

EMÍLIO PEREIRA DE BRITO NETO

**DIÂMETRO DO FOLÍCULO MAIOR NO MOMENTO DA APLICAÇÃO DO
ESTRADIOL E TAXA DE GESTAÇÃO EM VACAS SUBMETIDAS À
SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA 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
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

B862d
2012

Brito Neto, Emílio Pereira de, 1984-

Diâmetro do folículo maior no momento da aplicação do estradiol e taxa de gestação em vacas submetidas à sincronização da ovulação para IATF / Emílio Pereira de Brito Neto. – Viçosa, MG, 2012.
xii, 56f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Eduardo Paulino da Costa.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

Referências bibliográficas: f. 38-56

1. Vaca - Gestação. 2. Ovulação - Indução. 3.
Inseminação artificial. 4. Ovários. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 636.2082

EMÍLIO PEREIRA DE BRITO NETO

**DIÂMETRO DO FOLÍCULO MAIOR NO MOMENTO DA APLICAÇÃO DO
ESTRADIOL E TAXA DE GESTAÇÃO EM VACAS SUBMETIDAS À
SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA 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.

APROVADA: 13 de março de 2012

Prof. Ademir de Moraes Ferreira
(Co-orientador)
(Embrapa)

Prof. José Domingos Guimarães
(Co-orientador)
(UFV)

Prof. Geraldo Sérgio Senra Carneiro Barbosa
(Membro)
(UFV)

Prof. Eduardo Paulino da Costa
(Orientador)
(UFV)

*"O mais importante da vida não é a situação em que estamos,
mas a direção para a qual nos movemos"
(Oliver Wendall Holmes)*

*"Nenhuma grande vitória é possível sem que tenha sido precedida
de pequenas vitórias sobre nós mesmos"
(L. M. Leonov)*

*"Não imponha limites a si mesmo. Muitas pessoas se limitam naquilo que elas
pensam que conseguem fazer. Você pode ir tão longe quanto sua
mente deixar. O que você acredita, você pode realizar"
(Mary Kay Ash)*

*Dedico aos meus pais,
Marcílio Pinheiro de Brito e
Eni Aparecida Pereira,
meus Portos Seguro.*

AGRADECIMENTOS

Indiscutivelmente Deus está acima de tudo em nossas vidas e certamente sem a bênção divina, não alcançaríamos nada do que desejamos. Sou eternamente grato a “Ele” pela condição e força proporcionada para alcançar meus objetivos, pela constante proteção e principalmente pela presença nos momentos de solidão.

Agradeço aos meus pais Marcílio Pinheiro de Brito e Eni Aparecida Pereira, por acreditarem em mim e me apoiarem nas decisões, pelo exemplo de vida e também pelos inúmeros conselhos que sempre me nortearam sobre o melhor caminho a seguir.

À minha irmã Synara Pereira de Brito pelo apoio em todos os momentos. Agradeço a meu avô e xará Emílio Pereira do Prado pelo carinho e orgulho estampado em seu rosto a cada encontro e à minha avó Efigênia pelo acolhimento nos finais de ano, bem como aos meus tios e primos pelos momentos de descontração e paz.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Gado de Leite) pela oportunidade do longo período de estágio, despertando em mim o interesse pela área científica.

Agradeço em especial ao Dr. Wanderlei Ferreira de Sá (pesquisador aposentado da Embrapa), amigo, cliente e padrinho emprestado, por me apoiar e conduzir para a vida acadêmica.

A dois pesquisadores da Embrapa, Dra. Vânia Maria de Oliveira, pela grande amizade, dedicação, experiência de vida, e proveitosos momentos trabalhando juntos, os quais foram imprescindíveis para esta conquista, além do Dr. Márcio Roberto Silva, pelo carinho, conselhos e convivência compartilhados.

A Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela oportunidade concedida para minha capacitação e especialização profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos durante o mestrado.

Ao meu Professor e Orientador Dr. Eduardo Paulino da Costa, por mim considerado um segundo pai, pela oportunidade da orientação nesta Pós Graduação, como também pelo exemplo de vida de conquistas alcançadas,

pelos ensinamentos, momentos de convivência, pelos “puxões de orelha”, e pelos conselhos, principalmente para que eu tenha determinação.

Ao Professor e Co-orientador Dr. Ademir de Moraes Ferreira (pesquisador aposentado da Embrapa e atual Professor da FAA), pela grande contribuição na elaboração deste Projeto, pela ótima receptividade em sua residência, em qualquer horário, juntamente com sua esposa Camélia, além dos longos momentos de bate papo de histórias vividas que servem de exemplo. Aproveito para parabenizá-lo também, pela excelente contribuição para a literatura veterinária, com seu recente livro publicado, “Reprodução da Fêmea Bovina” que, sem dúvidas é indispensável, pela riqueza de seu conteúdo.

Aos Professores Dr. José Domingos Guimarães (JD) e Dr. Ricardo Junqueira Del Carlo, pela grande atenção, humildade e conselhos prestados. Agradeço também aos demais Professores da UFV que tive oportunidade de conhecer pessoalmente e/ou através de disciplinas cursadas.

Ao diretor da UFV Campus Florestal, Antônio César Pereira Calil, pela ótima receptividade na instituição, liberdade e recursos para desenvolvimento das atividades necessárias para condução deste projeto e outros.

Aos Professores da UFV Campus Florestal, Drs. Clarindo Inácio de Aparecida Queiróz, Geraldo Sérgio Senra e Maurilo Batista do Carmo, pela oportunidade de trabalho conjunto, aulas e cursos ministrados, amizade conquistada, momentos de descontração e muitas risadas.

Ao Dr. João Henrique Moreira Viana (Embrapa), Dra. Eunice Oba (Unesp) e Eduardo Arashiro (Embrapa) que não mediram esforços para colaborar e ajudar-nos na dosagem de P4 por radioimunoensaio.

A todos meus professores da graduação, que contribuíram com seus conhecimentos, formando uma base para que este objetivo fosse alcançado.

Aos grandes amigos do departamento de Zootecnia da UFV Campus Florestal, pelo inesquecível alegre convívio durante nove meses de 2011, que se tornaram muito especiais nesta fase e continuarão sendo: Sr. Gabriel (Gabrila) pela simplicidade e disposição em ajudar, a qualquer momento; ao Danilo José (Danilão), agrônomo dedicado da CEDAF, pelo companheirismo, sem tempo ruim, seja para a farra ou trabalho, e pelas receitas preparadas na cozinha, onde possui amplo domínio. Osvaldo, Osmar e Dingão, pela humildade, pelos inúmeros casos contados em volume bem alto, que era para

não esquecer, pela diversão proporcionada a todo instante e grandes favores prestados; Aos demais amigos do setor: Tuna, Primo, Marreco das cabras, Sílvio e Valdivino pela contribuição em diversas tarefas e aos amigos servidores: Rubinho, Rogerinho e Wander pelo acolhimento no CTA e por ajudar-me nos momentos necessários; Romeu, pelo convívio amigo e bate papo no CTA; Dona Elza pelos preciosos e religiosos conselhos para confortar-me e pela ajuda prestada; agradeço também ao Sr. Adão (motorista), José Aparecido, Prof. Leo, Marco Antônio, Maria Lúcia, Mário do iogurte e Tarcísio, pela simpatia e grande auxílio, e a todos os funcionários do refeitório pela alimentação de cada dia.

A Rose e Bete, da Secretaria de Pós Graduação do DVT-UFV, por me aturarem e manter-me atualizado das notícias, além de estarem sempre dispostas a ajudar, e também aos servidores e funcionários: Bel, Sr. Divino, pelo cafezinho e amizade; Sidney, Nicola, Adão, Sr. Francisco (biblioteca do DZO) e Rogerinho (xerox) pelas diversas conversas pelos corredores do departamento, além de todos que a cada encontro deixaram sempre um sorriso amigo.

Ao meu considerável amigo da Pós, Rafael José Otero Arroyo (Colombiano) pela sinceridade, trabalhos conjuntos, além de diversos momentos de descontração.

Aos colegas da Pós: Alberto, Áurea, Breno, Emílio Nieto (Preventiva), Flávia, Hugo, Jonanthan, José Rogério, Lina, Madriano, Rogério Pinho, Sanelly e Sebastião (UFMG), pela humildade, respeito e ótima convivência.

Aos estudantes de Técnico em Agropecuária e colegas de Florestal com os quais pude compartilhar inúmeros momentos de alegria: Afrânio, Amarildo do Trailer, Bruninho, Camilla, Canelinha, Cleres, Déia, Doug, Esmigo, Galêgo, Gil Policial, Gregory, Guzu, Iago, Juninho (Dingão), Lucão, Luíz (Petrobrás), Mafram, Mary, Neizim, Rafael Engenheiro, Tarik, Tió-Tió, Xingú e Xú e também os da Graduação e Pós da UFV: Emílio César, Rodrigo, Víviam, etc..

Aos colegas de Viçosa: André, Bruno Pereira (Feijão), Fernando Júnior, Hoover, Paulo Vítor, Pepi e Robson da Vet e ao Rafael, amigo de república, que me acompanham nesta jornada.

Não poderia me esquecer das protagonistas deste trabalho, que foram imprescindíveis para realização do mesmo, as vacas de leite da Universidade Federal de Viçosa Campus Florestal. A vocês meu **MUITO OBRIGADO!**

BIOGRAFIA

EMÍLIO PEREIRA DE BRITO NETO, filho de Marcílio Pinheiro de Brito e Eni Aparecida Pereira, nasceu na cidade de Caratinga, Minas Gerais, em 26 de Setembro de 1984.

Em março de 2004, ingressou no curso de Medicina Veterinária, graduando-se na Faculdade de Medicina Veterinária de Valença, Valença/RJ em janeiro de 2009.

Em março de 2010, iniciou o curso no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, tendo defendido a dissertação de Mestrado em 13 de março de 2012.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Inseminação artificial em tempo fixo (IATF).....	3
2.2. Foliculogênese: hormônios envolvidos	7
2.2.1. Relação entre FSH, LH, ativina, folistatina e inibina na foliculogênese	11
2.3. Folículo dominante	11
2.3.1. Particularidades do folículo dominante	12
2.4. Maturação do ovócito	13
2.4.1. Relação do diâmetro folicular com a maturação ovocitária	14
2.5. Esteróides e ovulação	15
2.5.1. Controle vascular da ovulação.....	16
2.6. Formação do corpo lúteo (luteogênese).....	16
2.6.1. Alterações morfológicas	17
2.6.2. Alterações bioquímicas e endócrinas	18
2.6.3. Características morfológicas do corpo lúteo.....	18
2.6.4. Produção de progesterona	19
2.6.5. Corpo lúteo, progesterona e desenvolvimento embrionário inicial ...	20
2.7. Prostaglandina.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. Localização e período experimental	25
3.2. Animais.....	25
3.3. Delineamento experimental	25
3.4. Determinação da concentração de progesterona	27
3.5. Análises estatísticas	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5. CONCLUSÃO	37
6. BIBLIOGRAFIA.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

Sigla	Significado	Sigla	Significado
AOLC	Atividade ovariana luteal cíclica	HPB	Holandês preto e branco
BEP	Balanço energético positivo	IA	Inseminação artificial
CE	Ciclo estral	IFN-t	Interferon-tau
CL	Corpo lúteo	IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina I
Cs	Células	IGFBP	Proteína ligadora de fator de crescimento semelhante à insulina
E ₂	Estrógeno	LH	Hormônio luteinizante
FD	Folículo dominante	mL	Mililitro
FS	Folículo subordinado	mm	Milímetro
FSH	Hormônio folículo estimulante	µg	Micrograma
G	Granulosa	µm	Micrômetro
GH	Hormônio do crescimento	OF	Onda folicular
Gn	Gonadotrofina	OXT	Ocitocina
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas	P4	Progesterona
hCG	Gonadotrofina coriônica humana	PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
		Rs	Receptores
		TI	Teca interna

RESUMO

BRITO NETO, Emílio Pereira. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2012. **Diâmetro do folículo maior no momento da aplicação do estradiol e taxa de gestação em vacas submetidas à sincronização da ovulação para IATF.** Orientador: Eduardo Paulino da Costa. Coorientadores: Ademir de Moraes Ferreira, José Domingos Guimarães, Laércio do Anjos Benjamin e Tarcízio Antônio Rêgo de Paula.

Objetivou-se neste estudo, avaliar o efeito do diâmetro folicular no momento da aplicação do estradiol (E_2), na taxa de gestação de vacas, que receberam protocolo hormonal de prostaglandina $F_{2\alpha}$, seguida de E_2 para posterior IATF. Foram utilizadas 47 vacas mestiças *Bos taurus x indicus* apresentando atividade ovariana luteal cíclica e em lactação. As vacas receberam dois mL (150 μ g) de análogo sintético de $PGF_{2\alpha}$ (D+cloprostenol), via intramuscular (i.m.). Foi mensurado o diâmetro do maior folículo presente (dominante) por meio de exame ultrassonográfico. Após 24h, as vacas receberam um tratamento com dois mL (2mg) de estradiol (Benzoato de estradiol) via i.m., e foram novamente avaliadas por meio de exame com ultrassom para mensuração e certificação da dominância folicular, quando então foram divididas em dois tratamentos: Tratamento 1 (vacas com folículo dominante de diâmetro menor que 13mm) e Tratamento 2 (vacas com folículo dominante de diâmetro ≥ 13 mm). Após 48h da aplicação do E_2 , as vacas foram inseminadas artificialmente. O diagnóstico de gestação foi realizado aos 30 e 100 dias após a IA por meio de ultrassonografia via transretal. Observou-se diferença ($P < 0,05$) de 76% (19/25) e 45,5% (10/22) nas taxas de gestação para os animais dos Tratamentos 1 e 2, respectivamente. As concentrações séricas de progesterona no décimo dia pós IA foram $1,34 \pm 0,49$ e $2,16 \pm 1,17$, respectivamente, para os Tratamentos 1 e 2, mostrando diferença entre si ($P < 0,01$). Entretanto, houve uma baixa correlação ($r = 0,45$) entre a concentração sérica de progesterona dez dias após a IA e presença de gestação. Conclui-se que o diâmetro folicular no momento da aplicação do E_2 tem influência na fertilidade de vacas leiteiras, com diâmetro menor que 13mm apresentaram melhores resultados que os ≥ 13 mm. Além disto, folículos com diâmetro ≥ 13 mm formaram corpos lúteos que produzem maior quantidade de progesterona após a inseminação artificial, o que não influenciou na taxa de gestação.

ABSTRACT

BRITO NETO, Emílio Pereira. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2012. **The largest follicle diameter at the moment of the oestradiol injection and the pregnancy rates in dairy cows submitted to the ovulation synchronization for FTAI.** Adviser: Eduardo Paulino da Costa. Co-advisers: Ademir de Moraes Ferreira, José Domingos Guimarães, Laércio do Anjos Benjamin and Tarcízio Antônio Rêgo de Paula.

This study was carried out to evaluate the effect of the follicle diameter at the moment of the application of the oestradiol (E_2), on the gestation rate of cows that received hormonal protocol of prostaglandin $F_{2\alpha}$, followed by E_2 for subsequent FTAI. Forty seven crossbred cows *Bos taurus x indicus* presenting luteal cyclical activity ovarian and in lactation were used. The cows were given two mL (150 μ g) of the synthetic analogous of $PGF_{2\alpha}$ (D+chloprostenol) through intramuscular (i.m.). The diameter of the highest follicle present (dominant) was measured by ultrasonographic exam. After 24 hours, the cows were given a treatment with two mL (2mg) of oestradiol (oestradiol Benzoate) via i.m., and they were again evaluated through ultrasound examination for measuring and certifying the follicular dominance. Then, they were divided into two treatments: Treatment 1 (cows from which the diameter of the dominant follicle was lower than 13mm) and Treatment 2 (cows from which the diameter of the dominant follicle was with dominant follicle of diameter ≤ 13 mm). After 48h from application of E_2 , the cows were artificially inseminated. The gestation diagnosis was accomplished at 30 and 100 days after AI by ultrasound via transrectum. Differences ($P < 0,05$) of 76% (19/25) and 45.5% (10/22) were observed in the gestation rates for the animals of the Treatments 1 and 2, respectively. At the 10th day after AI, the serum concentrations of progesterone were 1.34 ± 0.49 and 2.16 ± 1.17 for the Treatments 1 and 2 respectively, as showing differences between them ($P < 0.01$). However, there was a low correlation ($r = 0.45$) between the serum progesterone concentration at ten days after AI and the gestation presence. It is concluded the follicular diameter at the moment of the E_2 application to affect the fertility of the dairy cows, with diameter lower than 13mm presented better results than those ≥ 13 mm. In addition, the follicles with diameter ≥ 13 mm formed the corpus luteum that produce higher amount of progesterone after the artificial insemination, what did not affected the gestation rate.

