGHETTI, M.; PERES, R. F.; LAMB, G. C.; VASCONCELOS, J. L. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 210-218, 2009.

SA FILHO, O. G.; THATCHER, W. W.; VASCONCELOS, J. L. Effect of progesterone and/or estradiol treatments prior to induction of ovulation on subsequent luteal lifespan in anestrous Nelore cows. **Anim Reprod Sci**, v. 112, n. 1-2, p. 95-106, 2009.

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

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

SARTORI, R.; GUARDIEIRO, M. M.; SURJUS, R. S.; MELO, L. F.; PRATA, A. B.; ISHIGURO, M.; BASTOS, M. R.; NASCIMENTO, A. B. Metabolic hormones and reproductive function in cattle. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 199-205, 2013.

SAVIO, J. D.; THATCHER, W. W.; MORRIS, G. R.; ENTWISTLE, K.; DROST, M.; MATTIACCI, M. R. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. **J Reprod Fertil**, v. 98, n. 1, p. 77-84, 1993.

SCHOENEMANN, H. M.; HUMPHREY, W. D.; CROWDER, M. E.; NETT, T. M.; REEVES, J. J. Pituitary luteinizing hormone-releasing hormone receptors in ovariectomized cows after challenge with ovarian steroids. **Biology of Reproduction**, v. 32, n. 3, p. 574-583, 1985.

SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. Cadmmus Professional Communication, 2003. 32 p.

SILCOX, R. W.; POWELL, K. L.; KISER, T. E. Ability of dominant follicle (DF) to respond exogenous GnRH administration is dependent on their stage of development. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 219, 1993.

SILVA, C. C.; KNIGHT, P. G. Effects of androgens, progesterone and their antagonists on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. **J Reprod Fertil**, v. 119, n. 2, p. 261-269, 2000.

SIMPSON, R. B.; CHASE, C. C.; SPICER, L. J.; VERNON, R. K.; HAMMOND, A. C.; RAE, D. O. Effect of Exogenous Insulin on Plasma and Follicular Insulin-Like Growth-Factor-I, Insulin-Like Growth-Factor Binding-Protein Activity, Follicular Estradiol and Progesterone, and Follicular-Growth in Superovulated Angus and Brahman Cows. **J Reprod Fertil**, v. 102, n. 2, p. 483-492, 1994.

SIQUEIRA, L. C.; OLIVEIRA, J. F.; ROVANI, M. T.; FERREIRA, R.; BORGES, L. F.; GONCALVES, P. B. Effects of estradiol and progestins on follicular regression before, during, and after follicular deviation in postpartum beef cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 614-619, 2009.

SIQUEIRA, L. C.; OLIVEIRA, J. F. C.; LOGUÉRCIO, R. S.; LÖF, H. K.; GONÇALVES, P. B. D. Sistemas de inseminação artificial em dois dias com observação de estro ou em tempo fixo para vacas de corte amamentando. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 411-415, 2008.

SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biology of Reproduction**, v. 39, n. 2, p. 308-317, 1988.

SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. **Endocrinology**, v. 127, n. 2, p. 916-925, 1990.

SMITH, M. J.; JENNES, L. Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. **Reproduction**, v. 122, n. 1, p. 1-10, 2001.

SOUZA, A. H.; VIECHNIESKI, S.; LIMA, F. A.; SILVA, F. F.; ARAUJO, R.; BO, G. A.; WILTBANK, M. C.; BARUSELLI, P. S. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. **Theriogenology**, v. 72, n. 1, p. 10-21, 2009.

SPICER, L. J.; ALPIZAR, E.; ECHTERNKAMP, S. E. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 5, p. 1232-1241, 1993.

SPICER, L. J.; ECHTERNKAMP, S. E. The Ovarian Insulin and Insulin-Like Growth-Factor System with an Emphasis on Domestic-Animals. **Domest Anim Endocrinol**, v. 12, n. 3, p. 223-245, 1995.

SPICER, L. J.; STEWART, R. E. Interactions among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin, and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cell numbers and steroidogenesis of bovine thecal cells: role of IGF-I receptors. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 1, p. 255-263, 1996.

STAGG, K.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M.; ROCHE, J. F. Follicular development in long-term anoestrous suckler beef cows fed two levels of energy postpartum. **Animal Reproduction Science**, v. 38, n. 1, p. 49-61, 1995.

STEVENSON, J. S.; PHATAK, A. P.; RETTMER, I.; STEWART, R. E. Postinsemination administration of receptal: follicular dynamics, duration of cycle, hormonal responses, and pregnancy rates. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 9, p. 2536-2547, 1993.

