

**ANTONIO MATOS FRAGA JUNIOR**

**DINÂMICA FOLICULAR DE VACAS DA RAÇA GUZERÁ  
SUBMETIDAS A TRÊS PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DA  
OVULAÇÃO**

**GARANHUNS**

**2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E  
REPRODUÇÃO DE RUMINANTES**

**ANTONIO MATOS FRAGA JUNIOR**

**DINÂMICA FOLICULAR DE VACAS DA RAÇA GUZERÁ  
SUBMETIDAS A TRÊS PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DA  
OVULAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu

**GARANHUNS**

**2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E  
REPRODUÇÃO DE RUMINANTES**

**DINÂMICA FOLICULAR DE VACAS DA RAÇA GUZERÁ  
SUBMETIDAS A TRÊS PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DA  
OVULAÇÃO**

Dissertação elaborada por

**ANTONIO MATOS FRAGA JUNIOR**

Aprovada em ...../...../.....

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu**  
**Orientador**

---

**Prof. Dr. Antonio Jorge Del Rei Moura**  
**Avaliador**

---

**Dr. Antonio Santana dos Santos Filho**  
**Avaliador**

---

**Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro**  
**Avaliador**

*À Deus,*

*À minha família, em especial aos meus queridos pais, Antonio (in memoriam) e Ana, a quem devo eterna gratidão, pelo amor, incentivo e dedicação.*

*À minha esposa Jenniff, pelo amor, compreensão e apoio em todos os momentos desta nova fase e a nossa princesa Ágatha que chegou para alegrar mais ainda nossas vidas.*

***Dedico***

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, por tornar possível a realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu, pelos ensinamentos, dedicação, confiança, amizade, paciência e por ser um exemplo profissional e pessoal;

A toda minha família, sempre apoiando e fazendo o possível para que eu concluísse esta etapa;

Aos colegas de pós-graduação pelo apoio nas horas difíceis;

Aos amigos, Guilherme Veras, Paulo Povia, Felipe Sales, como também aos funcionários do IPA pelo apoio na realização do experimento;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Sanidade e Reprodução em Ruminantes que contribuíram para a minha formação profissional;

Ao amigos da Faculdade Pio Décimo, Francisco Diemerson, Josevânia Guedes, Roniery Galindo, Emerson Israel, Ana Carolina, pelo apoio;

A Professora Lenalda Dias dos Santos por ser fonte de inspiração e ter me incentivado me mostrando que eu posso alcançar sempre algo mais;

A FACEPE, pela concessão da bolsa de estudo;

Esta dissertação é o resultado do trabalho em conjunto e da colaboração de muitos amigos. Agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram a concluir mais esta etapa em minha vida.

*"Há homens que lutam um dia e são bons, há outros que lutam um ano e são melhores, há os que lutam muitos anos e são muito bons. Mas há os que lutam toda a vida e estes são imprescindíveis"*

*Bertold Brecht*

## RESUMO

### DINÂMICA FOLICULAR DE VACAS DA RAÇA GUZERÁ SUBMETIDAS A TRÊS PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO

Este trabalho teve por objetivo avaliar a dinâmica folicular de vacas da raça Guzerá tratadas com três protocolos para sincronização da ovulação onde se utilizaram implantes vaginais impregnados com progesterona ou o protocolo Ovsynch, além da utilização de benzoato de estradiol ou GnRH como indutor da ovulação. Foram utilizadas 18 vacas PO da raça Guzerá, múltíparas, não-lactantes, com idades entre quatro e sete anos, escore de condição corporal de 3,0 a 4,0 (escala de 1 a 5). Os animais foram mantidos em regime extensivo, onde a dieta fornecida supriu as exigências nutricionais, receberam sal mineral proteinado e água “*ad libitum*”. Os animais foram divididos em três grupos, No grupo 1 (n=6) foi aplicado no D0, mesmo dia do dispositivo intravaginal CIRDO<sup>®</sup>, 2 mg de benzoato de estradiol, no dia oito (D8), foram aplicados 0,530 mg de análogo de prostaglandina, 300 UI de eCG e foi retirado o dispositivo intravaginal, no dia nove (D9) foi aplicado 1 mg de benzoato de estradiol. No grupo 2 (n=6) foi aplicado no D0, mesmo dia do dispositivo intravaginal CIRDO<sup>®</sup>, 2 mg de benzoato de estradiol, no dia oito (D8), foram aplicados 0,530 mg de análogo de prostaglandina, 300 UI de eCG IM e foi retirado o dispositivo intravaginal, no dia nove (D9) foi aplicado 17 µg de um análogo do GnRH. No grupo 3 (n=6) foi aplicado no D0, 200 µg de análogo do GnRH, 0,530 mg de análogo da prostaglandina no dia sete (D7) no dia nove (D9) foi aplicado 100 µg de análogo do GnRH. A partir do dia zero até o dia 8 os animais foram examinados diariamente (24/24 h) por via trans-retal com auxílio de ultrassom. Após a retirada do implante no dia 8 (grupos 1 e 2) e aplicação da prostaglandina no dia 7 (grupo 3) os animais foram avaliados 4 vezes por dia (6/6 horas) até o dia 10 do protocolo. Uma nova emergência da onda folicular para os grupos 1, 2 e 3 ocorreu respectivamente, em  $2,6 \pm 0,16$ ;  $2,7 \pm 0,18$  e  $2,9 \pm 0,16$  dias, não havendo diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre os grupos (Tabela 1). Houve diferença estatística para os grupos 1, 2 e 3 no intervalo entre emergência da onda e ovulação em dias,  $7,1 \pm 0,18$ ;  $6,37 \pm 0,31$ ;  $5,33 \pm 0,66$ ; intervalo entre a retirada do implante e a ovulação em horas,  $64,2 \pm 6,99$ ;  $61,0 \pm 12,36$ ; intervalo entre a aplicação do indutor e a ovulação em horas,  $43,6 \pm 6,89$ ;  $41,0 \pm 11,25$ ;  $38,2 \pm 7,89$ , maior diâmetro do FD (dia 8),  $10,71 \pm 0,30$ ;  $9,41 \pm 0,24$ ;  $9,75 \pm 0,35$ , maior diâmetro do FD (dia 10),  $13,1 \pm 0,23$ ;  $11,7 \pm 0,22$ ;  $12,0 \pm 0,34$ ; Média de crescimento do folículo até dia 8 – (mm/dia),  $1,36 \pm 0,07$ ;  $0,92 \pm 0,10$ ;  $1,10 \pm 0,11$ ; Média de crescimento do folículo do dia 8-10 – (mm/dia),  $2,40 \pm 0,08$ ;  $2,28 \pm 0,11$ ;  $2,23 \pm 0,10$  e na porcentagem de animais que ovularam, 83,34% (5/6), 66,67% (4/6), 50% (3/6). Portanto os protocolos dos grupos experimentais 1 e 2 se mostraram mais eficientes em promover a sincronização da ovulação e são indicados para utilização em programa de inseminação artificial em tempo fixo em vacas da raça Guzerá.

Palavras-chave: Benzoato de Estradiol, GnRH, Ovsynch, indutor da ovulação.

## ABSTRACT

This study aimed to assess the follicular dynamics of Guzerat cows treated with three protocols for synchronization of ovulation where they used vaginal implant impregnated with progesterone or the Ovsynch protocol, besides the use of estradiol benzoate or GnRH to induce ovulation. There were used 18 PO Guzerat cows, multiparous non-lactating, aging between four and seven years, good body score condition, ranging from 3.0 to 4.0. The animals were kept in extensive management, where the diet provided met the nutritional requirements including protein mineral salt and water "ad libitum". The animals were divided into three groups, in group 1 (n = 6) it was applied at the D0, an intravaginal device CIDR<sup>®</sup> along with 2 mg of estradiol benzoate, at D8 it was administered 300 mg of a prostaglandin analogue and 300 IU of eCG besides intravaginal device removal, at D9 it was administered 1 mg of estradiol benzoate and at D11 artificial insemination was carried out. In group 2 (n = 6) it was used the same protocols as in group 1 except for the induction of ovulation when it was used 17 mg of a GnRH analogue and at D11 artificial insemination was carried. In group 3 (n = 6) was applied at D0, 200 mg of GnRH analogue, 0.530 mg of prostaglandin analogue at D7, at D9 it was administered 100 mg of GnRH analogue and at D10 artificial insemination was carried. From D0 to D8 animals were examined daily (24/24 h) by transrectal ultrasound. After removal of the implant on D8 in groups 1 and 2 and application of prostaglandin D7 (group 3) animals were assessed four times a day (6/6 hours) until D10 of the Protocol. A new follicular wave emergence for groups 1, 2 and 3 was observed respectively,  $2.6 \pm 0.16$ ;  $2.7 \pm 0.18$  and  $2.9 \pm 0.16$  days, with no statistical difference ( $P < 0.05$ ) between groups. There was statistical difference for groups 1, 2 and 3 in the range of wave emergence and ovulation in days,  $7.1 \pm 0.18$ ;  $6.37 \pm 0.31$ ;  $5.33 \pm 0.66$ , the interval between implant removal and ovulation in hours,  $64.2 \pm 6.99$ ,  $61.0 \pm 12.36$ , interval between the application of inducing ovulation and in hours,  $43.6 \pm 6.89$ ,  $41.0 \pm 11.25$ ,  $38.2 \pm 7.89$ , greatest diameter of the DF (day 8),  $10.71 \pm 0.30$ ,  $9.41 \pm 0.24$ ,  $9.75 \pm 0.35$ , greatest diameter of the DF (day 10),  $13.1 \pm 0.23$ ,  $11.7 \pm 0.22$ ,  $12.0 \pm 0.34$ , Average follicle growth until day 8 - (mm / day),  $1.36 \pm 0.07$ ,  $0.92 \pm 0.10$ ,  $1.10 \pm 0.11$ , Average follicle growth of 8-10 days - (mm / day),  $2.40 \pm 0.08$ ,  $2.28 \pm 0.11$ ,  $2.23 \pm 0.10$  and the percentage of animals that ovulated, 83.34% (5/6), 66.67% (4/6), 50% (3/6). So the protocols of experimental groups 1 and 2 were more effective in promoting the synchronization of ovulation and are indicated to be used in a program of fixed-time artificial insemination in Guzerat cows.

Keywords: Estradiol benzoate, GnRH, Ovsynch, ovulation induction.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 – Esquema do Protocolo dos grupos experimentais.....</b>	<b>66</b>
<b>Figura 2 – Dinâmica folicular dos animais do grupo 1 (BE+BE) do D0 ao D10.....</b>	<b>73</b>
<b>Figura 3 – Dinâmica folicular dos animais do grupo 2 (BE+GnRH) do D0 ao D10.....</b>	<b>74</b>
<b>Figura 4 – Dinâmica folicular dos animais do grupo 3 (OVSYNCH) do D0 ao D10.....</b>	<b>74</b>

## **LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1 – Dia da emergência da onda folicular e intervalos entre emergência, retirada do implante e aplicação do indutor para a ovulação de vacas da raça Guzerá tratadas com três protocolos para sincronização da ovulação.....</b>	<b>68</b>
<b>TABELA 2 – Diâmetro e média de crescimento folicular de vacas da raça Guzerá tratadas com três protocolos para sincronização da ovulação.....</b>	<b>70</b>
<b>TABELA 3 – Porcentagem vacas da raça Guzerá que ovularam, tratadas com três protocolos para sincronização da ovulação.....</b>	<b>70</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfatados
AVPV	Região periventricular anteroventral
BE	Benzoato de estradiol
BMP-15	Proteína morfogenética do osso-15
Ca <sup>++</sup> ,	Cálcio
CAP	6-cloro-6-dehidro-17-acetoxyprogesterona
CE	Cipionato de estradiol
CIDR	Dispositivo intravaginal para controle do cio em bovinos
CL	Corpo lúteo
DHPA	Acetofenide-dihidroxiogesterona
DIB	Dispositivo intravaginal bovino
E2	17 $\beta$ estradiol
eCG	Gonadotrofina coriônica eqüina
EGF	Fator de crescimento epidermal
ER $\alpha$	Isoforma de receptor de estrógeno $\alpha$
ER $\beta$	Isoforma de receptor de estrógeno $\beta$
FD	Folículo dominante
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
GABA	Ácido gama amino butírico
GDF-9	Fator de crescimento de diferenciação-9
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
IA	Inseminação artificial
IATF	Insemnação artificial em tempo fixo
IM	Intramuscular
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina-1
KL	Kit ligand
LH	Hormônio luteinizante
MAP	6-metil-17-acetoxi-proges-terona
MGA	Acetato de melengestrol
mL	Mililitro

mm	Milímetro
ng	Nanograma
NG	Norgestome+
P4	Progesterona
PAPP-A	Proteína plasmática associada à gestação
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina f2
PGs	Prostaglandinas
PRID	Progesterone releasing intravaginal device
RNA	Ácido ribonucleico
TGF- $\beta$	Fatores de crescimento transformantes $\beta$
VE	Valerato de estradiol
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
VS	Verso
%	Porcentagem
<	Menor que
>	Maior que
g	Gramma
h	Hora
=	Igual
°C	Graus Celsius
®	Marca registrada
$\mu$	Micro
$\pm$	Mais ou menos