1. INTRODUÇÃO

A pecuária bovina (carne e leite) é uma atividade de fundamental importância na economia brasileira, tendo destacado e papel importante papel na geração de renda e empregos, bem como na balança do mercado internacional, por ser líder mundial no setor.

Há no Brasil uma grande diversidade quanto aos produtores na atividade leiteira, predominando aqueles com baixa escala de produção. Estes são caracterizados por terem animais de baixo potencial genético, baixo uso de insumos e tecnologia, em condição de subsistência ou de difícil acesso ao mercado formal. O número de produtores com rebanhos maiores e mais produtivos vêm apresentando significativo crescimento, em termos da participação na produção total de leite (Stock et al., 2007).

A renda da atividade leiteira é diretamente relacionada a uma boa eficiência reprodutiva do rebanho, devido ao efeito no nascimento de animais e na produção de leite. Baixa taxa de gestação pode resultar em efeito negativo no sucesso econômico da atividade (Santos et al., 2004).

O contínuo aumento da melhoria dos fatores de produção e da produtividade resulta da adoção de tecnologias nas propriedades. Deste modo, esse aumento da produtividade pode compensar a queda dos preços recebidos pelos produtores (Carvalho e Martins, 2007), o que, via de regra, desestimula a produção. Neste contexto, citam-se a incorporação de tecnologias como a inseminação artificial convencional (IA), a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), a produção *in vitro* (PIV) de embriões e a transferência de embriões (TE).

De acordo com Barros e Nogueira (2001), nesta última década foram desenvolvidos muitos protocolos hormonais para a melhor compreensão da fisiologia do crescimento folicular ovariano, juntamente com a necessidade de solucionar o problema de baixa taxa de serviço devido à ineficiência da identificação de estro. Dentre estes protocolos, alguns visam sincronizar a ovulação e manifestação do comportamento de estro com o uso de prostaglandinas ($PGF_{2\alpha}$) e outros hormônios. Posteriormente, Pursley et al. (1995) desenvolveram o protocolo Ovsynch, no qual a associação de GnRH e $PGF_{2\alpha}$ é utilizada, permitindo a inseminação artificial em tempo fixo (IATF).

Os protocolos para permitem que as fêmeas bovinas (vacas e novilhas) sejam inseminadas em um tempo (fixo ou pré-determinado) após a aplicação de determinados hormônios. A IA pode ser realizada durante o estro natural, no estro sincronizado após tratamento hormonal ou em tempo fixo após a aplicação de hormônios sem necessidade do estro ser observado (IATF), mas, neste caso, a ovulação tem que ser sincronizada.

O estro pode ser sincronizado pela $\text{PGF}_{2\alpha}$ em dois a sete dias ou pelos implantes de progestágenos. Entretanto, ambos não sincronizam a ovulação e, por este motivo, protocolos hormonais não são recomendados para IATF, somente com aplicação dos mesmos, já que os resultados não são bons (Ferreira, 2010). Para maior eficiência na IATF é necessário também sincronizar a ovulação, e isto acontece pelo estímulo do GnRH (custo mais elevado), que age diretamente na hipófise produzindo LH, ou o E2 (menor custo), que primeiro provoca descarga de GnRH no hipotálamo, para este então induzir o pico de LH responsável pela ovulação.

O sucesso limitado dos programas de IATF em vacas em lactação foi parcialmente relacionado aos estágios de desenvolvimento das ondas foliculares no momento da aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Macmillan et al., 2003). Além disto, vários estudos têm indicado a probabilidade da concepção estar relacionada com o diâmetro do folículo ovulatório (Vasconcelos et al., 1999; Lopes et al., 2007; Perry et al., 2007). No entanto, a IATF necessita de um manejo reprodutivo adequado orientado por um Médico Veterinário qualificado, para acompanhamento de todo o processo, proporcionando, assim, uma melhoria nos resultados e confiabilidade na adoção dessa tecnologia.

O presente estudo teve como objetivo estudar o efeito do tamanho (diâmetro) folicular no momento da aplicação do estradiol (E_2) na taxa de gestação, usando protocolo hormonal $\text{PGF}_{2\alpha}$ - E_2 - IATF em vacas mestiças ciclando.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Inseminação artificial em tempo fixo (IATF)

A pecuária tem apresentado ganhos satisfatórios desejáveis, o que se deve principalmente à seleção e à difusão do uso de reprodutores geneticamente superiores por meio da IA. Entretanto, nas últimas décadas houve um declínio na fertilidade de vacas leiteiras devido à função ovariana prejudicada (Lamming e Darwash, 1998; Royal et al., 2000), a qual tem sido associada ao maior ganho genético para produção de leite e o maior balanço energético negativo pós-parto resultante (Senatore et al., 1996). Uma das causas da menor eficiência reprodutiva em rebanhos de alta produção é a diminuição da expressão e detecção de estros (Lopez et al., 2004).

A sincronização de estro pode ser obtida com o uso de substâncias luteolíticas ($PGF_{2\alpha}$) ou seus análogos sintéticos (dinoprost, cloprostenol) para reduzir a fase luteal. Todavia, a eficiência deste tipo de sincronização depende da existência de um corpo lúteo (CL) responsivo ao tratamento, o que ocorre do 5º ao 16º dia do ciclo estral (CE), com eficiência máxima de sincronização após o 9º dia.

Em bovinos leiteiros, baixas taxas de concepção (abaixo de 35% em vários países) continuam sendo obtidas. Além disto, a eficiência reprodutiva dessas vacas pode ser influenciada por diversos outros fatores (Caraviello et al., 2006). Dentre eles a nutrição, a sanidade, o manejo, a administração de fármacos e a condição ovariana. Estes aspectos afetam direta ou indiretamente o sucesso dos programas de sincronização de ovulação para a IATF.

Cada onda folicular é caracterizada pela emergência simultânea de folículos maiores que 4mm de diâmetro, a partir de um pool de folículos menores. Um destes folículos cresce mais rapidamente do que os outros e torna-se dominante (FD), enquanto os demais sofrem atresia e regredem, sendo denominados folículos subordinados (FS). O FD normalmente atinge um tamanho máximo de 15mm e permanece dominante por poucos dias até ficar atrésico e regredir. A partir deste momento, será substituído por outro FD da nova onda folicular, aproximadamente cinco dias após. Quando a regressão luteal (lise do CL) ocorre durante a fase de crescimento ou início de dominância, o folículo livre do bloqueio imposto pela progesterona (P_4)

continua seu desenvolvimento até um tamanho pré-ovulatório ($\pm 20\text{mm}$), podendo ovular (Webb e Armstrong, 1998). Este é o motivo do estro aparecer entre dois a sete dias após a aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$, pois a maior ou menor rapidez na resposta vai depender da condição do folículo no momento da aplicação do hormônio luteolítico (Ferreira, 2010).

A variação de tempo para a manifestação do estro após a $\text{PGF}_{2\alpha}$ não depende do tempo de regressão do CL, mas sim do diâmetro folicular presente no ovário no momento da regressão do CL. Assim, quando o folículo for pequeno, o animal demora mais a manifestar estro, porque o folículo precisará de mais tempo para crescer e produzir uma quantidade de E_2 suficiente para provocar os sinais de estro (Wiltbank, 2000). Então, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo fato de não sincronizar o estro de maneira precisa, também não sincroniza o momento da ovulação. Este é o motivo de serem incluídos outros hormônios (GnRH ou E_2) posteriormente à $\text{PGF}_{2\alpha}$, para que a ovulação seja sincronizada, o que permitirá a realização da IATF (Driancourt, 2001). Entretanto, pode-se realizar a IATF após a injeção única de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em vacas com presença de CL, inseminando entre 72 a 80h (Rathbone et al., 2001).

O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) sincroniza a ovulação atuando indiretamente em folículos maiores que 10mm e a IATF é recomendada 12-16h após a aplicação do GnRH. Já após a aplicação do E_2 , a ovulação ocorre em $44,2 \pm 2,2\text{h}$ (Barros et al., 2000). Com esta finalidade, o GnRH é aplicado dois dias e o E_2 apenas um dia após a $\text{PGF}_{2\alpha}$. Esta diferença de um dia entre a aplicação de um e outro hormônio, se deve ao GnRH estimular diretamente o pico de LH, enquanto o E_2 primeiro estimula a secreção de GnRH, para este então induzir o pico de LH, o que certamente exige maior tempo (Ferreira, 2010).

Segundo Driancourt (2001), o GnRH estimula a secreção e a liberação de LH para fazer ovular folículos LH-dependentes, ou seja, aqueles maiores que 8mm de diâmetro. Entretanto, o E_2 quando aplicado na presença de folículo FSH-dependente pode aumentar a produção de inibina e esta, por feedback, reduzir a concentração de FSH, podendo provocar a regressão do folículo.

Um estudo com vacas em lactação na Nova Zelândia mostrou que um único tratamento com $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante o diestro, aumentou a taxa de concepção em relação ao grupo controle (69 % vs 60 %) (Macmillan et al., 2003; Santos et al., 2004). Santos et al. (2004) afirmam que o uso de protocolos hormonais que

induzem o estro quando o FD encontra-se com um menor diâmetro, um baixo nível de P4 resultante pode reduzir a taxa de concepção, talvez como resultado do aumento precoce deste FD e conseqüente perda embrionária.

A integração de todos os fatores que afetam a fertilidade tem sido estudada, com o objetivo comum de acabar com a necessidade de identificação de estro em animais tratados para IATF (Diskin et al., 2002; Thatcher et al., 2002).

Uma vez selecionado, o folículo acima de 8mm entra em uma fase de transição da dependência de hormônio folículo-estimulante (FSH) para hormônio luteinizante (LH) (Mihm et al., 2006). Deste modo, torna-se totalmente dependente dos pulsos deste hormônio para continuar crescendo e secretar E₂. Assim, havendo pulsos adequados de LH (cada uma a duas horas) o FD desenvolve-se e ocorre a ovulação, isto se não houver P4 para bloquear. Se os pulsos de LH são inadequados (cada três a quatro horas) durante a fase luteal do ciclo estral, o FD entra em atresia (Mihm e Austin, 2002).

A ovulação é precedida pela maior secreção do GnRH hipotalâmico que estimula a liberação do LH e FSH. A liberação do GnRH é em resposta ao feedback positivo da elevação da concentração do E₂ produzido pelos folículos (McDougall et al., 1995). Entretanto, a magnitude de liberação dos hormônios LH e FSH pela hipófise depende do estágio da onda folicular (Kastelic e Mapletoft, 1998).

Muitos estudos têm comparado protocolos de sincronização de ovulação e IATF em diferentes delineamentos experimentais e condições ambientais, com taxas de gestação variando entre 15 e 60% (Cartmill et al., 2001; Tenhagen et al., 2001; Dejarnette e Marshall 2003; Peters e Pursley, 2003; Kasimanickam et al., 2005; Pfeifer et al., 2005).

Ryan et al. (1998) descobriram que o desenvolvimento das ondas foliculares, continuaram inalteradas com a aplicação de GnRH antes que a dominância folicular fosse estabelecida. Mesmo na presença de um FD, os efeitos no mesmo e o intervalo para nova emergência de onda são dose-dependentes (Macmillan et al., 2003).

Vários trabalhos demonstram que o tratamento exógeno de análogos de GnRH pode induzir a ovulação em 10 a 100% de vacas no pós-parto (Peter et al., 2009). Mihm et al. (1998) concluíram que uma dose injetada de 250µg de GnRH como a gonadorelina pode sincronizar nova emergência de onda na

presença de um folículo dominante, mas doses de 25 ou 100µg foram menos efetivas. Estas respostas variadas têm sido comentadas por Diskin et al. (2002) como potencialmente limitantes à utilização do GnRH para sincronização dos padrões de desenvolvimento folicular, durante o diestro de muitas vacas.

Embora o GnRH possa provocar a liberação de um pico ovulatório de LH em caso de FD pequeno, este pode ter menor número de receptores para o mesmo, comparado com um folículo de tamanho normal LH dependente. O corpo lúteo formado pela ovulação induzida com este tipo de folículo talvez não seja funcionalmente normal (Ferreira, 2010).

Gimenes et al. (2008) afirmaram que a ovulação em protocolos hormonais pode ser induzida mais precocemente em doadoras *Bos indicus*, quando folículos estão em tamanho menor. Porém, em doadoras *Bos taurus* são necessários tratamentos que aumentem o tamanho do folículo para aumentar receptores de LH.

O tempo de ovulação em relação à IA é considerado um grande problema da sincronização do estro com PGF_{2α} (Smith et al., 1998 citado por Waldmann et al., 2006). O GnRH sincroniza a ovulação com precisão em 28 a 32h em folículos acima de 9mm, independente de haver ou não presença de CL. Portanto, a IATF (sem observar estro) é recomendada 12 a 16h após a aplicação de GnRH, de maneira que o espermatozóide tenha tempo de ser capacitado na tuba uterina (Ferreira, 2010). Pursley et al. (1998) obtiveram melhores resultados quando GnRH e inseminação ocorreram até 48h após aplicação de PGF_{2α}.

Não foram observados na literatura consultada, estudos mostrando se os melhores resultados observados com uso do GnRH são, por reduzir a variação no tempo de ovulação em relação à inseminação ou, o aumento da liberação do LH resultando no aumento da luteinização. Embora os padrões de desenvolvimento folicular possam ser alterados pela administração de GnRH ou estradiol, estas alterações podem não resultar em um estro ou ovulação sincronizados, os quais são imprescindíveis para se obter bons resultados com a IATF (Diskin et al., 2002).

Sabe-se que ao aplicar hormônio aleatoriamente em um grupo de fêmeas bovinas para sincronizar a ovulação, algumas terão folículos maiores, outras menores e algumas até mesmo ausentes, dependendo da fase do ciclo estral e

escore de condição corporal, e isto pode afetar a taxa de gestação (Ferreira, 2010).

O que se percebe atualmente na pecuária leiteira nacional, é o uso indiscriminado de hormônios e protocolos, às vezes sem nenhum acompanhamento técnico. Diante dos estudos apresentados, percebe-se que os resultados com o uso da IATF estão diretamente associados a fatores fisiológicos. Neste contexto, o acompanhamento dos animais tratados e o conhecimento da fisiologia, função ovariana e tamanho de folículo é extremamente importante para se obter melhores resultados, como mencionado anteriormente. Portanto, a ausência desse acompanhamento pode ser um fator que possui influência nos resultados, os quais não tem sido satisfatórios, não ultrapassando 50% de taxa de gestação, segundo vários trabalhos feitos no Brasil e revisados por Ferreira (2010). Esta baixa eficiência torna a IATF inviável devido ao alto custo dos protocolos e a grande quantidade de vezes que os animais são manejados para receberem os hormônios. Permanecendo este cenário, certamente com o tempo uma grande parcela de produtores atualmente usuários serão desestimulados a continuar utilizando a técnica.

2.2. Foliculogênese: hormônios envolvidos

O GnRH é produzido no hipotálamo, sendo responsável pela secreção e liberação de FSH e LH na hipófise. Uma descarga de GnRH induz um pico de LH necessário para ovulação. O GnRH é requerido para o desenvolvimento do folículo antral, mas não pré-antral (Fortune, 2003), e aumenta a secreção de LH para promover a ovulação ou luteinização de FD maiores que 10mm (Moore e Thatcher, 2006).