THOMAS, V. M. **Beef cattle Production**. London: Wave Land Press, 1992. 348 p.

TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; AYRES, H.; ARAÚJO, R. L.; MAGALHÃES, D. M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Dinâmica folicular de vacas nelore (*Bos indicus*) tratadas com dispositivo intravaginal auricular de norgestomet associado ao cipionato de estradiol e submetidas a administração de GnRH 48 ou 54 horas após a retirada do dispositivo intravaginal. **Acta Science Veterinariae**, v. 35, p. 1111, 2007.

TORTORELLA, R. D.; FERREIRA, R.; SANTOS, J. T.; ANDRADE NETO, O. S.; BARRETA, M. H.; OLIVEIRA, J. F.; GONÇALVES, P. B.; NEVES, J. P. The effect of equine chorionic gonadotropin on follicular size, luteal volume, circulating progesterone

concentrations, and pregnancy rates in anestrous beef cows treated with a novel fixed-time artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 79, n. 8, p. 1204-1209, 2013.

TOWNSON, D. H.; TSANG, P. C.; BUTLER, W. R.; FRAJBLAT, M.; GRIEL JR., L. C.; JOHNSON, C. J.; MILVAE, R. A.; NIKSIC, G. M.; PATE, J. L. Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 4, p. 1053-1058, 2002.

TWAGIRAMUNGU, H.; GUILBAULT, L. A.; DUFOUR, J. J. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 10, p. 3141-3151, 1995.

TWAGIRAMUNGU, H.; GUILBAULT, L. A.; PROULX, J. G.; DUFOUR, J. J. Influence of corpus luteum and induced ovulation on ovarian follicular dynamics in postpartum cyclic cows treated with buserelin and cloprostenol. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 7, p. 1796-1805, 1994.

VASCONCELOS, J. L.; SA FILHO, O. G.; PEREZ, G. C.; SILVA, A. T. Intravaginal progesterone device and/or temporary weaning on reproductive performance of anestrous crossbred Angus x Nelore cows. **Animal Reproduction Science**, v. 111, n. 2-4, p. 302-311, 2009.

VASCONCELOS, J. L.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H. N.; GUENTHER, J. G.; WILTBANK, M. C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v. 56, n. 2, p. 307-314, 2001.

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

VYNCKIER, L.; DEBACKERE, M.; DE KRUIF, A.; CORYN, M. Plasma estradiol-17 beta concentrations in the cow during induced estrus and after injection of estradiol-17 beta benzoate and estradiol-17 beta cypionate--a preliminary study. **J Vet Pharmacol Ther**, v. 13, n. 1, p. 36-42, 1990.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; GONG, J. G.; ARMSTRONG, D. G. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, v. 82 E-Suppl, p. E63-74, 2004.

WEHRMAN, M. E.; ROBERSON, M. S.; CUPP, A. S.; KOJIMA, F. N.; STUMPF, T. T.; WERTH, L. A.; WOLFE, M. W.; KITTOCK, R. J.; KINDER, J. E. Increasing Exogenous Progesterone during Synchronization of Estrus Decreases Endogenous 17-Beta-Estradiol and Increases Conception in Cows. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 2, p. 214-220, 1993.

WETTEMANN, R. P. Postpartum endocrine function of cattle, sheep and swine. **Journal of Animal Science**, v. 51, n. Supplement II, p. 2-15, 1980.

WILTBANK, J. N.; ROWDEN, W. W.; INGALLS, J. E. Effects of Various Forms and Levels of Estrogens Alone or in Combinations with Gonadotrophins on Estrous Cycle of Beef Heifers. **Journal of Animal Science**, v. 20, n. 2, p. 341, 1961.

WILTBANK, M. C.; SOUZA, A. H.; GIORDANO, J. O.; NASCIMENTO, A. B.; VASCONCELOS, J. M.; PEREIRA, M. H. C.; FRICKE, P. M.; SURJUS, R. S.; ZINSLY, F. C. S.; CARVALHO, P. D. Positive and negative effects of progesterone during timed AI protocols in lactating dairy cattle. **Animal Reproduction**, v. 9, p. 231-241, 2012.

XU, Z.; GARVERICK, H. A.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; HAMILTON, S. A.; YOUNGQUIST, R. S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 4, p. 951-957, 1995.

YAVAS, Y.; WALTON, J. S. Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: A review. **Theriogenology**, v. 54, n. 1, p. 1-23, 2000.