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1 Ciclo Estral.....	17
3.2 Endocrinologia do Ciclo Estral.....	18
3.3 Dinâmica Folicular.....	21
3.4 Sincronização de Estro e da Ovulação.....	24
3.4.1 Progesterona / Progestágenos.....	25
3.4.2 Estrógenos e Suas Associações com Progesterona.....	26
3.4.3 Hormônio Liberador de Gonadotropinas (GnRH) .....	28
3.4.4 Prostaglandinas.....	29
3.5.5 Sincronização com Associação de GnRH e Prostaglandina - (Ovsynch).....	30
4. REFERÊNCIAS.....	33
5. ARTIGO CIENTÍFICO - Dinâmica folicular de vacas da raça Guzerá submetidas a três protocolos de sincronização da ovulação.....	61
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80
7. APÊNDICES.....	81

## 1. INTRODUÇÃO

Na atividade pecuária atualmente exige-se máxima eficiência de produção para garantia de retorno econômico. Desta forma, elevados índices de produção, associados à alta eficiência reprodutiva, devem ser metas que norteiam os técnicos e criadores a alcançarem maior produtividade e satisfatório retorno econômico na atividade. Neste contexto, a otimização da eficiência reprodutiva é um dos principais fatores que contribuem para melhora do desempenho produtivo e da lucratividade dos rebanhos bovinos (BARUSELLI, et al., 2004).

Para que essa eficiência seja alcançada em um rebanho é necessário que todos os aspectos fisiológicos, nutricionais e de manejo estejam perfeitamente integrados e em pleno funcionamento. A rentabilidade na exploração de bovinos de corte é diretamente dependente da porcentagem de vacas que são capazes de obter um intervalo de partos em torno de 365 dias. Isto implica na necessidade da concepção acontecer no máximo até o 85º dia pós-parto (OLIVEIRA FILHO et al., 1999).

Com o intuito de maximizar esses índices várias técnicas vêm sendo desenvolvidas, como a transferência de embriões, inseminação artificial em tempo fixo, e produção *in vitro* de embriões. Porém ainda são escassos os estudos sobre a fisiologia reprodutiva de fêmeas submetidas a protocolos hormonais. (FERRAZ et al., 2008).

Segundo Ball et al. (2006), para maximização do potencial reprodutivo, especialmente de fêmeas domésticas, é importante estudar a foliculogênese a fim de se compreender os mecanismos e fatores envolvidos neste evento. Compreender os fenômenos fisiológicos associados ao crescimento folicular e à ovulação é fundamental para aperfeiçoar as biotecnias da reprodução e, conseqüentemente, a eficiência reprodutiva dos rebanhos (BARUSELLI et al., 2007).

A dinâmica folicular representa um dos aspectos mais importantes da fisiologia ovariana, sendo intensamente estudada em raças taurinas (SAVIO et al., 1988; SIROIS e FORTUNE, 1994; BADINGA et al., 1994). O número de trabalhos com raças zebuínas (*Bos taurus indicus*) e seus mestiços é, contudo, reduzido, particularmente nas raças de maior importância para a pecuária nacional (FIGUEIREDO et al., 1997; GAMBINI et al., 1998).

A fisiologia reprodutiva de vacas zebuínas é diferente de vacas taurinas. As diferenças são relatadas em características como área de tecido luteal, baixa capacidade de secretar LH, alterações de comportamento na detecção de cio, diâmetro do folículo dominante (BARROS et al., 2000; FIGUEIREDO et al., 1997), duração do estro (MEDRANO et al., 1996) e diâmetro folicular no momento da divergência e na ovulação (PINHEIRO et al., 1998).

A dificuldade de detecção do estro é um dos fatores que limitam o desempenho reprodutivo em bovinos. A baixa taxa de detecção do estro acarreta comprometimento da eficiência reprodutiva com conseqüente aumento do período de serviço e do intervalo entre partos e diminuição da taxa de prenhez. (BARUSELLI e MARQUES, 2002).

Fêmeas *Bos indicus* apresentam estro por aproximadamente 10 horas (BÓ et al., 2003). Somado a este fator, mais de 50% dos animais desse grupo genético iniciam a manifestação de estro no período noturno, sendo que cerca de 30% iniciam e encerram o estro durante a noite (PINHEIRO et al., 1998), dificultando o manejo e reduzindo a eficácia da detecção de estro.

Para evitar estes problemas em rebanhos de cria, foram desenvolvidos protocolos de sincronização que permitem inseminar um grande número de animais num período de tempo estabelecido. Estes tratamentos são conhecidos como protocolos de inseminação artificial a tempo fixo (IATF), e se dividem entre os que utilizam combinações de GnRH e PGF2 $\alpha$ , e os que utilizam dispositivos com progesterona ou progestágenos (análogos sintéticos da progesterona) e estradiol (BARUSELLI e MARQUES, 2002).

A utilização da ultrassonografia na reprodução de grandes animais possibilitou o entendimento do desenvolvimento folicular, o que permite verificar as particularidades da fisiologia reprodutiva e assim, propor protocolos adequados para a melhoria da eficiência reprodutiva dos bovinos. (VIANA et al., 2000)

Este conhecimento, através do entendimento do comportamento das ondas de crescimento folicular (dinâmica folicular), favorece a execução de programas de superovulação (AMSTRONG, 1993; ADAMS, 1994) e sincronização do cio (VIANA et al., 2000) e da ovulação (GAMBINI et al., 1998).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho teve por objetivo realizar um estudo ultrassonográfico e determinação do momento da ovulação de vacas da raça Guzará submetidas a três protocolos de sincronização do estro e da ovulação visando à realização de inseminações artificiais em tempo fixo (IATF) para obtenção de taxas de prenhez mais consistentes, assim será possível: Formar lotes uniformes para que o produtor rural possa atender o mercado consumidor e que sejam programadas as partições em épocas específicas quando houver maior disponibilidade de forragens.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estudar a dinâmica folicular durante os protocolos que empregam progestágeno associado à GnRH e benzoato de estradiol para sincronização da ovulação;
- Estudar a dinâmica folicular durante o protocolo que emprega GnRH associado à prostaglandina (PGF $2\alpha$ ) para sincronização da ovulação;



### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 CICLO ESTRAL

O ciclo estral é definido como o conjunto de alterações endócrinas, comportamentais e morfológicas ocorridas entre dois estros sucessivos na fêmea bovina que é controlado por uma complexa interação neuroendócrina, coordenada pelo eixo hipotálamo-hipófise-ovário-útero. Esse controle ocorre através de um sistema de regulação no qual um hormônio ou produto de secreção pode inibir a liberação de outro hormônio (retro-alimentação negativa) ou, ao contrário, estimular a síntese e liberação de uma maior quantidade de outro hormônio (retro-alimentação positiva). Esses mecanismos estabelecem uma dinâmica folicular a qual permite o desenvolvimento de um folículo maduro capaz de ovular em momento propício e produzir assim, uma célula capaz de ser fecundada. (MORAES et al., 2001).

A duração do ciclo estral dos bovinos varia entre 17 e 25 dias e é dividido em fase luteínica, que vai da ovulação até a luteólise (em média dia 17) e na fase folicular, que vai da luteólise até a ovulação (BAIRD e MCNEILLY, 1981), com semelhanças entre as fêmeas zebuínas e taurinas (BARROS; FIGUEIREDO; PINHEIRO, 1998; SIROIS; FORTUNE, 2001; VACA et al., 1985). Nesse intervalo, o desenvolvimento folicular se apresenta como uma sequência dinâmica de eventos fisiológicos e endocrinológicos que envolvem o crescimento e a atresia dos folículos antrais, em movimentos que se assemelham a ondas (PIERSON; GHINTER, 1984).

A fase luteínica é caracterizada por um ovário contendo um corpo lúteo (CL), que é resultante do folículo ovulatório. Com a progressão da fase lútea, o CL produz um volume crescente de progesterona, o qual atinge um platô e se mantém até a luteólise. A fase folicular é caracterizada pela presença de um grande folículo que ovulará na ausência de um corpo lúteo (PANT et al., 1977).

### 3.2 ENDOCRINOLOGIA DO CICLO ESTRAL

Após a puberdade, a fêmea desenvolve um padrão rítmico de eventos fisiológicos que promovem alterações morfológicas no sistema reprodutor e mudanças comportamentais no animal. Estas modificações fisiológicas e de comportamento são cíclicas e contínuas, sendo interrompidas pela gestação ou alguma condição patológica. (PETERSEN et al.; 2003)

Os principais hormônios envolvidos são: GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas - proveniente do hipotálamo), FSH e LH (Hormônio Folículo Estimulante e Hormônio Luteinizante, respectivamente – provenientes da hipófise), Estradiol e Progesterona (dos ovários) e Prostaglandina (proveniente do útero). O estradiol é produzido pelos folículos ovarianos e a progesterona é produzida pelo corpo lúteo (MAPLETOFT e KASTELIC, 1997).

A hipófise apresenta duas grandes regiões: o lóbulo anterior (adenohipófise) e o posterior (neurohipófise). O lóbulo anterior não contém fibras nervosas, não tem contato neural direto com o hipotálamo. A comunicação se dá através de um sistema vascular, chamado sistema porta-hipofisário. O lóbulo posterior está constituído de tecido neural e se conecta com o hipotálamo pelo pedúnculo hipotálamo-hipofisário (PAGE, 1994).

O GnRH é produzido no hipotálamo, na área pré-óptica e no núcleo arqueado, o qual é uma estrutura do diencefalo que rodeia o terceiro ventrículo. Essa área recebe inúmeras informações externas (ex. visual, tátil e olfatória) através de neurônios que convergem para o hipotálamo. Daí a informação é processada e modificada para ser enviada à hipófise como um sinal humoral e/ ou neural. Esse hormônio é um decapeptídeo, com vida média de dez minutos, que controla a síntese de FSH e LH e a liberação de LH (EDQVIST, 1997).

O controle da liberação de GnRH é feito pelos esteróides gonadais, progesterona e estrógeno. No entanto, não existem receptores para esses esteróides diretamente nos neurônios que expressam GnRH. A ação desses hormônios se dá via sistemas neurais esteróides sensitivos. Um exemplo desses sistemas é o ácido gama amino butírico (GABA). Esses neurônios contêm receptores para esteróides e fazem sinapse com os neurônios sintetizadores de GnRH. Quando as concentrações de progesterona estão elevadas, deprimindo a síntese de GnRH, as concentrações de GABA estão aumentadas.

Quando as concentrações de GABA estão diminuídas, o estradiol estimula o GnRH durante a fase folicular (ROBINSON, 1995). Petersen et al (2003) sugerem que o estradiol regula não só indiretamente, mas também diretamente o GnRH. Foi descoberta uma segunda isoforma de receptor de estrógeno chamada (ER $\beta$ ) (KUIPER et al, 1996). Aliado a isso, também foi encontrado RNA mensageiro para ER $\alpha$  e ER $\beta$  nas células GT1 (células neuronais da região pré-óptica hipotalâmica).

Essas células possuem sítios específicos de ligação para o estrógeno, principalmente para ER $\beta$ . A ação indireta seria através de sistemas neurotransmissores GABA/ Glutamato sobre a região periventricular anteroventral (AVPV), região próxima ao núcleo supraquiasmático, a qual possui abundantes quantidades de RNA mensageiro para ER $\alpha$  e ER $\beta$  nas suas células (SYMERLY et al., 1990; SYMERLY, 1998; SHUGHRUE et al., 1997).

O LH e o FSH, produzidos na adenohipófise, são glicoproteínas com um peso molecular próximo de 30.000 Kda, formados por duas subunidades diferentes chamadas alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ). A subunidade alfa é idêntica para os dois hormônios, enquanto que a beta é única para cada hormônio em cada espécie, e é determinante da atividade biológica de cada hormônio. Ambas as cadeias peptídicas estão unidas por pontes de hidrogênio e Forças de Van der Waals (EDQVIST, 1997). A regulação da transcrição dos genes das gonadotrofinas está sob controle do GnRH e de outros fatores gonadais ou hipotalâmicos (esteróides ou polipeptídeos) (COMBARNOUS, 1993).