As gonadotrofinas (FSH e LH) são requeridas para o desenvolvimento de folículos antrais a partir de um certo tamanho, mas não para folículos menores (primordiais e pré-antrais) (Angelopoulos et al., 2005; Palermo, 2007). Segundo Fortune (2003) e Webb et al. (2008), em animais hipofisectomizados, o desenvolvimento folicular antral continua até um diâmetro aproximado de 3 a 4mm.

O FSH é secretado na hipófise anterior e tem funções de ativar e estimular o crescimento de folículos a partir de 3 a 4mm de diâmetro; provocar mitose de células da granulosa (CsG) e aumentar o processo de aromatização (estimulando a enzima P450 aromatase). Deste modo, aumenta a produção de

E_2 nas CsG a partir de andrógenos secretados pelas células da teca interna (CsTI). O FSH e LH são os principais hormônios reguladores de crescimento do folículo antral, embora fatores de crescimento intraovarianos como fatores de crescimento (IGFs) e BMPs interajam com as Gns no controle deste crescimento (Webb et al., 2007). Também fatores ambientais podem influenciar no desenvolvimento do folículo e na qualidade do ovócito, como a nutrição, incluindo a quantidade e a composição da dieta consumida anterior à ovulação.

Os folículos a partir de 3 a 4mm de diâmetro são dependentes de FSH-LH (Webb e Armstrong, 1998). O FSH não tem efeito no folículo pré-antral, embora haja evidência da presença de Rs-FSH em CsG no folículo primário de ruminantes (Fortune, 2003; Webb et al., 2008).

O requerimento obrigatório de FSH no crescimento de folículos a partir de certo tamanho, parece coincidir com o período de proliferação de CsG que leva à separação espacial das cels do cumulus e murais (Richards, 2001). O FSH ainda reduz a produção ou aumenta a proteólise de IGFBPs, impedindo que estas se liguem às IGFs para bloquear suas ações (Gordon, 1994). Adicionalmente, libera aquelas já ligadas para que possam agir, pois o IGF-I livre aumenta a resposta das CsG às Gns no FD, juntamente com E_2 (este, somente em bovinos). Além disto, o FSH e LH estimulam a aromatase para uma maior produção de E_2 (Beg e Ginther, 2006).

Gutierrez et al. (2000) relatam que o FSH estimula o crescimento do folículo em diâmetro, bem como a formação do antro, mas não aumenta o diâmetro do ovócito. Cada emergência de onda folicular (OF) é precedida de um transitório aumento na concentração de FSH (Webb et al., 2007).

O LH é produzido na hipófise anterior e folículos maiores que 8 a 9mm são mais dependentes do mesmo e, quando o FD atinge 9 a 10mm as CsG começam a expressar Rs-LH, podendo ter a ovulação induzida com aproximadamente 10 a 12mm (Moore e Thatcher, 2006). O LH tem importante função no processo de conversão do colesterol em andrógenos (P4, pregnenolona, androstenodiona e testosterona) nas CsTI, que, por sua vez, são convertidos em E_2 nas CsG, conforme Gordon (1994) e Senger (2003). O pico de LH induz ovulação e posteriormente luteinização das CsG e CsTI para formação do CL (luteogênese).

Segundo Ireland et al. (2000), os pulsos de LH são diferentes em frequência e amplitude durante as fases do CE, o que tem influência na atresia

do FD. Driancourt e Thuel (1998) citam que o LH atua também nas CsG de folículos maiores, estimulando a conversão de andrógenos em E_2 . Em bovinos, mRNA de Rs-LH foi detectado nas CsG em folículos maiores que 8mm, mas não em folículos menores que 8mm ou FSs, aumentando oito horas antes do início da divergência do FD. Porém, para expressão de Rs-FSH nenhuma diferença foi vista com relação a diferentes tamanhos de folículos (Beg e Ginther, 2006).

No folículo estrogênico inicial (3º dia da OF), são elevados os mRNA para Rs-FSH e aromatase nas CsG, enquanto as CsTI têm aumento de Rs-LH e 17 α -hidroxilase, enzima esta requerida para a produção de andrógeno, mas mRNA para Rs-LH estão ausentes nas CsG nesta fase (Moore e Thatcher, 2006). A expressão de Rs-LH é primeiramente detectada quando a TI é formada em torno das CsG (Webb et al., 2008).

Allen e Doisy (1923) foram os primeiros a citarem o E_2 . A expressão de Rs- E_2 nas CsG e CsTI do folículo é importante para as ações autócrina/parácrina de fatores ovarianos locais, bem como para as ações endócrinas de hormônios sistêmicos. Em bovinos, Rs-P4 e Rs- E_2 estão presentes nas CsG e CsTI, e a expressão para ambos está associada com o crescimento e o desenvolvimento folicular, sendo que Rs- E_2 foram localizados em CsG de pequenos (1 a 5mm), médios (6 a 9mm), e grandes folículos (maiores que 9mm) (Schams e Berisha, 2002; Beg e Ginther, 2006).

As ações intraovarianas do E_2 foram revisadas por Rosenfeld et al. (2001), que afirmam ter este hormônio grande influência na secreção de Gns (FSH e LH), via aumento da sensibilidade da hipófise ao GnRH, pelo aumento da expressão de genes para Rs-GnRH. Pelo contrário, a P4 reduz a expressão de genes e o número de Rs-GnRH na hipófise. Por este motivo, o aumento da sensibilidade da hipófise ao GnRH pode ocorrer mais como resultado do decréscimo de P4 do que pelo aumento de E_2 . Este inibe a secreção basal de FSH, mas estimula a secreção de LH. O efeito inibitório de E_2 na secreção de FSH parece ser mediado pela sua habilidade em suprimir a expressão de genes para ativina, produzida nos ovários, mas também na hipófise (Nett et al., 2002). O FSH parece estimular a proliferação celular, enquanto o E_2 parece aumentar o tamanho da célula (Fortune, 2003).

Folículos com 5 a 7mm de diâmetro tinham menos que 0,5ng/mL de E_2 no fluido folicular, comparado com 0,5 a 5ng/mL em folículos com 8 a 10mm, 5

a 20ng/mL com 10 a 13mm, 20 a 180ng/mL com 12 a 14mm e >180ng/mL acima de 14mm, segundo Schams e Berisha (2002) e Schams et al. (2002).

A Inibina, ativina e folistatina são três hormônios presentes no fluido folicular de bovinos, cujas ações regulatórias nos ovários são discutidas com detalhes por Knight e Glister (2001) e Glister et al. (2006).

A inibina é uma glicoproteína secretada no ovário pelas CsG, tendo ações autócrina e parácrina (Drion et al., 2000), tais como: a maior concentração de E₂ no folículo em crescimento estimula a produção de inibina que, por sua vez, reduz a produção de FSH (*feedback* negativo), por ação endócrina. Assim, ocorre diminuição na aromatização pelas CsG (ação autócrina), reduzindo a transformação de andrógenos em E₂ (Drion et al., 2000), o que provoca queda da concentração sérica de E₂ (Knight e Glister, 2001). A concentração de inibina é maior no FD que nos outros folículos e suprime a maturação do ovócito. Além disto, sensibiliza as CsTI à ação do LH para aumento da produção de andrógeno, efeito este reduzido pela ativina (Knight e Glister, 2001; Beg e Ginther, 2006), embora Fortune (2003) cite que a ativina potencializa a ação do LH na conversão de colesterol em andrógenos nas CsTI.

A ativina é secretada nos ovários pelas CsG, bem como na hipófise (Nett et al., 2002), e tem várias funções (Knight e Glister, 2001; Fortune, 2003): ela promove a proliferação de CsG, reduz a atresia e aumenta o diâmetro folicular a partir do folículo primário, e possui ação sinérgica com FSH (ação autócrina nas CsG) no estímulo da atividade aromatase para maior síntese de E₂.

Um brusco aumento de ativina foi verificado em folículos de 3 a 6mm em bovinos (Beg e Guinther, 2006).

A folistatina é um polipeptídeo secretado nos ovários pelas CsG e também na hipófise (Nett et al., 2002) sob estímulo da ativina, reduzindo a secreção e o efeito deste hormônio por mecanismo "*feedback*", ao qual se liga neutralizando seu efeito biológico. Com a elevação do E₂ ocorre aumento da inibina e redução da ativina, mostrando uma relação oposta entre estes hormônios. De maneira semelhante à inibina, a folistatina suprime a secreção de FSH por seqüestrar ativina (Knight e Glister, 2001).

2.2.1 Relação entre FSH, LH, ativina, folistatina e inibina na foliculogênese

Entre as diversas camadas que constituem a parede do folículo, apenas as duas mais internas são consideradas esteroidogênicas: a teca interna (TI) e a granulosa (G). Existem receptores nas CsTI e CsG que controlam a ação das Gns hipofisárias, ficando as ações do FSH restritas às CsG, enquanto o LH possui Rs nos dois tipos de cels foliculares (CsTI e CsG), bem como nas cels intericiais e do CL (Webb et al., 2004).

O FSH estimula a atividade do complexo aromatase nas CsG para produzir E₂ a partir de andrógenos, os quais são produzidos pelas CsTI a partir do colesterol sob estímulo do LH que ativa 17 α -hidroxilase (Fortune et al., 2004). IGF-I e insulina interagem com FSH para estimular as CsG a produzir E₂, mostrando a importância do BEP na foliculogênese.

A biossíntese e a liberação de FSH são estimuladas pela ativina, mas inibidas pela folistatina e inibina, sendo que esta, cuja secreção é estimulada pela alta concentração de E₂ no folículo grande, chega ao hipotálamo via circulação sanguínea e suprime a produção de FSH na hipófise em quatro a seis horas. Inibina e ativina são funcionalmente opostas, enquanto a folistatina inibe a ação da ativina, mas não de inibina (Padmanabhan e McNeilly, 2001).

A fase dependente de Gns tem início em folículos de 3 a 4mm em bovinos (Driancourt e Thuel, 1998), e somente 1,4% dos ovócitos originados de folículos menores que 1mm de diâmetro têm habilidade para atingir metáfase II. Esta proporção é dez vezes maior (14%) quando os ovócitos são obtidos de folículos de 1 a 3mm de diâmetro.

2.3. Folículo dominante

O folículo dominante (FD) impede o crescimento de outros folículos durante o CE. Na emergência de uma onda folicular (OF), um dos folículos é selecionado, torna-se dominante e continua a crescer, enquanto os demais sofrem atresia. O FD é selecionado 1,5 a 2 dias (36 a 48h) após o início da OF. O aparecimento de Rs-LH nas CsG é um pré-requisito para o estabelecimento do FD, permitindo que o folículo mude sua dependência de FSH para LH (Ferreira, 2010).

Em bovinos, o maior folículo no momento de detecção da OF torna-se o FD em 60% dos casos, e, no início da divergência, o maior folículo é aproximadamente 8,5mm e o segundo maior \pm 7,2mm, com o FD apresentando

cerca de 16mm de diâmetro um dia antes da ovulação (Beg e Ginther, 2006). O FD atinge diâmetro máximo de 10 a 20mm, e o maior folículo subordinado (FS) o máximo 8mm (Evans, 2003), e havendo ablação do maior folículo no início da divergência na OF, e o segundo maior folículo torna-se dominante.

O FD diverge dois dias após o aparecimento da OF e apresenta mais Rs-FSH, aumento da atividade aromatase, da produção de E_2 e de Rs-LH nas CsG (Gordon, 1994).

O tempo de vida normal do FD é aproximadamente nove dias. Contudo, se estendido, pode afetar a qualidade do ovócito ou o ambiente uterino, motivo pelo qual a fertilidade é citada como maior quando a IA ou acasalamento é feito no estro precedido de CE com três OFs, comparado com duas OFs.

2.3.1. Particularidades do folículo dominante

O FD alcança diâmetro máximo de 15mm (HPB) e atresia quando a concentração de P4 está alta, sendo então substituído por um novo FD em \pm cinco dias. Adicionalmente, pode ovular em resposta a 1.500 UI de hCG. A ovulação foi induzida em 75 a 80% das novilhas que receberam 500 μ g de GnRH sintético no 6^o dia do CE (Webb e Armstrong, 1998).

Secreta um fator (es) que tem efeito inibitório direto no desenvolvimento dos FSs, ou produz GDIF (fator inibidor de CsG) que inibe a proliferação de pequenos e médios folículos (Baker e Spears, 1999). Portanto, está consistentemente associado com a redução no número e crescimento dos FSs em ambos os ovários.

O FD tem mais Rs-LH nas CsG e CsTI, além de dez vezes mais E_2 (maior capacidade de produzir E_2) que os FSs. A maior concentração de E_2 do FD aumenta a secreção de inibina, que, por sua vez, reduz FSH, bloqueando o crescimento dos FSs, enquanto o FD pode usar LH para continuar a crescer (Webb et al., 2003). Somando a estes aspectos, o FD tem mais Rs-FSH e por isto é mais sensível a este hormônio, podendo competir mais efetivamente para Gns com os FSs. Desta forma, não havendo FSH suficiente para todos os folículos, vai ocorrer atresia dos FSs. Além disto, produz fatores que aumentam sua resposta às Gns, provavelmente mais Rs-LH e Rs-FSH (Hagemann, 1999).

O CL aumenta a concentração de P4 reduzindo em 50% a frequência dos pulsos de LH, provocando atresia do FD e início de nova OF (FD é bem mais sensível ao LH do que FSs).

Uma vez selecionado, o FD torna-se totalmente dependente dos pulsos de LH para continuar crescendo e secretar E₂. Havendo pulsos adequados de LH (um a cada duas horas) o FD cresce e ovula, isto se não houver P4 para bloquear, mas se os pulsos de LH são inadequados (um a cada três a quatro horas) durante a fase luteal do CE, o FD atresia de maneira similar aos FSs (Mihm e Austin, 2002).

Na fase estática do FD, ocorre queda da concentração de E₂ (Noseir, 2003). Portanto, o maior tempo de dominância do mesmo pode reduzir a taxa de gestação em zero, 10 a 15% e 20 a 50% respectivamente para períodos de dominância de dois a quatro, quatro a oito e acima de dez dias (Roche et al., 1999). Além disto, o FD além do limiar de 8mm é associado com uma transição de dependência de FSH para LH. As CsG do FD aumentam a habilidade para ligarem ao LH, comparada com as dos FSs e têm uma maior expressão do mRNA para RsLH (Evans et al., 2004; Mihm et al., 2006).

Segundo Ireland et al. (2000), a diferença na freqüência e amplitude dos pulsos de LH durante as fases do CE afetam a dominância do FD. Assim, é necessária uma alta freqüência de pulsos de LH para manter a dominância, enquanto a redução nesta freqüência deflagra a perda de dominância. Nível elevado de P4 reduz a freqüência de pulsos de LH, enquanto o menor nível de P4 aumenta, ocorrendo o contrário com o E₂ (Wiltbank e Haughian, 2003).

Sem aumento na freqüência de pulsos de LH ocorre atresia funcional do FD, com redução do E₂ e conseqüente redução de inibina, o que vai permitir uma maior secreção de FSH suficiente para iniciar nova OF (Moore e Thatcher, 2006). Com nível baixo de P4 após luteólise, o *feedback* negativo com GnRH é reduzido e aumenta a freqüência dos pulsos de LH, levando ao crescimento final do folículo. Deste modo, com aproximadamente 17 a 20mm torna-se totalmente estrogênico e capaz de induzir um pico pré-ovulatório de LH, que desencadeia a ovulação.

2.4. Maturação do ovócito

A maturação do ovócito envolve mudanças nucleares, citoplasmáticas e moleculares que conferem ao mesmo a capacidade de desenvolver até blastocisto. Ampla revisão sobre estes mecanismos foram publicados por Van Den Hurk e Zhao (2003) e Dode (2006). O fator mais importante para determinar o destino final do ovócito é a sua competência para o

desenvolvimento, mas o momento em que esta competência é estabelecida e o mecanismo responsável pela mesma, ainda não são conhecidos. A competência é determinada pela composição e quantidade de transcritos que são estocados durante o crescimento e fase final da foliculogênese. Portanto, a diferença entre ovócitos competentes e incompetentes deve-se à expressão diferenciada de genes (Dode, 2006).

A principal função do ovário é liberar um ovócito fértil. A fase de maturação é mais relacionada ao ovócito (Hanzen et al., 2000) e corresponde a modificações citológicas e metabólicas que permitem ao ovócito adquirir a condição de ser reconhecido e penetrado pelo espermatozóide. Além disto, assegurar a formação de pró-núcleos masculino e feminino, armazenar suas reservas (mRNA, ribossomais, proteínas elaboradas durante crescimento) e iniciar o desenvolvimento embrionário.

Na maturação do ovócito estão envolvidos FSH, LH, insulina e/ou IGF-I endógena (Richards, 2001). A ativação de Rs-LH nas CsG após liberação de LH permite ao ovócito reiniciar a meiose (maturação nuclear que dura 24h na vaca) e maturação citoplasmática (Ferreira, 2010).

2.4.1. Relação do diâmetro folicular com a maturação ovocitária

O diâmetro médio do folículo em que o ovócito adquire habilidade para a maturação nuclear (hábeis para reiniciar a meiose e atingir metáfase II) é aproximadamente 2 a 3mm de diâmetro, e para completar a maturação citoplasmática acima de 6mm. Assim, o ovócito adquire habilidade para ser fertilizado e desenvolver-se até o estágio de blastocisto. Armstrong et al. (2003) hipotetizam para bovinos que as mudanças induzidas nutricionalmente nas concentrações sanguíneas de IGF-I são ótimas para o crescimento folicular, mas não necessariamente para a maturação do ovócito.

Segundo Dode (2006), durante a foliculogênese, o ovócito cresce até cerca de 100 μ m, o que corresponde a um diâmetro folicular de 3mm. De 3 a 8mm, o diâmetro do ovócito não muda, a transcrição é praticamente inativada e seu crescimento está completo. No folículo entre oito a 15mm, período que corresponde à dominância folicular, o ovócito sofre mudanças significativas, que se completam antes do pico pré-ovulatório de LH. Estas mudanças são chamadas de capacitação ou pré-maturação, tendo papel fundamental na aquisição de competência.

Os ovócitos coletados *in vivo* (OPU-FIV) são normalmente obtidos de folículos de 3 a 8mm, que são menos competentes do que os folículos acima de 8mm. Alta percentagem de morte embrionária pode ter como causa a qualidade inferior do ovócito.

De acordo com vários artigos revisados por Lequarre et al. (2005), conclui-se que ovócitos derivados de folículos com diâmetro maiores que 6mm, têm maior competência para desenvolverem-se até blastocisto do que ovócitos de folículos menores que 4mm. Porém, no ovócito, nenhum dos parâmetros investigados como metabolismo energético, perfil de expressão gênica, padrão de neossíntese de proteínas e cinética de reinício da meiose, foram diferentes entre os diversos tamanhos de folículos estudados.

2.5. Esteróides e ovulação

A ovulação é induzida pelo pico de LH que ocorre durante o estro, como resultado de descarga de GnRH provocada pela alta concentração de E₂ secretado pelo folículo de Graaf ou maduro no início do estro. Noseir (2003) afirma que <5,0ng/mL de E₂ não provoca ovulação.

Os esteróides, incluídos aqueles de origem ovariana como P4 e E₂, não são usualmente classificados como mediadores de reações inflamatórias. Contudo, sabe-se que a atividade esteroidogênica ovariana muda acentuadamente durante a ovulação, cujo processo é considerado semelhante a uma reação inflamatória.

A P4 é importante para a ovulação, pois facilita a degradação proteolítica e a ação de leucócitos. A luteinização do tecido folicular inicia-se antes mesmo do rompimento folicular, ou seja, na última parte do processo ovulatório (Espey, 1994). Sendo assim, a ruptura do folículo não é pré-requisito para a luteinização, como ocorre na formação do cisto luteinizado. Desta maneira, o LH inicia a luteinização com ou sem rompimento do folículo. Relata-se, entretanto, uma menor produção de P4 pelas células luteinizadas de um folículo não rompido, em comparação ao de um folículo rompido em porcas (Westfahl, 1993), o que sugere menor concentração de P4 no cisto luteinizado em relação ao CL.

Em vacas leiteiras, o folículo geralmente ovula após atingir um diâmetro máximo de 13 a 20mm, em 24 a 48h após o pico de LH, sendo este responsável pela diferenciação das células foliculares, resultando na mudança

da produção de E_2 (folículo pré-ovulatório) para P4 (Juengel e Niswender, 1999). O pico de LH também ativa uma reação inflamatória, desenvolvendo hiperemia e degradação de colágeno, os quais são mediados pelo aumento na produção de PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$, respectivamente. Assim, adelgaçam e rompem a parede folicular (Espey, 1980).

2.5.1. Controle vascular da ovulação

A ovulação ocorre como resultado da interação dinâmica entre o pico de LH e fatores locais, incluindo esteróides, PGs e peptídeos, com o LH promovendo mudanças estruturais e bioquímicas na parede folicular. Deste modo, levam ao rompimento da mesma, resultando na expulsão do ovócito e subsequente desenvolvimento do CL. O LH induz hiperemia e, embora este mecanismo não seja totalmente esclarecido, provavelmente é mediado por peptídeos vaso ativos (Kobayashi et al., 2002; Acosta et al., 2003).

O aumento do E_2 coincide com o aumento na vascularização da parede folicular. A injeção de GnRH aumenta simultaneamente o fluxo sanguíneo folicular e as concentrações plasmáticas de LH e E_2 , o que pode resultar em maior produção de esteróides e substâncias vaso ativas. O E_2 causa rápida dilatação dos vasos sanguíneos por ativar a síntese endotelial de óxido nítrico (Acosta e Miyamoto, 2004). O maior fluxo de sangue nas células da parede do folículo pré-ovulatório pode aumentar o suprimento de Gns, nutrientes, substratos hormonais e outros componentes necessários para a ovulação (Ferreira, 2010).

2.6. Formação do corpo lúteo (luteogênese)

O corpo lúteo nas fêmeas bovinas é a principal fonte de progesterona circulante. Além disto, a função luteal é responsável pela duração e regularidade dos ciclos estrais, número de ondas de crescimento folicular, controle da ocorrência de ovulações e manutenção da gestação (Schams, 1996). O corpo lúteo é uma glândula endócrina temporária que funciona durante o diestro nos animais com AOLC ou durante a gestação (González, 2002b). O controle de sua função envolve interações endócrinas dentro do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, participação de fatores moduladores com ação parácrina e autócrina, e a produção de $PGF_{2\alpha}$ endometrial (Schams, 1996).

2.6.1. Alterações morfológicas

O processo de luteinização envolve a transformação de um folículo pré-ovulatório em uma estrutura altamente vascularizada e capaz de secretar grandes quantidades de progesterona (Smith et al., 1994). Este processo envolve extenso remodelamento tecidual semelhante ao observado nos processos cicatriciais e em neoplasias, caracterizado por hiperplasia, hipertrofia e migração celular. Além disto, intensa angiogênese, com migração e proliferação de células endoteliais e desenvolvimento de rede capilar (Luck e Zhao, 1995). A preparação para a formação do tecido luteal e produção de progesterona se inicia antes da ovulação e independe desta. Folículos terciários e cistos foliculares podem sofrer luteinização sem que ocorra ruptura de sua parede (Westfahl, 1993). O processo final de maturação folicular é importante para o posterior desenvolvimento do corpo lúteo (Parkinson et al., 1994).

Após a descarga de LH, as células foliculares passam por modificações morfológicas, endócrinas e bioquímicas associadas à luteinização (Smith et al., 1994). A congestão e isquemia alternada provocam rompimento de vasos, dando início à angiogênese.

Após a ovulação, ocorre o colapso do folículo ovulatório e a invasão de fibroblastos, células endoteliais e CsTI. O rompimento de capilares da teca resulta em hemorragia, com formação do coágulo (corpo hemorrágico), que serve de matriz para proliferação das células da parede folicular. A angiogênese resulta no estabelecimento de rede microvascular no CL em desenvolvimento. A formação desta rede ocorre sob estímulo de vários fatores angiogênicos que estimulam a proliferação e migração das células endoteliais (Espey, 1994; Schams, 1996).

O CL em desenvolvimento pode ser identificado de um a cinco dias após a ovulação, dependendo da técnica utilizada e da raça das fêmeas avaliadas (Tom et al., 1998; Viana et al., 1998b). O volume de tecido luteal aumenta progressivamente até em torno do 7º dia do CE, permanecendo relativamente estável ao longo do diestro (Kastelic et al., 1990; Viana et al., 1998b). O crescimento do CL reflete o processo de hipertrofia das células luteais grandes e hiperplasia das células luteais pequenas, responsáveis, respectivamente, por 40% e 20% do volume total do corpo lúteo (Wiltbank, 1994). Cavidades luteais são normalmente observadas em 37 a 77% dos CLs (Viana et al., 1998a), os

quais, podem ser originadas de uma ocupação incompleta da cavidade folicular pelas células em processo de luteinização (Tom et al., 1998).

2.6.2. Alterações bioquímicas e endócrinas

A onda pré-ovulatória de LH induz alterações na expressão e regulação das enzimas envolvidas na esteroidogênese (Espey, 1994). A expressão e atividade das enzimas relacionadas à conversão do colesterol em progesterona aumentam, inclusive nas células originadas da granulosa.

A concentração plasmática de P4 é normalmente baixa durante o estro (abaixo de 1ng/mL), mas aumenta progressivamente, refletindo as alterações na esteroidogênese luteal. O pico na produção de P4 ocorre na metade do período do diestro (Parkinson et al., 1994; Figueiredo et al., 1997). Como o volume do CL atinge seu valor máximo antes da concentração máxima de P4, a variação na produção desta, pode ser observada após o 7º dia do ciclo. Deste modo, a concentração de P4 parece ser decorrente da maturação funcional do CL e não do aumento na massa de tecido luteal (Viana et al., 1998b). A concentração sérica de P4 plasmática é virtualmente indetectável logo depois da ovulação, mas aumenta gradualmente a partir do 3º dia do ciclo, mantendo-se elevada durante 12 dias (González, 2002b).

2.6.3. Características morfológicas do corpo lúteo

O CL é constituído por um conjunto de células heterogêneas com características morfológicas, endócrinas e bioquímicas distintas. Duas populações de células podem ser caracterizadas em bovinos, com capacidade esteroidogênica (parenquimais), que são as células luteais grandes e pequenas (Parkinson et al., 1994). Estas células derivam, respectivamente, das células das camadas foliculares da granulosa e da teca (Smith et al., 1994).

As células luteais grandes são esféricas, com 22 a 50µm de diâmetro, e apresentam grande quantidade de organelas e grânulos secretórios (ocitocina). Além disto, estão relacionadas à alta capacidade esteroidogênica e síntese de proteínas. Elas são responsáveis pela maior parte (80%) da produção basal de P4, porém apresentam poucos receptores e baixa resposta à estimulação pelo LH (Parkinson et al., 1994; Wiltbank, 1994). Estas células são também responsáveis pela secreção de ocitocina (OXT) e constituem o sítio primário de

resposta à $\text{PGF}_{2\alpha}$ e ao E_2 (Wiltbank et al., 1995b), representando 40% do volume do CL, mas apenas 10% do total das células.

As células luteais pequenas têm 12 a 22 μm de diâmetro, participam pouco na produção basal de P4, mas apresentam um maior número de receptores e respondem rapidamente à estimulação pelo LH, com aumento na produção de progesterona, representando 20% do volume do corpo lúteo e 25% do total de células (Niswender et al., 1994; Wiltbank, 1994).

As células luteais grandes e pequenas atuam de maneira sinérgica na produção de P4 e podem interagir com as células não esteroidogênicas, por meio da produção local de hormônios, fatores de crescimento e citocinas, no controle do crescimento e função luteal (Wiltbank et al., 1995b).

2.6.4. Produção de progesterona

Os ovários da vaca são a principal fonte de P4 encontrada no sangue periférico. Após o período de luteogênese, a presença de um CL funcional determina a manutenção de valores plasmáticos de P4 elevados durante todo o diestro, até a ocorrência da luteólise natural, quando a P4 retorna à concentrações basais (Niswender et al., 1994). Nesta fase luteal (4–17 dias), o CL secreta significativa quantidade de P4, que geralmente excede a concentração de 1ng/mL no dia quatro do ciclo (Wiltbank e Niswender, 1992; Gutierrez et al., 1994; Youngquist, 1997; Mapletoft et al., 2000; Wiltbank et al., 2000).

Tanto as células luteais pequenas quanto as grandes atuam na produção de P4 (Kappel et al., 1984). O LH estimula a função esteroidogênica, particularmente nas células luteais pequenas, resultando em aumento na produção de P4 (Wiltbank, 1994). Entretanto, parte da produção de P4 independe do estímulo pelo LH, principalmente nas células luteais grandes, responsáveis pela maior parte da esteroidogênese basal. Adicionalmente, outros fatores estão envolvidos na regulação da produção de P4, como a OXT, PGE_2 , insulina, fatores de crescimento e GH (Del Vecchio et al., 1996).

O balanço energético negativo reduz a frequência dos pulsos de LH e a produção de P4 (Ferguson, 1996), mas não a duração da fase luteal em vacas e novilhas de raças leiteiras (Villa-Godoy et al., 1988). A redução na produção de progesterona pode afetar a regularidade dos ciclos estrais, a concepção e a manutenção da gestação (Ferguson, 1996).

2.6.5. Corpo lúteo, progesterona e desenvolvimento embrionário inicial

O principal produto secretado pelo CL é a progesterona (P4). O LH estimula a secreção de P4 pelas cels luteais via seus Rs específicos, e a maior ou menor quantidade de P4 secretada depende do fluxo sanguíneo e da capacidade esteroidogênica das cels luteais. Durante a luteólise, o decréscimo em P4 resulta da redução de fluxo sanguíneo e perda de Rs-LH nas células luteais (Ferreira, 2010).

A concentração de P4 na fase luteal inicial é mais importante para o desenvolvimento do embrião do que a sua concentração final. Portanto, a insuficiente função luteal (menor produção de P4) para manter o desenvolvimento normal do embrião é reconhecida como importante problema reprodutivo (Mann et al., 1999).

A P4, aumentando mais precocemente na fase luteal, age via Rs-P4 uterinos, incrementando o padrão de secreção no órgão, que fornece o suporte histiotrópico para o desenvolvimento do embrião, melhorando assim a taxa de desenvolvimento deste. O embrião, então, produz suficiente quantidade de interferon-tau (IFN-t) para bloquear a ação da OXT no útero ao redor do 16º dia, impedindo o início da luteólise. Existe grande relação entre tamanho e qualidade do embrião, bem como P4 nos dias quatro e cinco pós-acasalamento, com a secreção de IFN-t pelo embrião durante o período de reconhecimento materno da gestação (Ferreira, 2010).

A progesterona é importante no controle do mecanismo de luteólise, por inibir o desenvolvimento de receptores endometriais para a ocitocina (Vallet e Lamming, 1991; Lau et al., 1992).

Em vacas com baixa concentração de progesterona, esta inibição é menos efetiva (Lamming e Mann, 1993) e o mecanismo luteolítico desenvolve-se antecipadamente, proporcionando menor tempo para o embrião produzir suficiente quantidade de interferon trofoblástico capaz de bloquear a luteólise.