O FSH é um hormônio chave para estimular a emergência das ondas foliculares, sendo o seu declínio associado com a seleção de um folículo dominante o qual se desenvolverá e passará a ser dependente de LH. Estas gonadotrofinas são armazenadas em grânulos secretórios no citoplasma e são diferentemente secretadas por exocitose. O LH é armazenado de forma prolongada durante o ciclo, mas muito pouco FSH é armazenado. Na ovelha, a quantidade de FSH na pituitária anterior é somente 2 a 3% da quantidade de LH. (McNEILLY et al., 1995).

O GnRH se liga a receptores específicos nos gonadotrofos e promove a liberação de Ca $^{++}$ , causando uma rápida liberação de ambos, FSH e LH. Os gonadotrofos podem se tornar insensíveis ao GnRH, e a natureza de liberação em pulsos é fundamental para prevenir “downregulation” de seus receptores. A liberação de GnRH resulta na liberação de LH e essa frequência é controlada pelo “feedback” da progesterona e do estradiol. A liberação de FSH não tem caráter pulsátil e geralmente não é coincidente com a liberação

de LH. Portanto, a liberação de LH depende da frequência de liberação de GnRH, enquanto que o FSH tem liberação constitutiva, na qual a síntese é seguida de sua liberação (ROCHE, 1996).

O controle da liberação de FSH é feito por inibina e estrógenos que atuam diretamente na pituitária anterior, diminuindo a expressão do gene que codifica a subunidade  $\beta$  desse hormônio. Ambos atuam diminuindo a transcrição e estabilidade do RNA mensageiro, efeito o qual sobrepõe a ação do GnRH sobre a liberação de FSH (ROCHE, 1996).

O mecanismo de ação das gonadotrofinas nas suas células-alvo ocorre através de receptores específicos na superfície celular. O FSH atua nas células da granulosa e o LH possui receptores nas células da granulosa, células da teca e, ainda, no corpo lúteo. A região N – terminal do receptor é extracelular e responsável pela ligação com o hormônio. A região intracelular está acoplada a proteína G e, no momento da ligação gonadotrofina-receptor, faz a ativação de segundos mensageiros. (BARUSELLI e MARQUES, 2002).

Ambos hormônios ativam a enzima adenilato ciclase na membrana plasmática, consumindo ATP, gerando AMP cíclico, o qual promove uma cascata de fosforilação das quinases dependentes de cAMP (proteína quinase A – PK-A). A PK-A ativada controla inúmeros aspectos da função celular através da fosforilação de substratos protéicos. Após a interação receptor-ligando, o complexo é internalizado por endocitose e degradado pelos lisossomas. Assim o receptor é reciclado de volta à membrana celular por exocitose (CATT, 1996).

O FSH, através do complexo aromatase, estimula a produção de estradiol a partir de andrógenos. Como nas células da granulosa são baixas as quantidades de andrógenos, devido a baixas concentrações de enzimas que participam na sua síntese, o LH atua nas células da teca interna, aumentando a produção desses andrógenos. Os andrógenos são convertidos a estrógenos, principalmente o estradiol-17  $\beta$ , através da enzima P450 aromatase. O principal esteróide secretado pelas células da granulosa é a pregnenolona, e essa é também utilizada nas células da teca para ser convertida em andrógenos (SHAMS e BERISHA, 2002).

Durante a fase luteínica, a progesterona do corpo lúteo faz com que a frequência de liberação de LH se mantenha baixa, um pulso a cada quatro/seis horas na fase de platô da progesterona, e amplitude alta. Assim, é muito baixa a secreção de androstenediona pelas células da teca, e, em consequência, a de estradiol pelas células da granulosa. Em razão

disso, os folículos dominantes que ocorrem nessa fase não ovulam e entram em atresia (BAIRD, 1976; TURNBULL et al., 1977).

No final da fase luteínica, inicia-se uma série de eventos que culminam com a perda da capacidade de secreção da progesterona e com a morte das células e a perda da estrutura. (McGUIRE et al., 1994) Essa regressão depende do aumento nos pulsos de PGF2 $\alpha$ . O estradiol secretado pelos folículos durante o ciclo estral estimula a síntese de receptores de ocitocina no endométrio. Paralelamente, a secreção de ocitocina pelo corpo lúteo atua sobre o endométrio estimulando assim a liberação de PGF2 $\alpha$ . Após a luteólise, o estradiol-17 $\beta$  produzido, principalmente, pelo folículo dominante irá promover um estímulo de “feedback” positivo sobre a liberação de GnRH, alterando a frequência de pulsos de GnRH e LH (PATE, 1994).

Ocorre então um aumento na frequência de pulsos, em torno de um por hora, e uma diminuição na amplitude (MORAES et al., 2001). Devido à baixa amplitude dos pulsos de LH, o ovário (folículos) responde a cada um desses pulsos com um pulso de androstenediona e estradiol (BAIRD, 1978, CAMPBELL et al., 1990). Com o aumento da frequência de pulsos, há um aumento das concentrações médias de LH e um correspondente aumento na secreção de esteróides ovarianos (BAIRD, 1978, CAMPBELL et al., 1990). A secreção de estradiol aumenta a um nível suficiente para induzir o comportamento de estro e desencadear o pico de LH e ovulação (SCARAMUZZI, 1975). Esse pico é caracterizado por um rápido aumento dos níveis basais para uma concentração de 20 a 100 ng/ mL dentro de 4-8 horas, com o retorno às concentrações basais 10 horas depois (LAND et al., 1973; THIÈRY e MARTIN, 1991).

### **3.3 DINÂMICA FOLICULAR**

O processo contínuo de crescimento e regressão de folículos antrais que leva ao desenvolvimento do folículo pré-ovulatório no ovário é conhecido como dinâmica folicular ovariana, o qual envolve o desenvolvimento sincronizado de um grupo de folículos, denominado onda folicular (GINTHER, et. al. 1989).

Essa teoria das ondas foliculares foi proposta por Rajakoski (1960), que realizou estudos histológicos em ovários obtidos em matadouros. Com base nessas observações, o

autor sugeriu a existência de duas ondas de desenvolvimento de folículos antrais durante o ciclo estral, cada um delas com um folículo crescendo até o diâmetro pré-ovulatório.

O ovário dos mamíferos é constituído, ao nascimento, por milhares de folículos primordiais, os quais são considerados o pool de reserva dos folículos ovarianos. Entretanto, mais de 99,9% destes folículos nunca atingem a ovulação, visto que a maioria morre por um processo fisiológico designado atresia folicular (BÓ et al., 2000).

A ferramenta que permitiu grandes avanços no entendimento da dinâmica dos processos ovarianos durante o ciclo estral foi, sem dúvida, a técnica de ultrassonografia. Com a caracterização e monitoramento das estruturas presentes nos ovários (folículos e corpos lúteos), foi possível estabelecer que o crescimento folicular ocorre na forma de ondas e que essa dinâmica é verificada em diversas fases da vida de uma fêmea desde duas semanas de vida até a pré-puberdade (BOLAMBA et al., 1994), puberdade, gestação (GINTHER et al., 1996) e no pós-parto (MURPHY et al., 1990, SAVIO, 1990).

Uma onda de crescimento folicular envolve o desenvolvimento sincrônico de um grupo de folículos (GINTHER et al., 1989), e é caracterizada pelo desenvolvimento de um grande folículo, chamado dominante, e vários folículos subordinados; o dominante será anovulatório se ocorrer durante a fase em que o corpo lúteo encontra-se ativo secretando altos níveis de progesterona e ovulatório se ocorrer no momento em que os níveis de progesterona estiverem baixos devido à luteólise (GINTHER et al., 1996). A vaca apresenta de duas a três ondas por ciclo estral e raramente pode apresentar uma ou quatro ondas (GINTHER et al., 1989).

Para o padrão de duas ondas, a primeira onda começa, em média, no dia zero (dia da ovulação) e a segunda onda começa no dia dez (GINTHER et al., 1989). Para o padrão de três ondas, a emergência das ondas ocorrem, em média, nos dias zero, nove e 16, sendo as duas primeiras anovulatórias. De cinco a dez folículos são recrutados por onda de crescimento folicular (DRIANCOURT, 2001). O corpo lúteo (CL) inicia sua regressão mais cedo em vacas com ciclos de duas ondas (dia 16) que em animais com três ondas (dia 19) determinando uma amplitude de 20 a 23 dias no intervalo interovulatório. Em ambos os casos, o folículo dominante que está presente no momento da luteólise se torna o folículo ovulatório e a emergência da onda seguinte se dará após a ovulação (SANTOS, 1993).

Existem diferenças na dinâmica folicular entre *Bos tauros* e *Bos indicus*. Uma particularidade observada entre zebuínos e taurinos diz respeito ao número de ondas de

crescimento folicular por ciclo estral. Estudos realizados em animais da raça holandesa demonstraram predominância de duas e três ondas de crescimento folicular por ciclo estral (SAVIO et al., 1988; FORTUNE, 1994; GINTHER et al., 1989; WOLFENSON et al., 2004). Contudo, em zebuínos existem relatos que descrevem maior incidência de três ondas, sendo notificada a presença de até quatro ondas de crescimento folicular por ciclo estral (Brahman – RHODES et al., 1995; Nelore – FIGUEIREDO et al., 1997; Gir – VIANA et al., 2000).

Além das diferenças no número de ondas, existem trabalhos que evidenciam que fêmeas *Bos indicus* recrutam maior número de folículos por onda de crescimento folicular que fêmeas *Bos tauros* ( $33,4 \pm 3,2$  vs.  $25,4 \pm 2,5$ ; CARVALHO et al., 2007). Existem relatos de que o número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular apresenta diferenças entre indivíduos, e essa característica possui alta repetibilidade durante a vida reprodutiva da fêmea (BONI et al., 1997).

Com relação à fertilidade, sabe-se que não há diferença entre animais que apresentam ciclos de duas ou três ondas. No entanto, fatores como estresse calórico, nível nutricional e anestro lactacional podem afetar o padrão de desenvolvimento folicular (BÓ et al., 2000).

A aquisição de receptores para LH nas células da granulosa é o fator diferencial do folículo que se tornará dominante em relação aos demais folículos em crescimento (BAO et al., 1997). Outra característica do FD é a sua alta capacidade de produzir estradiol. No dia cinco do ciclo estral, é muito maior a concentração de estradiol no FD em relação aos seus subordinados e acredita-se que isso reflita diretamente com o término do aumento na concentração de FSH e na manutenção de níveis basais desse hormônio (FORTUNE et al., 2001).

O FD é o maior responsável pela queda dos níveis de FSH e também o que consegue crescer mesmo sob baixos níveis desse hormônio. Estradiol intrafolicular, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e ativinas parecem estar envolvidos na capacidade do FD de responder às alterações nas gonadotrofinas (BEG et al., 2002). Quando as concentrações de FSH declinam, os folículos demonstram mudanças em suas características tais como: redução da sua atividade estrogênica, redução nos níveis de inibinas de alto peso molecular e aumento de proteínas ligadoras de IGF (IGFBPs) culminando com a apoptose das células da granulosa. Somente o FD é capaz de manter a

proliferação celular, acumular fluidos foliculares e aumentar sua capacidade esteroidogênica nesse ambiente de queda do FSH circulante (BÓ et al., 2000).

### **3.4 SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO E DA OVULAÇÃO**

Uma das biotecnologias que trouxeram um grande avanço no manejo reprodutivo e que permitiu melhorar as taxas de prenhez foi o desenvolvimento de programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). A IATF tem como base sistemas de controle do desenvolvimento de folículos ovarianos, indução da ovulação e formação de corpo lúteo (CL) capaz de manter a prenhez sem a necessidade da detecção de estro e maximizando a taxa de serviço. As estratégias para controlar a ovulação consistem em provocar a luteólise com PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , inibir a ovulação com progesterona, induzir a emergência da onda folicular e o desenvolvimento de um folículo dominante e sincronizar a ovulação (BARUSELLI, et al., 2004).

Além de permitir concentrar o momento da inseminação e da parição em épocas desejadas de acordo com cada sistema produtivo. Um programa de sincronização eficiente deve ser capaz de induzir altos percentuais de animais em estro com fertilidade similar a um processo fisiológico, pois o sistema produtivo eficaz requer altos percentuais de bezerros nascidos e desmamados (VERAS et al., 2007).