Uma ligação sub-ótima entre concepto e células epiteliais endometriais leva à secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$, luteólise, cessação da gestação e reinício do CE. A P4 é essencial para o útero secretar os nutrientes para o embrião em sua fase precoce. Exposição à P4 restabelece o depósito de fosfolípidos endometriais necessários para uma posterior síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Com prolongada exposição à P4, existe uma auto regulação de Rs-P4 no endométrio, semelhante à regulação de Rs- E_2 endometriais que são

importantes para indução de Rs-OXT. P4 inibe luteólise por diminuir a sensibilidade da OXT para ligar-se a seus Rs. Todavia, o mais importante efeito da P4 no bloqueio à luteólise é via aumento do desenvolvimento do concepto, que por sua vez estimula maior secreção de interferon-tau (Robinson et al., 2008).

No endométrio, a P4 induz a diferenciação das células do estroma, estimula a secreção glandular, promove o acúmulo de vacúolos basais no epitélio glandular (Maslar et al., 1986), altera o padrão de secreção de proteínas das células endometriais e induz ao relaxamento do miométrio (Niswender et al., 1994).

Em dois estudos, foram utilizadas suplementação de P4 através do CIDR no dia 4 ou no dia 28 pós-IA em vacas sincronizadas com $\text{PGF}_{2\alpha}$, e observaram aumento na taxa de gestação de 35% (22/63) para 48% (32/67) (Larson et al., 2007; Bech-Sàbat et al., 2009).

A exposição contínua do útero à P4 induz a expressão de proteínas nas glândulas endometriais, que são secretadas para o lúmen uterino (Spencer et al., 2004). Os dois mais bem caracterizados produtos secretados pelas glândulas endometriais são a UTPM (proteína do leite uterino) e osteopontina (OPN). Secreções do endométrio (histotrofos) têm grande influência na sobrevivência do concepto antes do estabelecimento do contato celular materno-embrião.

2.7. Prostaglandina

Embora as prostaglandinas sejam freqüentemente comparadas aos hormônios, as mesmas diferem destes, pois são formadas em quase todos os tecidos. Porém, não em glândulas especializadas e, geralmente, agem localmente em vez de serem transportadas pelo sangue até a célula-alvo (Booth e McDonald, 1992).

A prostaglandina ativa chega aos ovários pelo mecanismo de contra-corrente, o qual transfere a prostaglandina da veia uterovariana para a artéria ovariana, evitando que o hormônio seja inativado. Em condições normais, as prostaglandinas têm uma meia-vida e uma concentração no sangue muito baixas devido à sua grande sensibilidade à oxidação que ocorre no pulmão (Gonçalves et al., 2002).

As prostaglandinas são ácidos graxos sintetizados no próprio organismo animal a partir de fosfolípidios de membrana celular que, ao sofrerem a ação da fosfolipase A2, produzem o ácido araquidônico. Este é precursor das prostaglandinas mais intimamente associadas com os processos reprodutivos, principalmente, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGE_2 (González, 2002a). O ácido araquidônico, pela ação da cicloxigenase é convertido em PGG_2 , a qual é convertida em PGH_2 , PGE_2 e finalmente em $\text{PGF}_{2\alpha}$. As prostaglandinas G_2 e H_2 são na realidade os metabólitos intermediários entre o ácido araquidônico e as prostaglandinas primárias, compostos de vida muito curta, que rapidamente se transformam em prostaglandinas primárias (Dominguez et al., 1989).

A alta afinidade de receptores para a $\text{PGF}_{2\alpha}$ ocorre principalmente nas células luteais grandes (Wiltbank e Niswender, 1992). As células luteais pequenas secretam grandes quantidades de P4 quando estimuladas pelo LH (efeito luteotrópico). Porém, as células luteais grandes, responsáveis pela maior parte da P4 basal, sofrem inibição da síntese de P4 por ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ (efeito luteolítico) (Milvae et al., 1996).

Segundo González (2002a), o papel do sistema imune no processo da luteólise ainda não está suficientemente esclarecido, sendo objeto de estudo atualmente. Em geral, é aceito que a morte das células luteais pode acontecer por dois mecanismos: *apoptose* ou *necrose*. A primeira refere-se a um processo fisiológico, enquanto que a segunda refere-se à morte celular patológica. No CL, o fator desencadeante seria a diminuição da secreção de P4 e/ou a presença de citoquininas.

Um dos primeiros mecanismos sugeridos para ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi de redução do sangue e subsequente hipóxia do tecido luteal causando regressão do corpo lúteo (Wiltbank e Niswender, 1992). Este mecanismo tanto pode ser devido à degeneração dos capilares luteais, como à provável vasoconstrição que a prostaglandina poderia causar (González, 2002b). O mais provável efeito das prostaglandinas capaz de explicar a luteólise é a inibição da utilização de lipoproteínas (González, 2002b).

Aplicando $\text{PGF}_{2\alpha}$ em vacas ou novilhas ciclando e com CL funcional no ovário, mas cujos estros não foram observados, o nível sanguíneo de progesterona (P4) cai em seis a 12 horas. Assim, o estro ocorre entre 48 a 72h (dois a três dias), ou em até sete dias após (Ferreira, 2010).

A $\text{PGF}_{2\alpha}$ não sincroniza estro em vacas com anestro provocados por subnutrição, pois a sincronização somente pode ser efetiva em fêmeas bovinas que apresentam AOLC, ou seja, que tenham CL para ser lisado. Portanto, o sucesso da indução do estro com $\text{PGF}_{2\alpha}$ depende da presença de um CL funcional (Répasi et al., 2003; Ferreira, 2010). Waldmann et al. (2006) observaram que o anestro foi o principal fator limitante na eficácia da sincronização com $\text{PGF}_{2\alpha}$, os quais obtiveram taxa de gestação de 53,8% em 108 vacas.

Wiltbank et al. (1995a) verificaram em novilhas e vacas em lactação que a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ antes do 5º dia do CE não funciona, embora haja presença de receptores, e que novilhas respondem mais cedo no ciclo que vacas. Costa et al. (2000) concluíram que o CL de fêmeas zebuínas é responsivo à $\text{PGF}_{2\alpha}$ exógena nos primeiros dias do diestro (6º, 7º, 8º e 9º dia), pois, a partir do 6º dia, já existe um número mínimo de receptores necessários para ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ em animais zebuínos.

Henricus et al. (1974) estudaram o efeito da $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante o CE de bovinos (3-5, 9-10, 16-17 dias) e verificaram que o estro ocorreu em todos os animais dentro de dois a cinco dias, exceto naqueles tratados nos dias três a quatro do CE, em que não houve resposta. Posteriormente, Fuquay (1983) testou a eficiência da $\text{PGF}_{2\alpha}$ no CL precoce (seis a 11 dias) e maduro (11-16 dias) de 250 vacas, constatando que 149 (59,7%) com CL precoce e 101 (94,1%) com CL maduro apresentaram estro.

Watts e Fuquay (1985) consideraram como jovem o CL de seis a dez dias do CE e velho de 11 a 16 dias. Estes autores aplicaram $\text{PGF}_{2\alpha}$ em novilhas nestes períodos e observaram que a idade do CL limita a resposta à $\text{PGF}_{2\alpha}$, pois 96,6% e 59,3% dos animais respectivamente, responderam com CL velho e CL jovem. Watts e Fuquay (1982) aplicaram PGF em dias alternados do CE e obtiveram taxas de estros observados de 63% entre cinco a sete dias; 83,6% de oito a 11 dias e 100% de 12 a 15 dias, confirmando a menor resposta à $\text{PGF}_{2\alpha}$ no CL em sua fase inicial.

Colazo et al. (2002) relatam que a ovulação ocorreu em 50% (9/18) das vacas que receberam 125mg e 94,4% (17/18) das que receberam 500mg de cloprostenol no 7º dia do CE. Com 100 ou 125mg de cloprostenol, 22 em 26 (84,6%) ovularam; enquanto 24/24 (100%) ovularam com 500mg. Os autores concluíram que, além da resposta à $\text{PGF}_{2\alpha}$ na fase inicial da CE ser menor, as

doses reduzidas deste hormônio também contribuem para uma menor resposta.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Localização e período experimental

O experimento foi conduzido na Universidade Federal de Viçosa – Campus de Florestal – Minas Gerais, coordenadas 19° 53' 12" Sul e 44° 25' 56".

O experimento teve início no mês de abril de 2011 e estendeu-se até o mês de janeiro de 2012. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética do Departamento de Medicina Veterinária, sendo aprovado em 05 de Março de 2011.

3.2. Animais

No presente experimento, foram utilizadas 47 vacas mestiças *Bos taurus* x *indicus* em lactação, apresentando atividade ovariana luteal cíclica e com escore de condição corporal $\geq 3,0$ baseado nos critérios utilizados por Ferreira (1991). Foram mantidas em regime de pastejo (*Brachiaria decumbens*), com suplementação mineral no período das águas e silagem de milho no período da seca, além de concentrado e água oferecida *ad libitum* nos dois períodos.

3.3. Delineamento experimental

Inicialmente, o estado cíclico de cada animal foi determinado por meio de exame ultrassonográfico transretal (CHISON D600 VET, transdutor linear multifrequencial, ajustado para 7,0 MHz) para identificação das estruturas ovarianas e por meio de duas coletas de sangue para determinação de concentração sérica de progesterona pelo método de Radioimunoensaio, com intervalos de oito dias entre as coletas (figura 1). Foram utilizados somente animais que não apresentaram patologias nos órgãos genitais.

As vacas foram submetidas a exame ultrassonográfico pela via transretal, para mensuração do diâmetro do maior folículo presente, 24 horas antes de receberem a primeira aplicação hormonal de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Após confirmada a ciclicidade e detectada a presença de um corpo lúteo por meio da palpação, outra coleta de sangue foi realizada para análise de concentração sérica de progesterona, em seguida as vacas receberam a primeira aplicação hormonal pela manhã, com dois mL (150 μg) de análogo sintético de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (D+cloprostenol, Veteglan[®] Luteolítico, Hertape Calier), via intramuscular (i.m.). Logo em seguida, foram novamente submetidas a exame

ultrassonográfico pela via transretal, para mensuração do diâmetro folicular dominante e confirmação de que o mesmo não estava em atresia. Quando o diâmetro do mesmo era inferior ao da primeira avaliação ultrassonográfica, as vacas não recebiam a aplicação hormonal, e aguardava-se um período aproximado de seis dias para um novo acompanhamento da dinâmica folicular.

Após 24h da aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$, as vacas receberam um tratamento pela manhã com dois mL (2mg) de estradiol (Benzoato de estradiol, RIC-BE[®], Tecnopec Ltda), via i.m., e em seguida, foram novamente avaliadas por meio de um exame ultrassonográfico para mensuração do diâmetro do folículo dominante presente, sendo posteriormente divididas em dois tratamentos:

- Tratamento 1 (vacas com folículo dominante com diâmetro < 13mm)
- Tratamento 2 (vacas com folículo dominante com diâmetro \geq 13mm).

A partir da aplicação de prostaglandina, todas as vacas ficaram sob observação visual, durante 30 minutos, duas vezes ao dia, para a observação do estro, com o auxílio de um rufião.

Após 48h da aplicação do estradiol, as vacas foram inseminadas artificialmente. Porém, as que apresentaram estro antecipadamente, foram inseminadas 12 horas após a manifestação do mesmo. Foram utilizadas doses de sêmen de touros com fertilidade comprovada e as inseminações foram realizadas por um único inseminador.

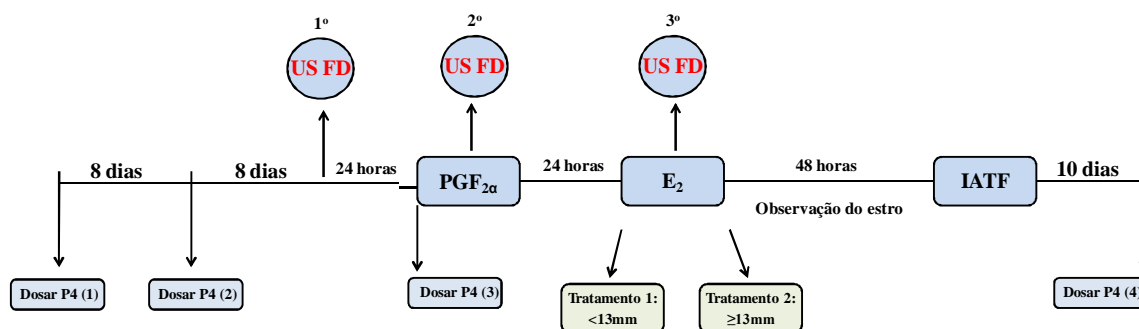


Figura 1. Esquema do delineamento experimental e protocolo hormonal

E_2 : Benzoato de estradiol; IATF: Inseminação artificial em tempo-fixo; $\text{PGF}_{2\alpha}$: D+cloprostenol;

P4: progesterona; US FD: ultrassonografia em folículos dominantes.

Após dez dias da realização da IATF, todas as vacas foram submetidas à outra coleta de sangue para quantificação da concentração sérica de progesterona.

O diagnóstico de gestação foi realizado aos 30 e 100 dias após a IATF por meio de ultrassonografia via transretal. A interpretação das imagens do ultrassom para o diagnóstico de gestação foi baseada nos critérios utilizados por Kastelic et al. (1988), onde incluem (1) presença de um feto, (2) presença de um líquido amniótico, (3) batimento cardíaco detectável.

3.4. Determinação da concentração de progesterona

O sangue foi obtido pela punção da veia ou artéria coccígea utilizando um tubo de coleta de sangue a vácuo de cinco mL acoplado a uma agulha de coleta a vácuo. Aproximadamente cinco mL de sangue foram puncionados e o soro foi obtido após uma centrifugação a 1.700 G por 10 min por meio de uma Centrífuga de Bancada Baby[®] I Modelo 206 BL. O soro obtido foi pipetado e transferido para um tubo plástico de dois mL (Eppendorf) devidamente identificados. Os tubos contendo o soro foram armazenados a -20°C até a determinação da concentração sérica de progesterona.

As dosagens de progesterona foram realizadas pela técnica de Radioimunoensaio (RIA – I¹²⁵), no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP Campus de Botucatu, usando-se kits comerciais para determinação de progesterona. Foi considerada atividade luteal a concentração de progesterona a partir de 1,0 ng/mL, de acordo com Youngquist (1997); Wiltbank e Niswender (1992); Guttierrez et al. (1994); Mapletoft et al. (2000); Wiltbank et al. (2000); Gonçalves et al. (2002).

3.5. Análises estatísticas

As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de Normalidade (Lilliefors) e Homocedascidade (Cochran) e posteriormente a análise de variância. As médias foram comparadas utilizando o teste F, adotando-se o nível de 5% de Probabilidade. Quando não atendiam as premissas de normalidade e homocedascidade, mesmo após as transformações apropriadas, os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Wilcoxon (SAEG, 1999).

Foi aplicado o teste de correlação de Pearson entre a concentração sérica de progesterona no décimo dia pós IA com a presença ou não de gestação.

A variável qualitativa dicotômica “taxa de gestação” foi comparada em tabela de contingência e analisada pelo teste de qui-quadrado a 5% de probabilidade (Sampaio, 2002).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ciclicidade de todas as vacas foi confirmada inicialmente por meio de duas coletas de sangue com intervalo de oito dias. Os valores de concentração sérica de P4 (ng/mL) obtidos, não apresentaram diferença ($P>0,05$) entre as amostras, apresentando médias de $1,20 \pm 0,40$ e $1,29 \pm 0,51$ ng/mL de soro, na 1ª e 2ª coletas, respectivamente. Como se considera atividade luteal a partir de 1,0 ng/mL de soro (Youngquist, 1997; Wiltbank e Niswender, 1992; Gutierrez et al., 1994; Mapletoft et al., 2000; Wiltbank et al., 2000; Gonçalves et al., 2002), as referidas vacas foram consideradas como tendo atividade luteal e assim aptas para serem utilizadas no experimento.

Protocolos que utilizam E_2 , como o utilizado neste trabalho, são importantes porque o aumento da circulação do E_2 antes da IA aumenta a expressão do estro. O E_2 no proestro contribui para aumentar a espessura do endométrio antes da IA e aumentar a sobrevivência embrionária (Glissant et al., 1985). Porém, esta espessura não foi mensurada no presente estudo.