Entre os fatores que limitam seu uso estão o custo dos produtos utilizados, as dificuldades na execução de alguns tratamentos (manejo), o desconhecimento dos técnicos dos princípios básicos de fisiologia reprodutiva, e ainda, os resultados obtidos na primeira inseminação que, na maioria das vezes, são inferiores aos de um estro natural (GRUNERT, 1984; LARSON e BALL, 1992).

Estes processos envolvem a secreção inter-relacionada de hormônios hipotalâmicos, da hipófise anterior, dos ovários e do útero. O principal mecanismo de regulação do ciclo estral bovino é a regressão do corpo lúteo, que ocorre em fêmeas cíclicas normais ao redor do dia 17–18. Desta forma, o CL - considerado uma glândula endócrina temporária, com a função de produzir P4 – constitui-se no elemento-chave de vários processos reprodutivos, incluindo a ovulação e a duração do ciclo estral (MILVAE et al., 1996).



As formas de controle do ciclo estral em bovinos são baseadas na extensão ou redução da fase luteínica - uso de progestágenos ou prostaglandinas - e na modificação dos padrões da onda folicular através da administração de E2 ou hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). No entanto, ambos os métodos agem diretamente no estado funcional do CL e são limitados para produzir grau de sincronia ovariana perfeito. Além disso, apresentam variabilidade de respostas, que estão sempre associadas à redução na taxa de fertilidade e ao aumento na duração do processo que, por sua vez, interferem na IATF (MACMILLAN; BURKE, 1996).

### **3.4.1 PROGESTERONA / PROGESTÁGENOS**

O termo progesterona foi criado por Corner e Allen em 1929, no mesmo ano em que foi pela primeira vez isolada na sua forma cristalizada e, então, sintetizada a partir da conversão de extratos de soja na substância ativa. (RATHBONE et al., 2001)

A primeira proposta capaz de manipular o ciclo estral em bovinos partiu de CHRISTIAN e CASIDA (1948), que sugeriram o uso da progesterona para bloquear a função reprodutiva. No início da década de 40 a progesterona tornou-se disponível a partir de precursores de origem vegetal (RATHBONE et al., 2001), enquanto que na década de 50, diversos progestágenos ativos por via oral foram sintetizados na busca por contraceptivos para mulheres. Rapidamente estes produtos poderiam substituir a P4 produzida pelo CL (BURSI; GROEN, 2000).

O início do uso dos progestágenos data da década de 50, sendo que nas primeiras utilizações estes eram administrados por um período de 11 a 14 dias. Independente da via de administração foi observado que, quando os tratamentos com progestágenos eram mantidos por períodos longos, estes resultavam em melhor sincronização de estros, porém com índices de concepção piores à inseminação. Quando o período de tratamento foi encurtado (nove dias), obteve-se pior sincronia, todavia com melhores índices de concepção (BOYD et al., 1973).

A injeção de progesterona diariamente é capaz de suprimir o estro em ovinos, bovinos e suínos, intervindo na formação ou manutenção do corpo lúteo. Este efeito se dá

pela inibição da liberação de LH, impedindo a maturação do folículo de Graff (MACMILLAN et al., 1991).

A progesterona apresenta diversos análogos sintéticos, chamados de progestógenos: 6-metil-17-acetoxi-proges-terona (MAP), 6-cloro-6-dehidro-17-acetoxiprogesteronona (CAP), acetofenide-dihidroxiprogesteronona (DHPA), acetato de melengestrol (MGA) e o norgestomet (NG). (RATHBONE et al., 2001)

Diversas vias de administração foram testadas e demonstraram ser eficientes na sincronização do estro: via oral (RATHBONE et al., 2001), subcutânea na região do pescoço (DZIUK et al., 1966) e implantes intravaginais (esponjas impregnadas com progesterona) (CARRICK e SHELTON, 1967).

Atualmente existem no mercado diversos dispositivos liberadores de P4 e progestágenos com a finalidade de sincronizar a ovulação para a IATF. Como exemplo, temos: DIB® (Syntex) - 1,0g de P4, dispositivo intravaginal (BÓ; BARUSELLI, MARTINEZ, 2003); CIDR® (Pfizer) - 1,9g de P4, dispositivo intravaginal (MACMILLAN et al., 1991), posteriormente reconfigurado com 1,38g de P4 (RATHBONE et al., 2002); PRID® (Sanofi) - 1,55g de P4, dispositivo intravaginal (WINKLER et al., 1977); Crestar® (Intervet) - 3,0mg de norgestomet, dispositivo auricular e Cronipres® (Biogenesis-Bagó) - 1,0g de P4, dispositivo intravaginal. Inserido por um determinado período evita a ovulação do folículo dominante, mas permite o crescimento folicular. A quantidade de P4 liberada pelo CIDR® (1,9g de P4) é altamente predizível com valores médios de concentrações plasmáticas em torno de 5 a 6ng/mL e conteúdo médio residual de 0,92g (MACMILLAN et al., 1991).

### **3.4.2 ESTRÓGENOS E SUAS ASSOCIAÇÕES COM PROGESTERONA OU PROGESTÁGENOS**

As baixas taxas de concepção obtidas após o emprego de progestágenos, na forma oral, procurando sincronizar estro nos anos 60, promoveram uma revisão de conceitos por parte dos pesquisadores. (MARTINEZ, 2003).

Novos fatos renovaram o interesse das equipes de pesquisa no desenvolvimento de esquemas de sincronização, envolvendo progestágenos exógenos. O uso de prostaglandina

e de progestágenos em programas de sincronização do estro baseia-se na redução e/ou no prolongamento da fase luteal, respectivamente. Entretanto, a sincronização do estro e da ovulação não depende somente do controle da fase luteal, mas também do controle do desenvolvimento folicular (KASTELIC et al., 1990; KASTELIC e GINTHER, 1991).

A ação potencializadora do estrógeno junto à progesterona, aliada ao surgimento também da prostaglandina e, posteriormente, de seus análogos como potentes agentes luteolíticos, condicionou a formação de métodos de sincronização de estros que combinam um curto período de exposição à progestágenos (< 14 dias) com drogas luteolíticas (BEAL, 1996).

Esses tratamentos procuram sincronizar o crescimento folicular, de maneira que todos os animais apresentassem um folículo em crescimento e com capacidade de ovular no momento da administração da prostaglandina ou da remoção da fonte de progesterona (BÓ, 2000).

A administração de E2 suprime o crescimento do folículo dominante, tendo-se observado que esta supressão é mais intensa quando o tratamento é combinado com P4 (BÓ et al., 1995). É importante que elevados níveis de P4 estejam presentes no momento da administração de E2, já que picos de LH foram detectados em novilhas tratadas somente com E2 (BÓ et al., 1994). Novilhas tratadas com o implante auricular de norgestomet juntamente com a aplicação de 17  $\beta$  estradiol em diferentes fases do desenvolvimento folicular tiveram seu crescimento folicular bloqueado, com uma nova onda folicular emergindo 3 a 5 dias depois (BÓ et al., 1994). Tribulo et al. (1995) também observaram a emergência de uma nova onda folicular 4,3 dias após o tratamento de 17  $\beta$  estradiol associado à P4 e ao CIDR® por sete dias, com alto grau de sincronização da ovulação (75% dos animais ovularam entre 72 e 84 horas após a retirada do dispositivo).

Existem no mercado diferentes ésteres de E2: 17  $\beta$  estradiol, benzoato de estradiol (BE), valerato de estradiol (VE) e o cipionato de estradiol (CE). O BE (SÁ FILHO et al., 2004) e o 17  $\beta$  estradiol (BÓ et al., 1995) apresentam meia vida mais curta que os demais, induzindo uma emergência mais sincronizada de uma nova onda de crescimento folicular. A aplicação do 2mg BE induz a emergência 3 a 4 dias após o tratamento (CACCIA; BÓ, 1998), enquanto que a aplicação de 5mg VE resulta em uma nova onda folicular em um momento menos previsível (BÓ et al., 1993) em torno de 5 a 6 dias após o tratamento. Ambos em conjunto com a inserção de um dispositivo de P4 ou progestágeno (CACCIA; BÓ, 1998).

Johnson et al. (1991) concluíram que a concentração de E2 circulante e no fluido folicular foi maior no tratamento por 10 dias com norgestomet em comparação aos tratamentos com 6 ou 8 dias. A utilização do CIDR® por um período de oito dias apresentou tendência de taxas de prenhez superiores (54,1% vs 39,4%) em relação aos tratamentos por 7 dias em novilhas zebuínas (COLAZO et al., 1999). Não houve diferença nas taxas de prenhez no final da estação de monta de vacas zebuínas entre os grupos tratados com CIDR® (8 dias) associado ao BE (79%), Crestar® (9 dias) associado ao VE (88,3%) ou IA após detecção de estro (durante 45 dias – 80,9%), todos com repasse de touros por um período de 45 dias (BARUSELLI et al., 2002).

### **3.4.3 HORMÔNIO LIBERADOR DE GONADOTROPINAS (GnRH)**

A administração de GnRH eleva essas gonadotrofinas na circulação periférica dentro de 2 a 4 horas (TWAGIRAMUNGU et al., 1995). O GnRH promove a ovulação ou a luteinização do folículo dominante se este estiver em sua fase de crescimento ou no início de sua fase estática, resultando na emergência de uma nova onda folicular dentro de 2 ou 3 dias (MARTINEZ et al., 1997). A resposta folicular frente ao tratamento com GnRH deve-se à liberação de LH, sendo que a concentração plasmática de P4 proveniente da fase luteínica não afeta a resposta hipofisária ao GnRH, uma vez que a retroalimentação negativa da P4 sobre a liberação de LH ocorre em nível do hipotálamo (CLARKE, 1989).

Alterações na estrutura química da molécula natural do GnRH propiciam a obtenção de potentes análogos. Entre eles encontram-se a Buserelina, a Gonadorelina e o acetato de Fertirelina. Os análogos estabilizam a molécula contra ataques enzimáticos, aumentam a ligação às membranas e proteínas plasmáticas, e aumentam a afinidade do agonista com o receptor do GnRH (THATCHER et al., 1993). Além disso, apresentam meia-vida longa em circulação. Essas propriedades permitem que os análogos possam ser empregados em doses inferiores às da forma natural (D' OCCHIO et al., 2000).

### 3.4.4 PROSTAGLANDINAS

As prostaglandinas (PGs) foram descobertas em 1930, com os trabalhos de Kurzrok e Lieb, que descreveram os efeitos do sêmen humano sobre o miométrio. Em 1935, Von Euler foi o primeiro a identificar o princípio ativo responsável por tais ações, denominando-o de prostaglandina, ao acreditar, erroneamente, que sua síntese era realizada na próstata. Estas PGs são ácidos graxos hidroxilados não-saturados de 20 carbonos, com um anel ciclopentano no C8 – C12 e todas apresentam um grupo hidroxila no carbono 15 (CHAMPE e HARVEY, 1996).

As PGs são compostos extremamente potentes que desencadeiam uma ampla faixa de respostas fisiológicas, estando presentes na forma de pelo menos seis compostos (Prostaglandina A, B, C, D, E e F) relacionados com numerosos metabólitos, exibindo uma grande variedade de efeitos farmacológicos (D' OCCHIO et al., 2000).

São moléculas derivadas dos ácidos araquidônico e linoléico assim como os leucotrienos e tomboxanos. As ciclo-oxigenases convertem o ácido araquidônico em PGG<sub>2</sub> e PGH<sub>2</sub>, e então, pela ação de sintases e redutases, são convertidas em prostaglandinas específicas (WEEMS, 2005).

A prostaglandina é uma substância luteolítica empregada em rebanhos bovinos para induzir a regressão do corpo lúteo (CL) e Conseqüentemente um estro fértil de 3 a 5 dias após o tratamento (INSKEEP, 1973). Em vacas e ovelhas, a PGF<sub>2</sub> $\alpha$  é produzida e secretada pelo endométrio e, então, carregada localmente pela circulação ipsilateral ao útero, até o ovário, para que ocorra a luteólise (MIYAMOTO et al., 2005).

A PGF<sub>2</sub> $\alpha$  e seus análogos têm sido empregados para induzir ou sincronizar o cio e são utilizados unicamente ou em associação com outros hormônios (XU et al., 1997; DISKIN et al., 2002; YANIZ et al., 2004).

Os tratamentos que visam à sincronização de estro utilizando prostaglandinas baseiam-se no controle da fase progesterônica do ciclo estral. O sucesso do tratamento depende da presença de um CL, já que a ação da luteolisina é provocar a regressão morfológica e funcional dessa estrutura (RATHBONE et al., 2001) e conseqüentemente a queda dos níveis endógenos de progesterona. Porém, a resposta à administração de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  é influenciada pela maturidade do CL. O CL maduro possui um sistema de retroalimentação positiva que resulta na produção intraluteínica de prostaglandina

possibilitando a continuidade do processo luteolítico iniciado por uma única aplicação exógena de  $PGF2\alpha$  (WILTBANK, 1997; OKUDA et al., 2002). Tratamentos realizados até o dia 5 do ciclo estral (CL não maduro) não induzem efetivamente a luteólise (REFSAL, 1980; PARFET et al., 1989).

Nas fêmeas em que se verifica a luteólise, a ocorrência do estro é distribuída num intervalo de cinco ou mais dias, o que torna impraticáveis os programas de inseminação e transferência de embriões em tempo fixo (BÓ et al., 2002). Esta variação no intervalo entre a aplicação da  $PGF2\alpha$  e o estro e a ovulação, é decorrente do estado de desenvolvimento dos folículos no momento do tratamento (MAPLETOFT et al., 2000).

Dessa forma, se o tratamento é realizado quando o folículo dominante está na fase final do seu crescimento, ou no início da sua fase estática, a ovulação irá ocorrer dentro de um intervalo de 24 horas. Por outro lado, se a  $PGF2\alpha$  for aplicada quando o folículo dominante estiver no meio ou no final da sua fase estática, a ovulação irá ocorrer 5 a 7 dias mais tarde, após o crescimento do folículo dominante da próxima onda folicular (KASTELIC e GINTHER, 1991).

### **3.5.5 SINCRONIZAÇÃO COM ASSOCIAÇÃO DE GnRH E PROSTAGLANDINA - (OVSYNCH)**

A capacidade em controlar o momento da ovulação seguido por desenvolvimento folicular e regressão do CL permite a IATF. Tendo em vista esses conceitos, Pursley et al. (1995) desenvolveram um protocolo hormonal chamado Ovsynch que permite a IATF após o uso de uma combinação de tratamentos com GnRH e  $PGF2\alpha$  (GnRH - 7 dias -  $PGF2\alpha$  - 2 dias - GnRH - 16 horas - IATF). Esse programa sincroniza a maturação folicular e a luteólise antes de induzir a ovulação para a IA, que pode ser usado em protocolos de IATF tanto em vacas de leite quanto de corte (TWAGIRAMUNGU et al., 1995; PURSLEY et al., 1997; THATCHER et al., 2001). Entretanto, observa-se redução na taxa de prenhez quando o protocolo é iniciado em determinadas fases do ciclo estral (VASCONCELOS et al., 1999; MOREIRA et al., 2000).

As taxas de concepção de vacas submetidas ao Ovsynch são prejudicadas quando o protocolo é iniciado entre os dias 13 e 17 do ciclo estral devido à luteólise espontânea antes

da administração de PGF2 $\alpha$ . Isso provoca dessincronização na maioria das vacas tratadas que ovulam antes do programado. Da mesma forma, no início do ciclo estral (de 2 a 4 dias), o folículo dominante recrutado não está suficientemente desenvolvido e capaz de responder à administração da primeira dose de GnRH. Conseqüentemente, o folículo dominante no momento do segundo tratamento com GnRH estará envelhecido e terá expressado a dominância por cinco ou mais dias sendo considerado subfértil (AUSTIN et al., 1999).

Alguns trabalhos demonstraram que folículos com 9 a 10 mm de diâmetro em crescimento ovulam mesmo na presença de corpo lúteo funcional, com altos níveis de progesterona (WILTBANK, 1997). Entre 60 a 70% dos animais tratados são detectados em cio 4 dias após a aplicação de prostaglandina (TWAGIRAMUNGU et al., 1995). Estudos têm evidenciado que a sincronização do estro e, em particular, da ovulação pode ser consideravelmente aumentada com a segunda dose de GnRH 36-48 horas após a aplicação de prostaglandina. Esta aplicação de GnRH colabora com a eficiência da inseminação em tempo fixo, realizada de 16 a 24 horas após a aplicação hormonal (VERAS et al., 2007).

Em um protocolo Ovsynch o momento ideal de inseminar é 28 horas após o segundo tratamento com GnRH. Caso as vacas ovulem mais tarde, podemos esperar redução de até 10% na taxa de concepção, bem como aumento nas perdas gestacionais. O tempo de vida do oócito após a ovulação é muito curto. Assim, no momento da ovulação, os espermatozóides precisam estar preparados para a fertilização no oviduto. Nesse sentido, é pior atrasar do que antecipar uma inseminação nos programas de IA seja na inseminação com detecção de estro ou por meio do Ovsynch. Alguns estudos avaliaram o atraso de 48 h para 56 h na aplicação do segundo GnRH após a administração da PGF2a e relataram aumentos nas taxas de concepção (BRUNSVEEN et al., 2006; VERAS et al., 2007).

Estes pesquisadores argumentaram que o aumento na concepção pode estar relacionado com o maior diâmetro do folículo ovulatório, a melhora na taxa de ovulação, maiores concentrações de estradiol no pró-estro e de progesterona no diestro. Contudo, Souza (2008) utilizando essa mesma estratégia não observou tal efeito, provavelmente devido ao intervalo inseminação-ovulação. O grupo que foi submetido ao atraso para 56 h apresentou intervalo inseminação-ovulação de apenas 8h sendo que, segundo uma pesquisa anterior esse intervalo deve ser de 12 a 15 h (VERAS et al., 2007).

Entretanto, o sucesso dos programas para IATF que utilizam o Ovsynch depende das vacas estarem cíclicas (MOREIRA et al., 2001). Nesse estudo, foi verificado que animais em anestro apresentaram menores taxas de prenhez no tratamento com Ovsynch quando comparados aos animais cíclicos no início do tratamento (22 vs 42%, respectivamente).

Existem trabalhos que analisaram a resposta ao protocolo “ovsynch” em zebuínos (BARROS et. al., 2000; BARUSELLI et al., 2000; FERNANDES et. al., 2000). Barros et al. (2000), sincronizaram fêmeas zebuínas em estágio aleatório do ciclo estral, com um análogo do GnRH e sete dias mais tarde, com PGF2a. Vinte e quatro horas após a administração de PGF2a, todos os animais receberam nova dose de GnRH. Cerca de 20 a 24 horas após a segunda dose de GnRH as vacas foram inseminadas em tempo fixo, sem observação do cio (dia 09). Este protocolo foi testado tanto em vacas lactantes (60 a 90 dias pós-parto, n = 44) quanto não lactantes (n = 49). As taxas de prenhez após uma única IA com tempo fixo foram de 47,7% e 44,9%, para vacas lactantes e não lactantes, respectivamente.



#### 4. REFERÊNCIAS

AALTONEN, J., LAITINEN, M.P., VUOJOLAINEN, K., JAATINEN, R., HORELLI-KUITUNEN, N., SEPPÄ, L., LOUHIO, H., TUURI T., SJÖBERG, J., BÜTZOW, R., HOVATA, O., DALE, L., RITVOS, O.. Human growth differentiation factor 9 (GDF9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, v.84, p.2744-2750, 1999.

ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; KASTELIC, J. P.; KO, J. C. H.; GINTHER, O. J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility, Cambridge*, v. 94, n. 1, p. 177-188, 1992.

ADAMS, G.P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implication for synchronization e superstimulation. *Theriogenology*, v.41, p.19-24, 1994.

AHMED C.E., DEES W.L., OJEDA S.R.. The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP)-containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. *Endocrinology*, v.118, p.1682-1689, 1986.

AMSTALDEN, M. Leptin acts at the bovine adenohypophysis to enhance basal and GnRH-mediated release of LH: differential effects are dependent upon nutritional history. *Biology of Reproduction*, v.69, p.1539–1544, 2003.

ANDERSON E., LEE G.Y.. The participation of growth factors in simulating the quiescent, proliferative, and differentiative stages of rat granulosa cells grown in a serum-free medium. *Tissue Cell*, v.25, p.49-72, 1993.

ANDRADE E.R., SENEDA M.M., ALFIERI A.A., OLIVEIRA J.A., BRACARENSE A.P.F.R.L., FIGUEIREDO J.R., TONIOLLI R.. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. *Theriogenology*, v.64, p.1104-1113, 2005.

APA R, LANZONE A, MASTRANDREA M, MICELI F, MACCHIONE E, FULGHESU AM, CARUSO A, CANIPARI R. Effect of pituitary adenylate cyclase-activating peptide on meiotic maturation in follicle-enclosed, cumulus-enclosed, and denuded rat oocytes. *Biol Reprod*, v.57, p.1074-1079, 1997.

APA R, LANZONE A, MICELI F, VACCARI S, MACCHIONE E, STEFANINI M, CANIPARI R. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulates plasminogen activator expression in rat granulosa cell. *Biol Reprod*, v.66, p.830-835, 2002.

ARIMURA A. Receptors for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Trends Endocrinol Metab*, v.3, p.288-294, 1992.

AUSTIN, E. J.; MIHM, M.; RYAN, M. P.; WILLIAMS, D. H.; ROCHE, J. F. Effect of development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, v. 51, n. 1, p. 52-57, 2002.

BADINGA, L.; THATCHER, W.W.; WILCOX, C.J. Effect of season on follicular dynamics and plasma concentrations of estradiol-17 $\beta$ , progesterone and luteinizing hormone in lactating holstein cows. *Theriogenology*, v.42, p.1263-1274, 1994.

BAIRD, D.T. E MCNEILLY, A.S. Gonadotrophic control of follicular development and function in the oestrous cycle of the ewe. *J. Reprod. Fert.* v.30, p.119-133, 1981.

BAIRD, D.T.; SWANSTON, I.; SCARAMUZZI, R.J. Pulsatile release of LH and secretion of ovarian steroids in sheep during the luteal phase of the estrous cycle. *Endocrinology*. v.98, p.1490-1496, 1976.

BAIRD D.T.; Pulsatile secretion of LH and ovarian estradiol during the follicular phase of the sheep estrous cycle. *Biol. Reprod.* v.18, p.359-364, 1978.

BALL, P. J. H.; PETERS, A. R. Reprodução em bovinos. 3.ed. São Paulo: Roca, 2006. 232p.

BAO, B.; GARVERICK, H.A.; SMITH, M.F. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biol. Reprod.* v.56, p.1158-1168, 1997.

BARROS, C. M. Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using GnRH, PGF2 alpha and estradiol benzoate. *Theriogenology*, v. 53, p. 1121-1134, 2000.

BARROS, C.M.; FERNANDES, P.; NOGUEIRA, M.F.G. Controle farmacológico do ciclo estral e superovulação em zebuínos de corte. In: Simpósio sobre controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes. São Paulo: Fundação da Faculdade de Medicina Veterinária e zootecnia, USP, 2000, p. 332.

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

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O. Programas de Sincronização da ovulação em gado de corte. In: I Simpósio de Reprodução Bovina – Sincronização de Estro em Bovinos, Porto Alegre – RS. Anais, p. 41 – 60, 2002.

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

BARUSELLI, P.S. Controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, 2000.

BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v. 31,n.2, p. 205-211. 2007.

BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; CARVALHO, N.A.T.; VALENTIM, R.; BERBER, R.C.A.; CARVALHO FILHO, A.F.; MADUREIRA, E.H.; COSTA NETO, W.P. Dinâmica folicular em novilhas receptoras de embrião bovino submetidas à sincronização da ovulação para inovulação em tempo fixo. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*, v. 28, p. 217, 2000.

BEAL, W.E. Application of knowledge about corpus luteum function in control of estrus and ovulation in cattle. *Theriogenology*, v.45, p.1399-1411, 1996.

BENNER, B. A. Summarizing the effectiveness of supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from natural matrix environmental samples. *Analytical Chemistry*, Amsterdam, v. 70, p. 4594-4601, 1998.

BENNETT, R.A., OSATHANONDH R, YEH J. Immunohistochemical localization of transforming growth factor- $\alpha$ , epidermal growth factor (EGF), and EGF receptor in the human fetal ovary. *J Clin Endocrinol Metab*, v.8, p.3073-3076, 1996.

BARROS, C.M.; MOREIRA, M.P.B.; FIGUEIREDO, R.A.; TEIXEIRA, A.B.; between behavioral estrus; pedometer measurements and ovulations. *Theriogenology*, v. 26, p. 111–115, 1986.