O tempo de apresentação do estro após a aplicação da $PGF_{2\alpha}$ não apresentou diferença ($P>0,05$), sendo que 24 e 36% apresentaram estro até 48 horas pós $PGF_{2\alpha}$ e 52 e 45,5% apresentaram estro até 60 horas pós $PGF_{2\alpha}$, respectivamente nos animais do grupo dos Tratamento 1 e 2 (Tabela 1). O tempo de ovulação após aplicação de $PGF_{2\alpha}$ varia de dois a sete dias, o que vai depender do tamanho do folículo no momento da aplicação, pois se o folículo estiver de menor tamanho, precisará de mais tempo para crescer e ovular (Ferreira, 2010). Entretanto, como as vacas do presente estudo receberam aplicação adicional de E_2 , após a $PGF_{2\alpha}$ para que a ovulação fosse sincronizada, não foi possível detectar esta diferença.

A taxa de gestação dos animais do grupo do Tratamento 1 foi maior (76%) que a do grupo do Tratamento 2 (45,5%), havendo diferença nos resultados ($P<0,05$), conforme mostrado na Tabela 2. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Lynch et al. (2010), os quais obtiveram melhores resultados com folículos ovulatórios com diâmetro entre 10,1 a 14,1mm, resultando em taxa de gestação de 76% aos 30 dias após a IA. Encontraram ainda uma taxa de gestação de 57% para folículos entre 14,2 a

15,1mm em 84 novilhas, somente com o uso de duas aplicações de PGF_{2α} com intervalo de 11 dias, e o estro observado.

Tabela 1 - Percentagem de animais que apresentaram estro 48 ou 60 horas após aplicação de PGF_{2α} em vacas com diferentes categorias foliculares

Tratamento	Estro 48h		Estro 60h		Total de animais
	N	%	N	%	
< 13mm	6	24,0 ^a	13	52,0 ^a	25
≥ 13mm	8	36,4 ^a	10	45,5 ^a	22

Não houve diferença (P>0,05) entre tratamentos, pelo teste do qui-quadrado.

Tabela 2 - Taxa de gestação em vacas com diferentes categorias foliculares

Tratamento	Gestante		Total de animais
	N	%	
< 13mm	19	76,0 ^a	25
≥ 13mm	10	45,5 ^b	22

Valores com letras diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças (P<0,05) pelo teste do qui-quadrado.

O momento da mensuração dos folículos neste estudo, difere de Sá Filho et al. (2010), os quais fizeram as mensurações no dia da IATF. Além disto, obtiveram melhor taxa de gestação (P<0,05) em vacas com folículos ovulatórios com diâmetro a partir de 11,1mm (57,9%) e >14mm (63,3%), comparado com folículos ovulatórios de 7,5-11mm (46,6%). Deste modo, percebe-se que folículos sincronizados precocemente não apresentam resultados satisfatórios. Estes autores sugeriram que folículos a partir de 11,1mm fossem selecionados para sincronização de ovulação. No presente estudo, a categoria que obteve a maior taxa de gestação foi <13mm, no dia da aplicação do E₂ (antes da IA), o que provavelmente teria possibilitado um maior diâmetro folicular no momento da IA, o que não foi verificado.

Em outro estudo no qual o folículo foi mensurado no dia da IATF, diferente do presente estudo, foi utilizado 100 µg de GnRH em bovinos com FD de 11 e 13mm, dois dias após a aplicação da PGF_{2α}, e resultaram em taxas de

concepção de 4,4% e 57,4% dos animais respectivamente (Macmillan et al., 2003). Deste modo, percebe-se grande diferença nos resultados somente com 2mm de diferença entre os folículos.

Os resultados encontrados concordam com os de alguns autores, os quais relatam que o sucesso na gestação em novilhas é maior com folículo pré-ovulatório com diâmetro aproximado de 12,8mm do que com folículos menores que 10,5mm ou maiores que 15,7mm (Perry et al., 2007). Utilizando um protocolo diferente, estes autores submeteram vacas de corte ao protocolo de IATF conhecido como Co-Synch (dia 0 GnRH, dia 7 PGF_{2α}, dia 9 GnRH e IA) ou inseminadas com detecção do estro. Contrariamente, puderam verificar que a taxa de sobrevivência embrionária/fetal foi reduzida quando folículos menores que 11mm foram induzidos à ovulação com GnRH, mas não quando ovularam espontaneamente (Perry et al., 2003). Contudo, as categorias de folículos avaliadas por estes autores não se assemelham com as avaliadas em nosso trabalho.

É provável que a menor taxa de gestação verificada nos animais com folículos dominantes ≥ 13 mm, tenha ocorrido devido a possibilidade de alguns folículos se encontrarem sob dominância por extenso período antes do pico de LH. Deste modo, são denominados folículos persistentes, os quais reduzem a taxa de concepção, quando comparados com folículos pré-ovulatórios menores (91x36%), segundo Santos et al. (2004). Estes autores sugerem que uma das causas pode ser uma concentração sub-luteal de P4 durante o CE, aumentando assim a frequência de LH. Destarte, este fato pode induzir o reinício prematuro da meiose no ovócito, reduzindo então a fertilidade devido à ME antes do estágio de 16 células. Além disto, outros trabalhos associam a diminuição da fertilidade à ovulações de folículos grandes e persistentes (Patterson et al., 1989; Savio et al., 1993). Adicionalmente, esta situação também foi associada à uma diminuição da fertilidade em estro natural de vacas leiteiras (Lopez et al., 2005; Wiltbank et al., 2006).

Categorias de folículos muito pequenos também foram associadas com diminuição da fertilidade (Vasconcelos et al., 200; Perry et al., 2005). Entretanto, não houve um número de vacas suficiente no presente estudo para uma avaliação desta categoria. Concordando com alguns aspectos encontrados, programas de IA utilizando GnRH no qual folículos pequenos foram ovulados, observou-se diminuição da concentração de E₂ antes da IA,

diminuição do tamanho do CL resultante e redução da P4 após IA (Vasconcelos et al., 2001).

Não houve diferença ($P>0,05$) na taxa de gestação, quando comparados o intervalo do parto à IA, que foram 68 e 54,5% para intervalos de 40 a 70 e 71 a 225 dias, respectivamente (Tabela 3). O período voluntário de espera no estudo foi de 30 dias, tempo necessário para que ocorra a involução dos órgãos genitais femininos e o animal se recupere física e fisiologicamente para receber uma nova gestação. A partir deste período, se as vacas apresentarem uma condição corporal satisfatória, estarão prontas para serem inseminadas, e se ficarem prenhes corresponde ao período de serviço (Polastre et al., 1987). Pelos resultados apresentados, sugere-se que o aumento no período de serviço não interferiu na taxa de gestação das vacas.

Tabela 3 – Período de serviço (dias) e taxa de gestação em vacas submetidas à sincronização de ovulação para IATF

Período de serviço	Gestante		Total de animais
	N	%	
40 – 70	17	68,0	25
71 – 225	12	54,5	22

Não houve diferença ($P>0,05$) entre tratamentos, pelo teste do qui-quadrado.

Não houve diferença para valores médios do diâmetro folicular no momento da aplicação da $PGF_{2\alpha}$, no momento da aplicação do E_2 e entre o crescimento dos mesmos (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores Médios e Desvios Padrão para diferentes categorias foliculares (mm) no momento da aplicação da $PGF_{2\alpha}$ e E_2 e a diferença entre os mesmos em vacas submetidas à sincronização da ovulação para IATF

Tratamento	DF- $PGF_{2\alpha}$	DF- E_2	DDF	Número de animais
< 13mm	9,58 ± 1,58	10,96 ± 1,56	1,39 ± 0,72	25
≥ 13mm	13,38 ± 2,53	15,62 ± 2,41	2,25 ± 1,21	22
Total	11,35 ± 2,81	13,14 ± 3,08	1,79 ± 1,06	47

Não houve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos pelo teste F. DF- $PGF_{2\alpha}$ = diâmetro do folículo dominante (FD) no momento da aplicação de $PGF_{2\alpha}$; DF- E_2 = diâmetro do FD no momento da aplicação de E_2 ; DDF= diferença entre DF- E_2 e DF- $PGF_{2\alpha}$.

Uma baixa correlação ($r = 0,45$) entre a concentração de P4 no décimo dia pós-IA e a presença de gestação foi encontrada neste estudo. Entretanto, autores revisados por Ferreira (2010) relatam que a concentração de P4 entre 10 a 18 dias após o estro é, em geral, maior em vacas gestantes que naquelas ciclando, sugerindo a produção de fatores luteotrópicos pelo embrião. Starbuck et al. (2004) também relatam que a manutenção da gestação durante cinco a nove semanas após a IA está relacionada positivamente com a concentração sérica de P4 e E_2 .

Contrariamente, Lynch et al. (2010) mostraram uma associação positiva entre a taxa de sobrevivência embrionária no dia 30 e a concentração de P4 no dia sete após a IA. Porém, semelhante ao presente trabalho, gestações com concentração sérica baixa de P4 ($<2,0\text{ng/mL}$) nos dias 20 a 22 após IA foram observadas (Screenan e Diskin, 1986; Hasler et al., 1987). Além disto, há relatos de vacas leiteiras com menos de 1ng/mL na 5ª semana de gestação, apesar de apresentarem CL de tamanho normal e embrião viável (Starbuck et al., 2004). Valores similares foram encontrados em outros estudos (Erb et al., 1968; Donaldson et al., 1970), sugerindo que a concentração mínima de P4 para manter a sobrevivência embrionária pode ser menor do que 1ng/mL de plasma.

Wathes et al. (2003) correlacionaram a concentração de P4 nos dias 4 e 5 após acasalamento (não mais tarde), com a concentração de interferon-tau no lúmen uterino no 16º dia. Além disto, a P4 exógena (suplementar) foi benéfica para a fertilidade (maior taxa de concepção), quando aplicada antes do dia 6 após a IA em vacas lactantes, mais precisamente entre os dias três e cinco. Entretanto, sabe-se que o máximo de P4 produzida pelo CL acontece a partir do 9º até o 16º dia do CE normal, sendo que por volta do 16º dia é que ocorre o reconhecimento materno. Este foi o motivo da análise de P4 no décimo dia pós IA no presente trabalho.

Contrariamente também ao experimento realizado, Remsem et al. (1982) encontraram correlação positiva entre a concentração de progesterona no dia da inovulação e a subsequente taxa de gestação, em um estudo com 223 receptoras de embriões bovinos, dia este correspondente ao oitavo dia pós ovulação. Em um trabalho semelhante, comparou-se estes aspectos entre vacas e novilhas receptoras após a transferência, constatando que a baixa concentração sérica de P4 plasmática no dia sete em vacas lactantes pode

afetar negativamente a sobrevivência embrionária. Porém, em novilhas este efeito é menos notório (Chagas e Silva et al., 2002). Vacas lactantes, nestas condições, têm maior possibilidade de sofrer morte embrionária do que novilhas ($P < 0,01$), principalmente no caso de embriões congelados. Estes autores sugeriram que isto estaria associado à baixa competência do CL no dia sete ($3,03 \pm 0,08$ e $2,71 \pm 0,08$ ng/mL) para novilhas e vacas respectivamente. Contudo, estes valores são superiores aos encontrados neste estudo, mesmo nas vacas do tratamento 2, em que foi observado maior concentração de P4. Além disto, concentrações menores de P4 (Tratamento 1) (Tabela 5) não reduziram a taxa de gestação.

Tabela 5 – Valores Médios e Desvios Padrão para concentração sérica de progesterona (ng/mL) no momento da aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ (P4_3) e no 10º dia pós-Inseminação Artificial (P4_4) em vacas com diferentes categorias foliculares, submetidas à sincronização da ovulação para IATF

Tratamento	P4_3 (ng/mL)	P4_4 (ng/mL)	Número de animais
< 13mm	$1,23 \pm 1,23^a$	$1,34 \pm 0,49^a$	21
$\geq 13\text{mm}$	$1,70 \pm 1,24^a$	$2,16 \pm 1,17^b$	20
Total	$1,46 \pm 1,24$	$1,74 \pm 0,97$	41

Valores com letras diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças ($P < 0,01$) pelo teste de Wilcoxon. P4_3 = concentração sérica de progesterona no momento da aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$; P4_4 = concentração de progesterona no décimo dia pós Inseminação Artificial.

De acordo com Binelli (2000), a ação da progesterona tem sua importância não apenas durante a gestação, mas também nos momentos que precedem a fecundação, preparando o ambiente uterino para o concepto. Somam-se a estes aspectos, regulação do crescimento e desenvolvimento do embrião (alongamento do blastocisto) (Mann e Lamming, 2001; Chagas e Silva e Lopes da Costa, 2005; Chagas e Silva et al., 2007). Entretanto, estes autores não citaram concentrações mínimas necessárias de P4 para este efeitos. Portanto, as baixas concentrações de P4 encontradas, não significam que não ocorreram os mesmos efeitos nas vacas do presente trabalho.

Houve diferença ($P < 0,01$) para a concentração sérica de P4 no décimo dia após a IA entre os animais do Tratamento 1 com os do Tratamento 2 (Tabela 5). Estes aspectos assemelham-se aos encontrados por Burke et al.

(2001) que avaliaram os efeitos do potencial ovulatório do folículo na indução do estro, e concluíram que durante o ciclo ovulatório, o tamanho do CL e a concentração plasmática de P4 foram maiores no grupo de vacas sincronizadas com FD maduro do que FD jovens. Porém, o tamanho de CL resultante não foi mensurado no presente trabalho. A partir destes resultados, sugere-se que o tamanho do CL formado, e a concentração plasmática de P4, estão diretamente associados com o diâmetro do FD no momento da ovulação. Segundo Ferreira (2010), a concentração plasmática de P4, está mais relacionada com a função do CL, do que com o tamanho propriamente dito. Vacas com folículos maiores e com curta fase folicular produzem CLs com maior capacidade de produção de P4, embora a qualidade do folículo pré-ovulatório em si (um fator determinante desta qualidade é o grau de vascularização) seja determinante para a função luteal subsequente.

Contrariamente em alguns aspectos avaliados neste estudo, Lopes et al. (2007) sincronizaram o estro de 144 vacas em lactação e avaliaram o tamanho do folículo ovulatório no dia da IA, e puderam concluir que o item avaliado estava superior nas vacas diagnosticadas prenhes em relação às não prenhes e estes resultados influenciaram a função do CL, resultando em maior concentração de P4 no dia seis após a IA. Porém a metodologia utilizada pelos autores difere do presente trabalho, no que diz respeito ao dia da mensuração do folículo e o dia da análise de P4.

Em outro estudo, Vasconcelos et al. (2001) reduziram o tamanho do folículo ovulatório por aspiração folicular em 52 vacas lactantes que foram sincronizadas, e concluíram que houve redução do tamanho do CL resultante, concentração de P4 e taxa de gestação. No presente estudo, este último aspecto foi totalmente contraditório. Segundo estes autores, uma causa da menor taxa de gestação com folículos menores, pode ser pelo comprometimento da competência de desenvolvimento do ovócito. Além disto, avaliações de ovócitos de folículos persistentes revelaram que a ruptura da vesícula germinativa ocorreu prematuramente, antes da ovulação, e isso provavelmente causou uma redução da fertilidade (Mihm et al., 1999; Revah e Butler, 1996). Deste modo, sugere-se que tanto categorias de folículos pequenos, quanto de folículos grandes, podem afetar de alguma maneira os ovócitos.

Até mesmo concentrações plasmáticas menores que 1ng/mL de progesterona são detectados no início de gestações (Starbuck et al., 2001), valores os quais se aproximam aos encontrados nas vacas do Tratamento 1 do presente estudo.