BÓ, G.A., Sincronización de celos para programas de inseminación artificial y transferencia de embriones bovinos. In: *Simpósio sobre controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes*. São Paulo: Fundação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP, 2000, p. 322.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; NASSER, L. F.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. *Theriogenology*, v. 40, p. 225-239, 1993.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Local versus systemic effects of exogenous estradiol on ovarian follicular dynamics in heifers with progesterone ear implant. *Animal of Reproduction Science*, v. 59, p. 141–157, 2000.

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

BÓ, G. A.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. The use of estradiol-17 $\beta$  and progesterone treatment for the control of follicular wave dynamics in beef cattle. *Theriogenology*, v. 40, p.165, 1995.

BÓ, G. A.; CUTAIA, L.; VENERANDA, G. aplicación de programas de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) em rodeos de cria manejados em condiciones pastoriles. In: XXXI Jornadas Uruguayas de Buiatria, Paysandú, Uruguay, 2003. *Anais*, p. 31-40, 2003.

BÓ, G.A.; MAPLETOFT, R.J.; CACCIA, M. Follicular wave dynamics after estradiol-17 $\beta$  treatment of heifers with or without a progesterone implant. *Theriogenology*. v.41, p.1555-1569, 1994.

BODENSTEINER, K.J., CLAY, C.M., MOELLER, C.L., SAWYER, H.R. Molecular cloning of the ovine GDF-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol Reprod*, v.60, p.381-386, 1999.

BOLAMBA, D.; MATTON, P.; ESTRADA, R. Ovarian follicular dynamics and relationship between ovarian types and serum concentrations of sex steroids and gonadotrophin in prepubertal gilts. *Anim. Reprod. Sci.* v.36, p.291-304, 1994.

BOLAND, N.I., GOSDEN, R.G. Effects of epidermal growth factor on the growth and differentiation of cultured mouse ovarian follicles. *J Reprod Fertil*, v.101, p.369-374, 1994.

BONI R, ROELOFSEN MWM, PIETERSE MC, KOGUT J, KRUIP THAM. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology*, v.48, p.277-289, 1997.

BOYD, F.T.; SCHANK, S.C.; SMITH, R.L.; HODGES, E.M.; WEST, S.H.; KRETSCHMER JR., AE.; BROLMANN, J.B.; MOORE, J.E. Transvala digitgrass: a tropical forage resistant to sting nematode and pangola stunt virus. Gainesville: University of Florida/ Florida Agricultural Experiment Station, 1973. 16p.

BRUSVEEN, D. J.; CUNHA, A. P.; SILVA, C. D.; CUNHA, P. M.; STERRY, R. A.; SILVA, E. P. B.; GUENTHER, J. N.; WILTBANK, M. C. Effects on conception rates of lactating dairy cows by altering the time of the second GnRH and AI during Ovsynch. *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. 150, 2006.

BURATINI, J.J., GLAPINSK, V.F., GIOMETTI, I.C., TEIXEIRA, A.B., COSTA, I.B. Expression of fibroblast growth factor-8 and its cognate receptor, fibroblast growth factor receptor (FGFR) -3c and -4, in fetal bovine preantral follicles. *Mol Reprod Dev*, v.70, p.255-261, 2005.

BURSI, R.; GROEN, M. B. Application of (quantitative) structure-activity relationships to progestagens: from serendipity to structure-based design. *Europa Journal Medicine Chemist*, n. 35, p. 787-798, 2000.

CACCIA, M.; BÓ, G.A. Follicle wave emergence following treatment of CIDR-B implanted beef cows with estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology*, v. 49, p. 341, 1998.

CAMPBELL, B.K.; MANN, G.E.; MCNEILLY, A.S. The pattern of ovarian inhibin, estradiol and androstenedione secretion during the estrous cycle of the ewe. *Endocrinology*. v.127, p. 227-235, 1990.

CARPENTER, G. Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. *J Cell Biol*, v.146, p.697-702, 1999.

CARRICK, M. J. AND SHELTON, J. N. 1967. The synchronization of oestrus in cattle with progestagen-impregnated intravaginal sponges. *J. Reprod. Fert.* 14: 21-32,

CARVALHO JBP, CARVALHO NAT, REIS EL, NICHI M, SOUZA AH, BARUSELLI PS. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, 2007.

CATT, K.J. Intracellular Signaling. In: HILLIER, S.G.; KITCHNER, H.C.; NEILSON, J.P. *Scientific Essentials of Reproductive Medicine*. London: W B Saunders Company Ltd, 1996, p.45-59.

CHAMPE, PAMELA, C.; HARVEY, RICHARD A. *Bioquímica ilustrada* 1996, v.2, 343p.

CHANG, H., BROWN, C.W., MATZUK, M.M. Genetic analysis of the mammalian TGF- $\beta$  superfamily. *Endocr Rev*, v.23, p.787-823, 2002.

CLARKE, I.J. The GnRH/gonadotropin axis in the ewe, cow and sow. *Domestic Animal Endocrinology*, v.6, n.1, p.1-14, 1989.

COLAZO, M. G.; SEFCHEK, M.; ILLUMINATI, H.; MEGLIA, G.; SCHMIDT, E.; BÓ, G. A. Fixed- time artificial insemination in beef cattle using CIDR-B devices, progesterone and estradiol benzoate. *Theriogenology*, v. 51, p. 404, 1999.

COMBARNOUS, Y. Gonadotropins: Structure-Synthesis-Functions. In: THIBAUT, M.C.; LEVASSEUR, R.H.F. *Reproduction in Mammals and Man*. Hunter Elipses: Paris, 1993, p.61-77.

CHRISTIAN, R. E.; CASIDA, L. E. The effect of progesterone in altering the oestrus. *Congress on Animal Reproduction, Illinois-USA, Plenary and Symposia Papers, IV: cycle of the cow. Journal of Animal Science, Abstracts...* v. 7, 540 p. 1948.

DANFORTH, D.R., ARBOGAST, L.K., GHOSH, S., DICKERMAN, A., ROFAGHA, R., FRIEDMAN, C.I. Vascular endothelial growth factor stimulates preantral follicle growth in the rat ovary. *Biol Reprod*, v.68, p.1736-1741, 2001.

DANILOVICH, N.A., BARTKE, A., WINTERS, T.A.. Ovarian follicle apoptosis in bovine growth hormone transgenic mice. *Biol Reprod*, v.62, p.103, 2000.

DEMEESTERE, I., GERVY, C., CENTNER, J., DEVREKER, F., ENGLERT, Y., DELBAERE, A. Effect of insulin-like growth factor-i during preantral follicular culture on steroidogenesis, in vitro oocyte maturation, and embryo development in mice. *Biol Reprod*, v.70, p.1664-1669, 2004.

DISKIN, M.G.; AUSTIN, E.J.; ROCHE, J.J. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 23, p. 211–228, 2002.

DONEDA, L., KLINGER, F.G., LARIZZA, L., DE FELICI, M. KL/KIT co-expression in mouse fetal oocytes. *Int J Dev Biol*, v.46, p.1015-1021, 2002.

DONG, J., ALBERTINI, DF., NISHIMORI, K., KUMAR, TR., LU, N., MATZUK, M.M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, v.383, p.531-535, 1996.

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

DZIUK, P.J., COOK, B., KALTENBACH, G., NISWENDER, G. Control of heat in ewes by an implanted progestagen. *J. Anim. Sci.* 1966.

EDQUVIST, L.E. Glândulas Endócrinas y Hormonas Reproductivas. In: *Fisiología y Manejo Aplicado de la Reproducion Animal*. Departamento de Fisiología – Facultad de Veterinaria – Montevideo, Uruguay. p.131-141, 1997.



EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Sydney: Butterworth, 1987. 194 p.

FERRAZ, H.T.; VIU, M.A.O.; LOPES, D.T. Sincronização da ovulação para realização da inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia v.2, n.12, 2008. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/texto.php?id=180> Acesso em: 05/09/2011.

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

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

FINCH, P.W., RUBIN, J.S., MIKI, T., RON, D., AAROSON, S.A. Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science*, v.245, p.752-755, 1989.

FINDLAY, J.K., DRUMMOND, A.E., DYSON, M.L., BAILLIE, A.J., ROBERTSON, D.M., ETHIER, J.F. Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol Cell Endocrinol*, v.191, p.35-43, 2002.

FINDLAY, J.K., DRUMMOND, A.E. Regulation of the FSH receptor in the ovary. *Trends Endocrinol Metab*, v.10, p.183-188, 1999.

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

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

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction*, v.50, p.225-232, 1994.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; EVANS, A.C.O. Differentiation of Dominant Versus Subordinate. *Biol. Reprod.* v.65, p.648–654, 2001.

GAMBINI, A.L.G.; MOREIRA, M.B.P.; CASTILHO, C. Desenvolvimento folicular e sincronização da ovulação em vacas da raça Gir. *Rev.Bras. Reprod. Anim.*, v.22, p.201-210, 1998.

GARNETT, K., WANG, J., ROY, SK. Spatiotemporal expression of EGF receptor messenger RNA and protein in the hamster ovary, p. follicle stage specific differential modulation by follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol, and progesterone. *Biol Reprod*, v.67, p.1593-1604, 2002.

GINTHER, O.J.; KASTELIC, J.P.; KNOPF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* v.20, p 187-200, 1989.

GINTHER OJ, BEG MA, DONADEU FX, BERGFELT DR. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.239-257, 2003.

GINTHER, O.J.; KOT, K.; KULICK, L.J. Relationships between FSH and ovarian follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle. *J. Reprod. Fert.* v.108, p.271-279, 1996.

GRUNERT, E. Placental separation/retention in the bovine. In: 10th Internacional Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biol Reprod*, v.62, p.1322-1328, 2000.

HAYASHI, M., MCGEE, E.A., MIN, G., KLEIN, C., ROSE, U.M., VAN DUIN, M., HSUEH, A.J.W. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early follicles. *Endocrinology*, v.140, p.1236-1244, 1999.

HEINDEL, J.J., SNEEDEN, J., POWELL, C.J., DAVIS, B. Novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating peptide, regulates the function of rat granulosa cells in vitro. *Biol Reprod*, v.54, p.523-530, 1996.

HERRINGTON, J., CARTER-SU, C. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends Endocr Metab*, v.12, p.252-257, 2001.

HREISSON, J.G., SCOTT, J.E., RASMUSSEN, C., SWAHN, M.L., HSUEH, A.L.W., HOVATTA, O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J Clin Endocrinol Metab*, v.87, p.316-321, 2002.

HULSHOF, S.C.J., FIGUEIREDO, J.R., BEKERS, J.F., BEVERS, M.M., VAN DEN HURK, R. Isolation and Characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Vet Quart*, v.2, n.16, p.78-80, 1994.

HULSHOF, S.C.J., FIGUEIREDO, J.R., BEKERS, J.F., BEVERS, M.M., VANDERSTICHELE, H., VAN DEN HURK, R. Bovine preantral follicles and activin, p. immunohistochemistry for activin and activin receptor and the effect of bovine activin A in vitro. *Theriogenology*, v.48, p.133-142, 1997.

LUCY MC, SAVIO JD, BADINGA L, DE LA SOTA RL, Thatcher WW. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J AnimSci*, v.70, p.3615-3626, 1992.

INSKEEP, E.K. Potential uses of prostaglandina in control reproductive cycles of domestics animals. *Journal of Animal Science*, v.36, n.6, p.1149-1157, 1973.

JEWGENOW, K. Impact of peptide growth factors on the culture of small preantral follicles of domestic cats. *Theriogenology*, v.45, p.889-895, 1996.

JIN, X., HAN, C.S., YU, F.Q., WEI, P., HU, Z.Y., LIU, Y.X. Anti-apoptotic action of stem cell factor on oocytes in primordial follicles and its signal transduction. *Mol Reprod Dev*, v.70, p.82-90, 2005.

JOHNSON, A.L., LI, Z., GIBNEY, J.A., MALAMED, S. Vasoactive intestinal peptide-induced expression of cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage and 17-hydroxylase enzyme activity in hen granulosa cells. *Biol Reprod*, v.51, p.327-333, 1994.

JOHNSON, S. K.; LEWIS, P. E.; INSKEEP, E. K. Steroids and cAMP in follicles of postpartum beef cows treated with norgestomet. *Journal of Animal Science*, v. 69, p. 3747-3753, 1991.

JONES, J.I., CLEMMONS, D.R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev*, v.16, p.3-34, 1995.