Não descartando a importância da P4, mas sim, valorizando a importância de sua concentração mínima necessária para a sobrevivência embrionária, sabe-se que após sair da zona pelúcida, por volta de 9 a 11 dias, o blastocisto fica livre e flutuante no lúmen uterino. Assim, passa a ser totalmente dependente do ambiente uterino para sobreviver, e que a P4 é de fundamental importância para manter um ambiente uterino adequado, promovendo a secreção de histotrofos. Este fato pode ter contribuído para a melhor sobrevivência embrionária dos animais nos dois Tratamentos do presente estudo. Assim, o crescimento do blastocisto na fase pré-implante ocorre com o auxílio de uma glicoproteína no lúmen uterino denominada blastocinina ou úteroglobina, cuja síntese é P4 dependente (Robinson et al., 2008).

Os resultados de inúmeros trabalhos sobre a eficiência na sincronização da ovulação de folículos muito grandes ou muito pequenos, sugerem que uma categoria ótima para sincronizar a ovulação seja de folículos médios (entre >10mm e ≤13mm). Dentre os aspectos importantes para a sobrevivência embrionária, destacam-se a produção suficiente de P4 pós IA; o ambiente uterino adequado devido a diversos fatores e o ovócito apto para ser ovulado.

Reforçando o objetivo do presente trabalho, em recente revisão realizada por Wiltbank et al. (2011), é enfatizado que a otimização do tamanho ideal do folículo ovulatório tem sido importante alvo de pesquisas em programas reprodutivos, particularmente naqueles que utilizam a sincronização da ovulação. Também citam que o tratamento hormonal escolhido e a duração do desenvolvimento dos folículos são componentes importantes na otimização da fertilidade em programas de IATF. Segundo os autores, estes aspectos podem ter impacto na fertilidade, alterando a função do ovócito, o número e função das células da granulosa e teca, o ambiente uterino, além de outras funções reprodutivas.

Está aí aberto um novo campo de pesquisas na área de IATF, para verificar a eficiência da técnica com tamanhos diferentes de folículos no dia da aplicação de PGF_{2α}, do E₂ ou GnRH. Deste modo, trará importantes subsídios

para melhoria dos resultados com IATF nos trabalhos a campo e conseqüente aumento de usuários da tecnologia

5. CONCLUSÕES

- O diâmetro folicular no momento da aplicação do estradiol tem influência na fertilidade em vacas leiteiras, sendo que os de diâmetro menor que 13mm apresentam melhores resultados que os ≥ 13 mm.

- Folículos com diâmetro ≥ 13 mm formam corpos lúteos que produzem maior quantidade de progesterona após a inseminação artificial. Entretanto, não ocorre incremento na taxa de gestação.

6. BIBLIOGRAFIA

ACOSTA, T. J.; HAYSHI, K. G.; OHTANU, M. et al. A local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. **Reproduction**, v. 125, p. 759-767, 2003.

ACOSTA, T. J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 82-83, p. 127-140, 2004.

ALLEN, E.; DOISY, E. A. An ovarian hormone. Preliminary report on its localization, extraction, and purification, an action in test animals. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 81, p. 819-821, 1923.

ANGELOPOULOS, N.; GOULA, A.; TOLIS, G. The role of luteinizing hormone activity in controlled ovarian stimulation. **J. Endocrinol. Invest.**, v. 28, n. 1, p. 79088, 2005.

ARMSTRONG, D. G.; GONG, J. G.; WEBB, R. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: physiological, cellular and molecular mechanisms. **Reproduction**, v. 61, p. 403-414, 2003.

BAKER, S. J.; SPEARS, N. The role of intra-ovarian interaction in the regulation of follicle dominance. **Hum Reprod Update**, v. 5, n. 2, p. 153-165, 1999.

BARROS, C. M.; MOREIRA, M. B. P.; FIGUEIREDO, R. A. et al. Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using GnRH and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 53, p. 1121-1134, 2000.

BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1483-1496, 2001.

BECH-SÀBAT, G.; LÓPEZ-GATIUS, F. GARCÍA-ISPIERTO, I. et al. Pregnancy patterns during the early fetal period in high producing dairy cows treated with GnRH or progesterone. **Theriogenology**, v. 71, p. 920-929, 2009.

BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. **Reproduction**, v. 132, p. 365-377, 2006.

BINELLI, M. Estratégias antiluteolíticas para melhora da sobrevivência embrionária em bovinos. In: SIMPÓSIO CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL DE RUMINANTES. Anais... São Paulo, SP, p. 99-114, 2000.

BOOTH, N. H.; MCDONALD, L. E. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. Sexta edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992, 927 p.

BURKE, C. R.; MUSSARD, M. L.; GRUM, D. E. et al. Effects of maturity of the potential ovulatory follicle on induction of oestrus and ovulation in cattle with oestradiol benzoate. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 66, p. 161–174, 2001.

CARAVIELLO, D. Z.; WEIGEL, K. A.; FRICKE, P. M. et al. Survey of management practices on reproductive performance of dairy cattle on large US commercial farms. **J. Dairy Sci.**, v. 89, p. 4723-4735, 2006.

CARTMILL, J. A.; EL-ZARKOUNY, S. Z.; HENSLEY, B. A. et al. Stage of cycle, incidence, and timing of ovulation, and pregnancy rates in dairy cattle after three timed breeding protocols. **J. Dairy Sci.**, v. 84, p. 1051–9, 2001.

CARVALHO, G. R.; MARTINS, P. C. Leite: por que o preço disparou? **Agroanalysis**, v. 33, n. 08, p. 25-26, ago. 2007.

CHAGAS E SILVA, J.; LOPES DA COSTA, L.; ROBALO SILVA, J. Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 58, p. 51-59, 2002.

CHAGAS E SILVA, J.; DINIZ, P.; LOPES DA COSTA, L. Luteotrophic effect, growth and survival of whole versus half embryos and, their relationship with plasma progesterone concentrations of recipient dairy heifers. **Anim. Reprod. Sci.**, 2007 (No prelo).

CHAGAS E SILVA, J.; LOPES DA COSTA, L. Luteotrophic influence of early bovine embryos and the relationship between plasma progesterone concentrations and embryo survival. **Theriogenology**, v. 64, n. 1, p. 49-60, 2005.

COLAZO, M. G. et al. Effects of dose and route of administration of cloprostenol on luteolysis estrus and ovulation in beef heifers. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 72, p. 47-62, 2002.

COSTA, D. S.; HENRY, M.; OLIVEIRA, B. C. B. V. et al. Indução da luteólise nos primeiros dias do diestro em vacas zebu. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 37., 2000, Viçosa, MG. Anais... Viçosa: UFV/SBZ, 2000. P. 197.

DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Effects of pre-synchronization using combinations PGF_{2α} and (or) GnRH on pregnancy rates of Ovsynch- and Cosynch-treated lactating Holstein cows. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 77, p. 51–60, 2003.

DEL VECCHIO, R. P.; SUTHERLAND, W. D.; SASSER, R. G. Bovine luteal cell production in vitro of prostaglandin E₂, oxytocin and progesterone in response to pregnancy – specific protein B and prostaglandin F_{2α}. **J. Reprod. Fertil.**, v. 107, p. 131-136, 1996.

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

DODE, M. A. N. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. **Acta Sci. Vet.**, v. 34, suppl. 1, p. 113-130, 2006.

DOMINGUEZ, J. C.; PEÑA VEGA, F. J.; ANEL, L. et al. Estructura química de las prostaglandinas. **Bovis**, n. 29, p. 13-19, 1989.

DONALDSON, L.E.; BASSET, J.M.; THORBUM, G.D. Peripheral plasma progesterone concentration of cows during puberty, oestrous cycles, pregnancy and lactation, and the effects of under-nutrition or exogenous oxytocin on progesterone concentration. **J. Endocrinol.**, v. 48, p. 599–614, 1970.

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

DRIANCOURT, M. A.; THUEL, B. Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. A review. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 38, n. 4, p. 345-362, 1998.

DRION, P. V.; BECKERS, J. F.; DERKENNE, F. et al. Le Développement folliculaire chez la vache. 2. Mécanismes hormonaux au cours du cycle et du post-partum. **Ann. Med. Vet.**, v. 144, p. 385-404, 2000.

ERB, R.E.; ESTERGREEN, V.L.; GOMES, W.R. et al. Progesterone levels in corpora lutea and progesterone in ovarian venous and jugular vein blood plasma of the pregnant bovine. **J. Dairy Sci.**, v. 51, p. 401–410, 1968.

ESPEY, L. L. Ovulation as an inflammatory reaction – a hypothesis. **Biol. Reprod.**, v. 22, p. 73-106, 1980.

ESPEY, L. L. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. **Biol. Reprod.**, v. 50, p. 232-238, 1994.

EVANS, A. C. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. **Reprod. Domest. Anim.**, v.38, n. 4, p. 240-246, 2003.

EVANS, A. C.; IRELAND, J. L. H.; WINN, M. E. et al. Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle. **Biol. Reprod.**, v. 70, n. 4, p. 1475-1484, 2004.

FERGUSON, J. D. Diet, production and reproduction in dairy cows. **Animal Feeding Science Technology**, v. 59, p. 173-184, 1996.

FERREIRA, A. M. **Manejo reprodutivo e sua importância na eficiência da atividade leiteira**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1991, 49 p. (EMBRAPA-CNPGL. Documentos, 46).

FERREIRA, A. M. **Reprodução da Fêmea Bovina: Fisiologia aplicada e problemas mais comuns (causas e tratamentos)**. Juiz de Fora: Editar Editora, 2010, 420 p.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L. et al. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 1489-1505, 1997.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: the role of follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 82-83, p. 109-126, 2004.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 78, p. 135-163, 2003.

FUQUAY, J. W. Variable response of dairy heifers to oestrus synchronization proceedings. **Advanced Animal Breeder**, v. 31. N. 9, p. 14-15, 1983.

GIMENES, L. U.; SA´ FILHO, M. F.; CARVALHO, N. A. T. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 852-858, 2008.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULLICK, L. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hour trough depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, v. 52, p. 1079-1093, 1999.

GLISSANT, A.; DEMOUZON, J.; FRYDMAN, R. Ultrasound study of the endometrium during in vitro fertilization cycles. **Fertil. Steril.**, v. 44, p. 786-790, 1985.

GLISTER, R. C.; GROOME, N. P.; KNIGHT, P. G. Bovine follicle development is associated with divergent changes in activin-A, inhibin-A e follistatin and the relative abundance of different follistatin isoforms in follicular fluid. **J. Endocrinol.**, v. 188, p. 215-225, 2006.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, F. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal – Controle do Estro e da Ovulação em Bovinos e Ovinos**. Cap. 3, p. 25-55, Editora Varela, 640p., 2002.

GONZÁLEZ, F. H. D. **Hormonioterapia na reprodução**. www.ufrgs.br/ufrgs/ . 18p, UFRGS, Porto Alegre, 2002a.

GONZÁLEZ, F. H. D. **Introdução a Endocrinologia Reprodutiva Veterinária**. www.ufrgs.br/ufrgs/ 86 p., UFRGS, Porto Alegre, 2002b.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Ireland: CAB International, University Press Cambridge, University Dublin, 1994.

GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. H.; TELFER, E. E. et al. Growth and antrum formations of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. **Biol. Reprod.**, v. 62, p. 1322-1328, 2000.

GUTTIERREZ, A. C.; ZARCO, L.; GALLINA, C. S. et al. Predictive value of palpation per rectum for detection of the corpus luteum in zebu cattle as evaluated by progesterone concentrations and ultrasonography. **Theriogenology**, v. 46, p. 471-479, 1994.

HAGEMANN, L. J. Influence of dominant follicle on oocytes from subordinate follicle. **Theriogenology**, v. 51, p. 449-459, 1999.

HANZEN, C. H.; LOURTIE, O.; DRION, P. V. Le développement folliculaire chez la vache. I. Aspects morphologiques et cinétiques. **Ann. Med. Vet.**, v. 144, p. 223-235, 2000.

HASLER, J. F.; McCAULEY, A. D.; LATHROP, W. F. et al. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 27, p. 139-168, 1987.

HENRICUS, D. M.; LONG, J. T.; HILL, J. R. et al. The effect of prostaglandin F₂ α during various stages of the oestrus cycle of beef heifers. **J. Reprod. Fertil.**, v. 41, p. 113-120, 1974.

IRELAND, J. J.; MIHM, M.; AUSTIN, E. et al. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements and terms. **J. Dairy Sci.**, v. 83, p. 1648-1658, 2000.

JUENGEL, J. L.; NISWENDER, G. D. Molecular regulation of luteal progesterone synthesis in domestic ruminants. **J. Reprod. Fertil.**, suppl., v. 54, p. 193-205, 1999.

KAPPEL, L. C.; INGRAHAM, R. H.; MORGAN, E. B. et al. Relationship between fertility and blood glucose and cholesterol concentrations in Holstein cows. **Anim. J. Vet. Research**, v. 45, p. 2607-2612, 1984.

KASIMANICKAM, R.; CORNWELL, J. M.; NEBEL, R. L. Fertility following fixed-time AI or insemination at observed estrus in Ovsynch and Heatsynch programs in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 63, p. 2550–2559, 2005.

KASTELIC, J. P.; CURRAN, S.; PIERSON, R. A. et al. Ultrasonic evaluation of the bovine conceptus. **Theriogenology**, v. 29, p. 39–54, 1988.

KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Ovarian follicular responses in dairy cows treated with GnRH and cloprostenol. **Can. Vet. J.**, v. 39, p. 107–109, 1998.

KASTELIC, J. P.; PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonic morphology of corpora lutea and central luteal cavities during the estrous cycle and early pregnancy in heifers. **Theriogenology**. V. 34, p.487-498, 1990.

KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. Potential local regulatory function of inhibins, activins and follistatin in the ovary. **Reproduction**, v. 121, p. 503-512, 2001.

KOBAYASHI, S.; ACOSTA, T. J.; OZAWA, T. et al. Intraluteal release of angiotensin II and progesterone in vivo during corpora lútea development in the cow: effect of vasoactive peptides. **Biol. Reprod.**, v. 66, p. 174-179, 2002.

LAMMING, G. E.; DARWASH, A. O. The use of milk progesterone profiles to characterize components of subfertility in milked dairy cows. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 52, p.175–90, 1998.

LAMMING, G. E.; MANN, G. E. Progesterone concentration affects the development of the luteolytic mechanism in the cow. **J. Reprod. Fert.**, Abstract, v. 11, p. 8-17, 1993.

LARSON, S.F.; BUTLER, W.R.; CURRIE, W.B. Pregnancy rates in lactating dairy cattle following supplementation of progesterone after artificial insemination – Short communication. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 102, p. 172-179, 2007.

LAU, T.; GOW, G. B.; FAIRCLOUGH, R. J. Differential effects of progesterone treatment on the oxytocin-induced prostaglandin response and the levels of endometrial oxytocin receptors in ovariectomized ewes. **Biol. Reprod.**, v. 46, p. 17-22, 1992.

LEQUARRE, A.; VIGNERON, C.; RIBAUCCOUR, F. et al. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. **Theriogenology**, v. 63, n. 3, p. 841-859, 2005.

LOPES, A. S.; BUTLER, S. T.; GILBERT, R. O. et al. Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 99, p. 34–43, 2007.

LOPEZ, H.; CARAVIELLO, D. Z.; SATTER, L. D. et al. Relationship between level of milk production and multiple ovulations in lactating dairy cows. **J. Dairy. Sci.**, v. 88, p. 2783-2793, 2005.

LOPEZ, H.; SATTER, L. D.; WILTBANK, M. C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 81, p. 209-223, 2004.

LUCK, M. R.; ZHAO, Y. Structural remodelling of reproductive tissues. **J. Endocrinol.**, v. 146, p. 191-195, 1995.

LYNCH, C. O.; KENNY, D. A.; CHILDS, S. et al. The relationship between periovulatory endocrine and follicular activity on corpus luteum size, function, and subsequent embryo survival. **Theriogenology**, v. 73, p. 190–198, 2010.

MACMILLAN, K. L.; SEGWAGWE, B. V. E.; PINO, C. S. Association between manipulation of patterns of follicular development and fertility in cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 78, p. 327–344, 2003.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E.; ROBINSON, R. S. et al. The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. **J. Reprod. Fertil.**, v. 54, p. 317-328, 1999.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, v. 121, p. 175–180, 2001.

MAPLETOFT, R. J.; BO, G. A.; ADAMS, G. P. Avanços na manipulação de doadoras e receptoras nos programas de Transferência de Embriões em bovinos. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v. 28, n. 1, p. 24-51, 2000.

MASLAR, I. A.; POWERS-CRADDOCK, P.; ANSBACHER, R. Decidual prolactin production by organ cultures of human endometrium : Effects of continuous and intermittent progesterone treatment. **Biol. Reprod.**, v. 34, p. 741-750, 1986.

MCDUGALL, S.; WILLIAMSON, N. B.; MACMILLAN, K. L. GnRH induces ovulation of a dominant follicle in primiparous dairy cows undergoing anovulatory follicle turnover. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 39, p. 205-214, 1995.

MIHM, M.; AUSTIN, E. J. The final stages of follicle selection in cattle. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 23, p. 155-166, 2002.

MIHM, M.; BAKER, P. J.; IRELAND, J. L. H. et al. Molecular evidence that growth of dominant follicle involves a reduction in follicle stimulating hormone-dependence and an increase in luteinizing hormone-dependence in cattle. **Biol. Reprod.**, v. 74, p. 1051-1059, 2006.

MIHM, M.; CURRAN, N.; HYTTEL, P. et al. Effect of dominant follicle persistence on follicular fluid oestradiol and inhibin and on oocyte maturation in heifers. **J. Reprod. Fertil.**, v. 116, p. 293-304, 1999.

MIHM, M.; DELATANG, F.; ROCHE, J. F. The gonadotrophin and ovarian responses to an intermediate or low dose of gonadorelin in beef heifers: influence of dose, follicle status and progesterone environment. **J. Reprod. Fertil.**, Abst. Ser. 21, 74, 1998.

MILVAE, R. A.; HINCKLEY, S. T; CARLSON, J. C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v. 45, p. 1327-1349, 1996.

MOORE, K.; THATCHER, W. W. Major advances associated with reproduction in dairy cattle. **J. Dairy Sci.** v. 89, p. 1254-1266, 2006.

NETT, T. M.; TURZILLO, A. M.; BARATTA, M. et al. Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicles-stimulating hormone and luteinizing hormone. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 23, p. 33-42, 2002.

NISWENDER, G. D.; JUENDEL, J. L.; MCGUIRE, W. J. et al. Luteal function the estrous cycle and early pregnancy. **Biology Reproduction**, v. 50, p. 239-247, 1994.

NOSEIR, W. M. B. Ovarian follicular activity and hormonal profile during estrous cycle in cows: the development of 2 versus 3 waves. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v.1, n. 50, p. 1-6, 2003.

PADMANABHAN, V.; McNEILLY, A. S. Is there an FSH-releasing factor? **Reproduction**, v. 121, p. 21-30, 2001.

PALERMO, R. Differential action of FSH and LH during folliculogenesis – Review. **Reprod. Biomed. Online**, v. 15, n. 3, p. 326-337, 2007.

PARKINSON, T. J.; TURVEY, A.; JENNER, L. J. A morphometric analysis of the corpus luteum of cow during the estrous cycle and early pregnancy. **Theriogenology**, v. 41, p. 1115-1126, 1994.

PATTERSON, D. J.; KIRACOFE, G. H.; STEVENSON, J. S. et al. Control of the bovine estrous cycle with melengestrol acetate (MGA) – A review. **J. Anim. Sci.**, v. 67, p. 1895-1906, 1989.

PERRY, G. A.; SMITH, M. F.; LUCY, M. C. et al. Effect of ovulatory follicle size at time of GnRH injection or standing estrus on pregnancy rates and embryonic/fetal mortality in beef cattle. **J. Anim. Sci.**, 81 (Suppl. 1), 52 (abstract), 2003.

PERRY, G. A.; SMITH, M. F.; LUCY, M. C. et al. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 102, p. 5268-5273, 2005.

PERRY, G. A.; SMITH, M. F.; ROBERTS, A. J. et al. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. **J. Anim. Sci.**, v. 85, p. 684–9, 2007.

PETER, A. T.; VOS, P. L. A. M.; AMBROSE, D. J. Postpartum anestrus in dairy cattle – Review. **Theriogenology**, p. 71, n. 9, p. 1333-1342, 2009.

PETERS, M. W.; PURSLEY, J. R. Timing of final GnRH of the Ovsynch protocol affects ovulatory follicle size, subsequent luteal function, and fertility in dairy cows. **Theriogenology**, v. 60, p. 1197–1204, 2003.

PFEIFER, L. F. M.; CORRÊA, M. N.; SCHMMIT, E. et al. Uso de PGF_{2α} associado ao benzoato de estradiol para inseminação artificial em tempo-fixado em vacas leiteiras. **R. Bras. Agrociência**. Pelotas, v. 11, n. 3, p. 347-350, 2005.

POLASTRE, R.; MILAGRES. J. C.; LAPERUTA FILHO. J. et al. Fatores genéticos e de ambiente do desempenho de vacas mestiças holandês-sebu. II. Intervalo de partos. *Ver. Soc. Bras. Zoot., Viçosa, MG.* v. 16, n. 3, p. 233-240. 1987.

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

PURSLEY, J. R.; SILCOX, R. W.; WILTBANK, M. C. Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gestation after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v. 81, p. 2139–2144, 1998.

RATHBONE, M. J.; KINDER, J. E.; FIKE, K. 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. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 50, p. 277-320, 2001.

REMSEM, L. G.; ROUSSEL, J. D.; KARIHALOO, A. K. Pregnancy rates relating to plasma progesterone levels in recipient heifers at day of transfer. **Theriogenology**, v. 18, n. 3, p. 365- 372, 1982.

RÉPASI, A.; BECKERS, J. F.; SULON, J. et al. Effect of different doses of prostaglandin on the area of corpus luteum, the largest follicle and progesterone concentration in dairy cow. **Rep. Dom. Anim.**, v. 38, n. 6, p. 423-428, 2003.

REVAH, I.; BUTLER, W. R. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. **J. Reprod. Fertil.**, v. 106, p. 39-47, 1996.

RICHARDS, J. S. Perspectives: the ovarian follicle – a perspective in 2001. **Endocrinology**, v. 142, n.6, p. 2184-2193, 2001.

ROBINSON, R. S.; HAMMOND, A. J.; WATHES, D. C. et al. Corpus-luteum-endometrium-embryo interactions in dairy cow: underlying mechanisms and clinical relevance. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 43, suppl. 2, p. 104-112, 2008.

ROCHE, J. F.; AUSTIN, E. J.; RYAN, M. et al. Regulation of follicle waves to maximize fertility in cattle. **J. Reprod. Fertil.**, v. 54, suppl., p. 61-71, 1999.

ROSENFELD, C.S.; WAGNER, J. S.; ROBERTS, R. M. et al. Intraovarian actions of oestrogen (Review). **Reproduction**, v. 122, p. 215-226, 2001.

ROYAL, M. D; DARWASH, A. O.; FLINT, A. P. E. et al. Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. **Anim. Sci.**, v. 70, p. 487–501, 2000.

RYAN, M.; MIHM, M.; ROCHE, J. F. Effect of GnRH given before or after dominance on gonadotrophin response and fate of that follicle wave in postpartum cows. **J. Reprod. Fertil.**, Abstr. Ser. 21, 61, 1998.

SÁ FILHO, M. F.; CRESPILO, A. M.; SANTOS, J. E. P. et al. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 120, p. 23-30, 2010.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002, 256p.

SANTOS, J. E. P.; THATCHER, W. W.; CHEBEL, R. C. et al. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 82–83, p. 513–535, 2004.

SAVIO, J. D.; THATCHER, W. W.; MORRIS, G. R. et al. 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. 84, p. 77-84, 1993.

SCHAMS, D. Paracrine / autocrine regulation of bovine corpus luteum function. **J. Reprod. Develop.**, v. 42 (Suppl.), p. 54-57, 1996.

SCHAMS, D.; BERISHA, B.; KOSMANN, M. et al. Expressin and localization of IGF family members in bovine antral follicles during final growth and in luteal tissue during different stages of estrous cycle and pregnancy. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 22, p. 51-72, 2002.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 23, p. 53-65, 2002.

SCREENAN, J. M.; DISKIN, M. G. Mortality in the cow. In: Screenan JM, Diskin MG, editors. **Embryonic mortality in farm animals**. Dordrecht, The Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers, p. 1-12, 1986.

SENATORE, E. M.; BUTLER, W. R.; OLTENACU, P. A. Relationships between energy balance and postpartum ovarian activity and fertility in first lactation dairy cows. **J. Anim. Sci.**, v. 62, p. 17–23, 1996.

SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2. Ed. Pullman, USA: Current Conceptions, Inc.; Washington State University, 2003. 368 p.

SISTEMA de análise estatística e genética (**SAEG**), UFV, Central de processamento de dados, Viçosa – MG, 1999.

SMITH, M. F.; MCINTUSH, E. W.; SMITH, G. W. Mechanisms associated with corpus luteum development. **J. Anim. Sci.**, v. 72, p. 1857-1872, 1994.

SMITH, S. T.; WARD, W. R.; DOBSON, H. Use of ultrasonography to help to predict observed oestrus in dairy cows after the administration of prostaglandin F2 alpha. **Vet. Rec.**, v. 142, p. 271–274, 1998.

SPENCER, T. E.; BURGHARDT, R. C.; JOHNSON, G. A. et al. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 82-83, p. 537-550, 2004.

STARBUCK, G. R.; DARWASH, A. O.; MANN, G. E. et al. The detection and treatment of post insemination progesterone insufficiency in dairy cows. **British Soc. Anim. Science Occasional Publication**, v. 26, p. 447-450, 2001.

STARBUCK, M. J.; DAILEY, R. A.; INSKEEP, E. K. Factors affecting retention of early pregnancy in dairy cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 84, p. 27–39, 2004.

STOCK, L. A.; CARNEIRO, A. V.; YAMAGUCHI, L. C. T. Modelos de sistemas brasileiros de produção de leite. **Boletim CBLeite**, Juiz de Fora, v. 1, n. 1, p. 12-18, abr. 2007.

TENHAGEN, B. A.; DRILLICH, M.; HEUWIESER, W. Analysis of cow factors influencing conception rates after two timed breeding protocols. **Theriogenology**, v. 56, p. 831–838, 2001.

THATCHER, W. W.; MOREIRA, F.; PANCARCI, S. M. et al. Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 23, p. 243–254, 2002.

TOM, J. W.; PIERSON, R. A.; ADAMS, G. P. Quantitative echotexture analyses of bovine corpora lutea. **Theriogenology**, v. 49, p. 1345-1352, 1998.

VALLET, J. L.; LAMMING, G. E. Ovine conceptus secretory proteins and bovine recombinant interferon decrease endometrial oxytocin receptor concentrations in cyclic and progesterone treated ovariectomized ewes. **J. Endocrinology.**, v. 131, p. 475-482, 1991.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Regulação do crescimento oocitário e maturação em mamíferos. In: REUNIÃO ANUAL DA SBTE, 17., 2003, Beberibe. **Acta. Sci. Vet.**, v. 31, suppl., p. 172-205, 2003.

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

VASCONCELOS, J. L. M.; SILCOX, R. W.; ROSA, G. J. M. et al. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.52, p. 1067–78, 1999.

VIANA, J. H. M.; TORRES, C. A. A.; FERNANDES, C. A. C. et al. Avaliação ultrassonográfica do corpo lúteo em novilhas mestiças utilizadas como receptoras de embrião. **Arquivo Reprodução Animal**, v. 5, p. 42-47, 1998a.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A M.; SÁ, W. F. et al. Função luteal em vacas da raça Gir. XVI Encontro de Pesquisa da UFMG, **Anais ...**, p. 49, 1998b.

VILLA-GODOY, A.; HUGHES, T. L.; EMERY, R. S. et al. Association between energy balance and luteal function in lactating dairy cattle. **Journal Dairy Science**, V. 71, p. 1063-1072, 1988.

WALDMANN, A.; KURYKIN, J.; JAAKMA, U. et al. The effects of ovarian function on estrus synchronization with PGF in dairy cows. **Theriogenology**, v. 66, p. 1364-1374, 2006.

WATHES, D. C.; TAYLOR, V. J.; CHENG, Z. Follicle growth, corpus luteum function and their effect on embryo development in postpartum dairy cows. **Reproduction**, v. 61, suppl., p. 219-237, 2003.

WATTS, T. L.; FUQUAY, J. W. Age of the corpus luteum as possible limiting factor in prostaglandin F₂ α induced cycle synchronization. **J. Anim. Sci.**, v. 55, suppl. 1, p. 73, 1982.

WATTS, T. L.; FUQUAY, J. W. Response and fertility of dairy following injection with prostaglandin F₂ α during early, middle or late diestrus. **Theriogenology**, v. 23, n. 4, p. 655-661, 1985.

WEBB, R.; ARMSTRONG, D. G. Control of ovarian function: effect of local interaction and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. **Lives. Prod. Sci.**, v. 53, n. 2, p. 95-112, 1998.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; CAMPBELL, B. K. et al. Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. **Theriogenology**, v. 68, suppl., p. S22-S29, 2007.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; CAMPBELL, B. K. et al. Regulação intra-ovariana do desenvolvimento follicular e competência dos ovócitos em animais de produção. In: **Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos**, 12., 2008, Uberlândia. Apostila... Botucatu: Conapec Jr/UNESP, 2008. P. 66-76 (Módulo Leite).

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; GONG, J. G. et al. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. **J. Anim. Sci.** v. 82, p. E63-E74, 2004.

WEBB, R.; NICHOLAS, B.; GONG, J. G. et al. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. **Reproduction**, v. 61, p. 71-90, 2003.

WESTFAHL, P. K. Comparison of luteinized unruptured follicles and corpora lútea: steroid hormone production and response to luteolytic agents. **Biol. Reprod.**, v. 48, p. 807-814, 1993.

WILTBANK, M. C. Cell types and hormonal mechanisms associated with mid cycle corpus luteum function. **J. Anim. Sci.**, v. 72, p. 1873-1883, 1994.

WILTBANK, M. C. Uso eficaz de hormônios na reprodução: II. Programas de reprodução. In: **Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos**, 4., 2000. Passos, MG. Apostila... Botucatu: Conapec Jr./UNESP, p.71-88, 2000.

WILTBANK, M. C.; GALLAGHER, K. P.; CHRISTENSEN, A. K. et al. Physiological and immunocytochemical evidence for a new concept of blood for regulation in the corpus luteum. **Biology Reproduction**, v. 42, p. 139-149, 2000.

WILTBANK, M. C.; LOPEZ, H.; SARTORI, R. et al. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, v. 65, p. 17-29, 2006.

WILTBANK, M. C.; HAUGHIAN, J. M. Aspectos a serem considerados visando melhorar a eficiência reprodutivas de vacas leiteiras. In: **Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos**, 7., 2003, Uberlândia. **Apostila...** Botucatu: Conapec Jr./UNESP, 2003.

WILTBANK, M. C.; NIESWENDER, G. D. Functional aspects of differentiation and degeneration of the steroidogenic cells of the corpus luteum in domestic ruminants. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 28, p. 103-110, 1992.

WILTBANK, M. C.; PURLEY, R.; SILCOX, R. **Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos**. Botucatu: Conapec Jr., 1995a.

WILTBANK, M. C.; SHIAO, T. F.; BERGFECT, D. R. et al. Prostaglandin F_{2α} receptores in the early bovine corpus luteum. **Biology Reproduction**, v. 52, p. 74-78, 1995b.

WILTBANK, M. C.; SARTORI, R.; HERLIHY, M. M. et al. Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 76, p. 1568-1582, 2011.

YOUNGQUIST, R. S. Current therapy in large animal. **Theriogenology** – Section II – Chapter 32 (Clinical Reproductive Physiology of the cow). p. 257-267, 1997.