KASTELIC, J. P.; GINTHER, O. J. Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced Luteolysis. *Animal Reproduction Science*, v. 26, p. 13-24, 1991.

KASTELIC, J.P.; KNOPF, L.; GINTHER, O.J. Effect of day of prostaglandin F<sub>2</sub> treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. *Animal Reproduction Science*, v.23, p.169-180, 1990.

KEZELE, P.R., AGUE, J.M., NILSSON, E., SKINNER, M.K. Alterations in the ovarian transcriptome during primordial follicle assembly and development. *Biol Reprod*, v.72, p.241-255, 2005.

KOOS, R.D. Increased expression of vascular endothelial growth/permeability factor in the rat ovary following an ovulatory gonadotropin stimulus, p. potential roles in follicle rupture. *Biol Reprod*, v.52, p.1426-1435, 1995.

KUIPER, G.G.J.M.; ENMARK, E.; PELTO-HUIKKO, M. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v.93, p.5925–5930, 1996.

LAND, R.B.; PELLETIER, J.; THIMONIER, J. A quantitative study of genetic differences in the incidence of oestrous, ovulation and plasma luteinizing hormone concentration in sheep. *J. Endocrinol.* v.58, p.305-315, 1973.

LARSON, L. L.; BALL, P. J. Regulation of estrous cycle in dairy cattle: A review. *Theriogenology*, v. 38, p. 255-267, 1992.

LEE, J., PARK, H.J., CHOI, H.S., KWON, H.B., ARIMURA, A., LEE, B.J., CHOI, W.S., CHUN, S.Y. Gonadotropin stimulation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) messenger ribonucleic acid in the rat ovary and the role of PACAP as a follicle survival factor. *Endocrinology*, v.140, p.818-826, 1999.

LEE, W.S., OTSUKA, F., MOORE, R.K., SHIMASAKI, S. Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biol Reprod*, v.65, p.994-999, 2001.

LI, R., PHILLIPS, D.M., MATHER, J.P. Activin promotes ovarian follicles development in vitro. *Endocrinology*, v.136, p.849-856, 1995.

LIU, X., ANDOH, K., YOKOTA, H., KOBAYASHI, J., ABE, Y., YAMADA, K., MIZUNUMA, H., IBUKI, Y. Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. *Endocrinology*, v.139, p.2342-2347, 1998.

LOUHIO, H., HOVATTA, O., SJÖBERG, J., TUURI, T. The effects of insulin, and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. *Mol Hum Reprod*, v.6, p.694-698, 2000.

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

MACMILLAN, K. L.; TAUFAN, V. K.; BARNES, D. R.; DAY, A. M. Plasma progesterone concentrations in heifers and cows treated with a new intravaginal device. *Animal of Reproduction Science*, v. 26, p. 25-40, 1991.

MCGUIRE, W.; JUENGUEL, J.; NISWENDER, G. Protein kinase C second message system mediates the antiestrogenic effects of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  in the ovine corpus luteum in vivo. *Biol. Reprod.* v.51, p.800-806, 1994.

MCNEILLY, A.S.; BROOKS, J.; MCNEILLY, J.R. . Synthesis and release of FSH J. *Reprod. Fert. Abstract Series 15 S2*, 1995.

MAO, J., SMITH, M.F., RUCKER, E.B., WU, G.M., MCCAULEY, T.C., CANTLEY, T.C., PRATHER, R.S., DIDION, B.A., DAY, B.N. Effect of EGF and IGF-1 on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis in vitro. *J Anim Sci*, v.82, p.1967-1975, 2004.

MAPLETOFT, R.J. E KASTELIC, J.P. Sincronización de celos en bovinos de carne. In: *Fisiología y Manejo Aplicado de la Reproducción Animal*. Departamento de Fisiología – Facultad de Veterinaria – Montevideo, Uruguay. p.131-141, 1997.

MAPLETOFT, R.J. Advances in the manipulation of donor and recipient estrous cycle in bovine embryo transfer programs. *Arquivos Faculdade Veterinária UFRGS, Porto Alegre*, v.28, n.1, p.23-48, 2000.

MARTÍNEZ, M. F. ; KASTELIC, J. P. Ésteres de estrógeno para la sincronización de la emergencia de la onda folicular y la ovulación en animales tratados con dispositivos con progesterona. V SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL – 27-29 Junio, 2003, Huerta Grande, Córdoba. *Journal of Animal Science*, v. 77, p. 2219–2226, 1999.

MARTINEZ, M.F. Synchronization of follicular wave emergence and its use in estrous synchronization programm. *Theriogenology*, v.47, p.145, 1997.

MATOS, M.H.T., VAN DEN HURK, R., LIMA-VERDE, I.B., LUQUE, M.C.A., SANTOS, K.D.B., MARTINS, F.S., BÁO, S.N., LUCCI, C.M., FIGUEIREDO, J.R. Efeito do fator de crescimento fibroblástico-2 nsobre o cultivo in vitro de folículos pré-antrais caprinos. *Acta Sci Vet*, v.34, p. 265, 2006.

MEDRANO, E.A.; HERNANDEZ, O.; LAMOTHE, C. Evidence of asynchrony in the onset of signs of oestrus in zebu cattle treated with a progestogen ear implant. *Res. Vet. Sci.*, v.60, p.51-54, 1996.

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

MIYAMOTO, K., FUKUTOMI, T., AKASHI-TANAKA, S., HASEGAWA, T., ASAHARA, T., SUGIMURA, T., USHIJIMA, T. (2005) Identification of 20 genes aberrantly methylated in human breast cancers. *Int J Cancer* 116: 407–414

MONGET, P., FABRE, S., MULSANT, P., LECERF, F., ELSEEN, J.M., MAZERBOURG, S., PISSELET, C., MONNIAUX, D. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Dom Anim Endocrinol*, v.23, p.139-54, 2002.

MONGET, P., MONNIAUX, D., DURAND, P. Localization, characterization and quantification of insulin-like growth factor-I-binding sites in the ewe ovary. *Endocrinology*, v.125, p.2486-2493, 1989.

MOORE, K.L., PERSAUD, T.V.. Início do desenvolvimento humano. In: Moore KL, Persaud TVN. *Embriologia clínica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p.13-38.

MORAES, J.C.F.; SOUZA, C.J.H.; GONÇALVES, P.B.D. Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Editora Varela, 2001. Cap.2, p.25-55.

MORAES, J.C.F.; SOUZA, C.J.H.; GONÇALVES, P.B.D. Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos. In: Gonçalves, P.B.D.; Figueiredo, J.R.; Freitas, V.J. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. São Paulo: Editora Varela, 2001. Cap.2, p.25-55.

MORBECK DE, FLOWERS WL, BRITT JH. Response of Porcine Granulosa Cells Isolated from Primary and Secondary Follicles to FSH, 8-bromo-cAMP and EGF in vitro. *J Reprod Fertil*, v.99, p.577-584, 1993.

MOREIRA, F.; DE LA COSTA, R. L.; DIAZ, T.; THATCHER, W. W. Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. *Journal of Animal Science*, v. 78, p. 1568-1576, 2000.

MOREIRA, F.; ORLANDI, C.; RISCO, C. A.; MATTOS, R.; LOPES, F.; THATCHER, W. W. Effects of pre-synchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 84, p. 1646–1659, 2001.

MURPHY M.G.; BOLAND M.P.; ROCHE J.F. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckle cows. . *J. Reprod. Fert.* v.90, p.523-533, 1990.

NILSSON E, PARROT JA, SKINNER MK. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol Cell Endocr*, v.175, p.123-130, 2001.

NILSSON EE, SKINNER MK. Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol Reprod*, v.69, p.1265-1272, 2003.



NILSSON EE, SKINNER MK. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Biol Reprod*, v.67, p.1018-1024, 2002.

NILSSON EE, SKINNER MK. Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocr*, v.214, p.19-25, 2004.

NUTTINCK F, COLLETTE L, MASSIP A, DESSY F. Histologic and autoradiographic study of the *in vitro* effects of FGF-2 and FSH on isolated bovine preantral follicles. *Theriogenology*, v.45, p.1235-1245, 1996.

OJEDA SR, DISSEN GA AND ROMERO C. Role of neurotrophic factors in the control of ovarian development. In: Fugimoto S, Adashi EY, Hsueh AJW, Strauss III, JF (Ed.). *Frontiers in endocrinology*, v.21: Ovarian function research: present and future. Rome: Serono Symposia publications, Rome, 1999. p.21171-21178.

OJEDA SR, ROMERO C, TAPIA V, DISSEN GA. Neurotrophic and cell-cell dependent control of early follicular development. *Mol Cell Endocrinol*, v.163, p.67-71, 2000.

OKUDA, K.; MIYAMOTO, Y.; SKARZYNSKI, D. J. Regulation of endometrial prostaglandin F2a synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 23, n. 1-2, p. 255-264, 2002.

OTSUKA F, SHIMASAKI S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand, p. its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proc Natl Acad Sci*, v.99, p.8060-8065, 2002.

OTSUKA F, YAMAMOTO S, ERICKSON GF, SHIMASAKI S. Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *J Biol Chem*, v.276, p.11387-11392, 2001.

OTSUKA F, YAO Z, LEE T-H, YAMAMOTO S, ERICKSON GF, SHIMASAKI S. Bone morphogenetic protein-15, p. identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem*, v.275, p.39523-39528, 2000.

PAGE, R.B. The anatomy of the hypothalamo-hypophyseal complex. In: KNOBIL, E. e NEILL, J.D., *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1994, Cap. 4, v.2, p.1527-1620.

PAN B, SENGOKU K, TAKUMA N, GOISH K, HORIKAWA M, TAMATE K, ISHIKAWA M. Differential expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the rat ovary. *Mol Cell Endocr*, v.214, p.1-8, 2004.

PANT, H.C. HOPKINSON, C.R.N., FITZPATRICK, R.J., Concentration of oestradiol, progesterone, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the jugular venous plasma of ewes during the oestrous cycle. *J. Endocrinol.* v.73, p.247-255, 1977.

PARFET, J. R.; SMITH, C. A.; COOK, D. L.; SKYER, D. M.; YOUNGQUIST, R. S.; GARVERICK, H. A. Secretory patterns of LH and FSH and follicular growth following administration of PGF<sub>2a</sub> during the early luteal phase in cattle. *Theriogenology*, v. 31, n. 3, p. 513-524, 1989.

PARK JY, SU YQ, ARIGA M, LAW E, JIN SL, CONTI M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*, v.303, p.682-684, 2004.

PARROT JA, SKINNER MK. Thecal cell-granulosa cell interactions involve a positive feedback loop among keratinocyte growth factor, hepatocyte growth factor, and kit ligand during ovarian follicular development. *Endocrinology*, v.139, 2240-2245, 1998.

PEDRO KG. Neuropeptides in the skin. *An Bras Dermatol*, v.4, p.483-498, 2003. Parrot JA, Skinner MK. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*, v.140, p.262-271, 1999.

PATE, J. Cellular components involved in luteolysis. *J. Anim. Sci.* v.72, p.1884-1890, 1994.

PETERSEN, S.L.; OTTEM, E.N.; CARPENTER, C.D., Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol. *Biol. Reprod.* v.69, p.1771-1778, 2003.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonograph of the bovine ovary. *Theriogenology*, New York, v. 21, n. 3, p. 495-504, 1984.

PINHEIRO OL, BARROS CM, FIGUEREDO RA, VALLE ER, ENCARNAÇÃO RO, PADOVANI CR. Estrous behaviour and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2 $\alpha$  or norgestomet and estradiol valerate. *Theriogenology*, v.49, p.667-681, 1998.

PINHEIRO, O. L.; BARROS, C. M.; FIGUEIREDO, R. A.; VALLE, E. R.; PADOVANI, C. R. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2 or norgestomet and estradiol valerate. *Theriogenology*, New York, v. 49, n. 3, p. 667-681, 1998.

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

PURSLEY, J. R.; WILTBANK, M. C.; STEVENSON, J. S.; OTTOBRE, J. S.; GARVERICK, H. A.; ANDERSON, L. L. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronization ovulation or synchronized estrus. *Journal of Dairy Science*, v. 80, p. 295-300, 1997.

QUINTANA R, KOPCOW L, SUELDO C, MARCONI G, RUEDA NG, BARAÑO RI. Direct injection of vascular endothelial growth factor into the ovary of mice promotes follicular development. *Fertil Steril*, v.82, suppl.3, p.1101-1115, 2004.

RABINOVICI J, SPENCER SJ, DOLDI N, GOLDSMITH PC, SCHWALL R, JAFFE RB. Activin-A as an intraovarian modulator, p. actions, localization, and regulation of the intact dimmer in human ovarian cells. *J Clin Invest*, v.89, p.1528-1536, 1992.

RAJAKOSKI, E. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical and left-right variations. *Acta Endocrinology*, v. 34, p. 7-68, 1960.

RATHBONE, M. J.; BUNT, C. R.; OGLE, C. R.; BURGGRAAF, S.; MACMILLAN, K. L.; PICKERING, K. Development of an injection molded poly(epsilon-caprolactone) intravaginal insert for the delivery of progesterone to cattle. *J. Controlled Release*, v. 85 (1-3), p. 61-71, 2002.

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

REDMER D, REYNOLDS L. Angiogenesis in the ovary. *Biol Reprod*, v.1, p.182-192, 1996.

REEKA N, BERG FD, BRUCKER C. Presence of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human ovarian tissue and follicular fluid. *Hum Reprod*, v.13, p. 2199-2205, 1998.

REFSAL, R. K.; SEGUIN, B. E. Effect of stage of diestrus and number of cloprostenol (ICI 80,996) injections on interval to estrus, LH peak and ovulation in heifers. *Theriogenology*, v. 14, n. 1, p. 37-48, 1980.

RHODES FM, DE'ATH G, ENTWISTLE KW. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. *Anim Reprod Sci*, v.38, p.265-277, 1995.

RIESE DJ, STERN DF. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioassays*, v.2, p.41-48, 1998.

ROBERTS RD, ELLIS RCL. Mitogenic effects of fibroblast growth factors on chicken granulosa and theca cells in vitro. *Biol Reprod*, v.61, p.1387-92, 1999.

ROBINSON, J.E. Gamma-amino butyric acid and the control of GnRH secretion in sheep. *J. Reprod. Fert. Suppl.* v.49, p.221-230, 1995.

ROCHE, J.M. Control and regulation of folliculogenesis – a symposium in perspective. *Reproduction*. v.1, p.19-27, 1996.

ROY SK, GREENWALD GS. Immunohistochemical localisation of epidermal growth factor-like activity in the hamster ovary with a polyclonal antibody. *Endocrinology*, v.126, p.1309-1317, 1990.

ROY SK, KOLE AR. Ovarian transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptors, p. in vitro effects of follicle stimulating hormone, epidermal growth factor and TGF beta on receptor expression in human preantral follicles. *Mol Hum Reprod*, v.4, p.207-214, 1998.

ROY SK, TREACY BJ. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertil Steril*, v.59, p.783-790, 1993.

RÜSSE I. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl Anat*, v.24, p.77-92, 1983.

SÁ FILHO, M. F.; AMARAL, M. E.; MANTOVANI, A. P.; REIS, E. L.; NICHI, M.; BARUSELLI, P. S. Effect os synthetic progesterone (Afisterone®) administration at the moment of CIDR® insertion on follicular wave emergence in beef heifers. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 1., 2004, Porto Seguro. Proceedings... Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p. 127, 2004.

SANTOS, I.W. Diagnóstico ginecológico bovino. Santa Maria-RS: Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria. 1993. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). *Reproduction Science*, v.60-61, p.433-442, 2000.

SAVIO, J.D.; BOLAND M.; ROCHE J.F. Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in post-partum dairy cows. . *J. Reprod. Fert.* v.88, p.581-591, 1990.

SAVIO JD, KEENAN L, BOLAND MP, ROCHE JF. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil*, v.83, p.663-671, 1988.

SCARAMUZZI; R.J. Inhibition of oestrous behaviour in ewes by passive immunization against oestradiol-17 $\beta$ . *J. Reprod. Fert.* v.42, p.145-148, 1975.

SHAMS, D. e BERISHA, B. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. *Dom. Anim. End.* v.23, p.53-65, 2002.

SHUGHRUE, P.J.; LANE, M.V.; MERCHENTHALER, I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* v.388, p.507-525. 1997.

SILVA JRV, THARASANIT T, TAVERNE MAM, VAN DER WEIJDEN GC, SANTOS RR, FIGUEIREDO JR, VAN DEN HURK R. The activin-follistatin system and in vitro early follicle development in goats. *J Endocrinol*, v.189, p.113-125, 2006a.

SILVA JRV, VAN DEN HURK R, FIGUEIREDO JR. Expression of mRNA and protein localization of epidermal growth factor and its receptor in goat ovaries. *Zygote*, v.14, p.107-117, 2006b.

SILVA JRV, VAN DEN HURK R, MATOS MHT, SANTOS RR, PESSOA C, MORAES MO, FIGUEIREDO JR. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology*, v.61, p.1691-1704, 2004a.

SILVA JRV, VAN DEN HURK R, VAN TOL HTA, ROELEN BAJ, FIGUEIREDO JR. Expression of Growth Differentiation Factor 9 (GDF9), Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) and BMP Receptors in the Ovaries of Goats. *Mol Reprod Dev*, v.70, p.11-19, 2004b.

SINGH B, KENNEDY TG, TEKPETEY FR, ARMSTRONG DT. Gene expression and peptide localization for epidermal growth factor receptor and its ligands in porcine luteal cells. *Mol Cell Endocrinol*, v.113, p.137-143, 1995a.

SINGH B, RUTLEDGE JM, ARMSTRONG DT. Epidermal growth factor and its receptor gene expression and peptide localization in porcine ovarian follicles. *Mol Reprod Dev*, v.40, p.391-399, 1995b.

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

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

SKINNER MK, COFFEY RJ. Regulation of ovarian cell growth through the local production of transforming growth factor-alpha by theca cells. *Endocrinology*, v.123, p.2632-2638, 1988.

SKINNER MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update*, v.11, p. 461-471, 2005.

SOUZA, A. H. Inseminação artificial em tempo fixo em vacas Holandesas de alta produção. 2008. 152p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SO-YOUNG S, JIN-YOUNG L, EUNYOUNG L, JONGYEOB C, BYUNG-KOO Y, DUKSOO B, DOOSEOK C. Protective effect of vascular endothelial growth factor

(VEGF) in frozen-thawed granulosa cells is mediated by inhibition of apoptosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v.125, p.233-238, 2006.

SYMERLY, R.B. Organization and regulation of sexually dimorphic neuroendocrine pathways. *Behav. Brain. Res.* v.92, p.195–203, 1998.

SYMERLY, R.B.; CHANG, C.; MURAMATSU M. . Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* v.294, p.76–95, 1990.

TEKPETEY FR, SINGH B, BARBE G, ARMSTRONG DT. Localisation of epidermal growth factor (EGF) receptor in the rat corpus luteum, and EGF and transforming growth factor-alpha stimulation of luteal cell steroidogenesis in vitro. *Mol Cell Endocr*, v.110, p.95-102, 1995.

THATCHER, W.W. New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. *Animal Reproduction Science*, v.33, p.27-49, 1993.

THATCHER, W.W. Uterine conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology*, v.56, n.9, p.1435-1450, 2001.

THIÈRHY, J.C. e MARTIN, G.B. Neurophysiological control of the secretion of gonadotrophin-releasing hormone and luteinizing hormone in the sheep – a review. *Reprod. Fertil. Dev.* v.3, p.137-173, 1991.

TILLY JL, BILLIG H, KOWALSKI KI, HSUEH AJ. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine-kinase-depedent mechanism. *Mol Endocr*, v.6, p.1942-50, 1992.

TRIBULO, H. E.; GO, G. A.; KASTELIC, J. P.; PAWLYSHYN, V.; BARTH, A. D.; MAPLETOFT, R. J. Estrus synchronization in cattle with estradiol-17 $\beta$  and CIDR-B vaginal devices. *Theriogenology*, v. 43, p. 340, 1995.



TRINCA, L. A. Synchronization of ovulation in beef heifers (*Bos indicus*) using GnRH, PGF2a and estradiol benzoate. *Theriogenology*, v. 53, p. 1121-1134, 2000.

TURNBULL, K.E.; BRADEN, A.W.H.; MATTNER, P.E. The pattern of follicular growth and atresia in the ovine ovary. *Aust. J. Biol. Sci.* v.30, p.229-241, 1977.

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

VACA, L. A.; GALINA, C. S.; FERNANDEZ-BACA, S.; ESCOBAR, F. J.; RAMÍREZ, B. Oestrous cycles, oestrus and ovulation of the Zebu in the Mexican tropics. *The Veterinary Record*, London, v. 117, n. 26, p. 434-437, 1985.

VALVE E, PENTTILA T, PARANKO J, HÄRKÖNEN P. FGF-8 is expressed during specific phases of rodent oocyte and spermatogonium development. *Biochem Biophys Res Commun*, v.232, p.173-177, 1997.

VAN WEZEL IL, UMAPATHYSIVAM K, TILLEY WD, RODGERS RJ. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles. *Mol Cell Endocr*, v.115, p.133-140, 1995.

VASCONCELOS, J. L. M.; SILCOX, R. W.; ROSA, G. J. M.; PURSLEY, J. R.; WILTBANK, M. C. 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. 1067-1078, 1999.

VERAS, M. B.; LIMA, F. A.; SALES, J. N. S.; CREPALDI, G. A.; MAIO, J. R. G.; BARUSELLI, P. S. Atraso do último GnRH do protocolo Ovsynch (48 vs 56h após a PGF) na taxa de prenhez de vacas holandesas de alta produção. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 21., 2007, Costa do Saúpe, Salvador. *Anual... Porto Alegre, RS : UFRGS*, v. 35, p. 1125-1125, 2007.

VERNON RK, SPICER LJ. Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced steroidogenesis by bovine granulosa cells. *J Anim Sci*, v.72, p.2696-702, 1994.

VIANA J.H.M., FERREIRA A.M., SÁ W.F., CAMARGO L.S.A. Follicular dynamics in zebu cattle. *Pesq Agrop Bras*, v.35, p.2501-2509, 2000.

XU, Z. Z.; BURTON, L. J.; MACMILLAN, M. L. Reproductive performance of lactating dairy cows following estrus synchronization regimens with PGF<sub>2</sub>alpha and progesterone. *Theriogenology*, v. 47, p. 687-701, 1997.

WANDJI S, FORTIER MA, SIRARD M. Differential response to gonadotrophins and prostaglandin E<sub>2</sub> in ovarian tissue during prenatal and postnatal development in cattle. *Biol Reprod*, v.46, p.1034-1041, 1992.

WANDJI SA, EPPIG JJ, FORTUNE JE. FSH and Growth Factor Affect the Growth and Endocrine Function in vitro of Granulosa Cells of Bovine Preantral Follicles. *Theriogenology*, 45, p.817-832, 1996.

WANG J, ROY SK. Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster, p. modulation by follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod*, v.70, p.577-585, 2004.

WILTBANK, M. C. How information of hormonal regulation of the ovary has improved understanding of timed breeding programs. *Theriogenology*, p. 83-97, 1997.

WINKLER, V. W.; BRORODKIN, S.; WEBEL, S. K.; MANNEBACH, J. T. In vitro and in vivo considerations of a novel matrix-controlled bovine progesterone-releasing intravaginal device. *Journal of Pharmacy Science*, v. 66, p. 816-818, 1977.

WOLFENSON D, INBARA G, ROTH A Z, KAIMB M, BLOCHA A, BRAW-TAL R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology*, v.62, p.1042-1055, 2004.

YAMAMOTO S, KONISHI I, TSURUTA Y, NANBU K, KURODA H, MATSUSHITA K, HAMID A, YURA Y, MORI I. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) during folliculogenesis and corpus luteum formation in the human ovary. *Gynecol Endocrinol*, v.11, p.371–381, 1997.

YÁÑIZ, J. L.; MURUGAVEL, K.; LÓPEZ-GATIUS, F. Recent developments in oestrous synchronization of postpartum dairy cows with and without ovarian disorders. *Reproduction Domestic Animals*, v. 39, p. 86-93, 2004.

YOSHINO O, MCMAHON HE, SHIMASAKI S. A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. *Proc Natl Acad Sci*, v.103, p.10678-10683, 2006.

ZAMA AM, HUDSON FP, BEDELL MA. Analysis of Hypomorphic KitlSI Mutants Suggests Different Requirements for KITL in Proliferation and Migration of Mouse Primordial Germ Cells. *Biol Reprod*, v.73,p.639-647, 2005.

ZHAO J, TAVERNE MAM, VAN DER WEIJDEN BC, BEVERS MM, VAN DEN HURK R. Effect of activin A on in vitro development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. *Biol Reprod*, v.65, p.967-977, 2001.

ZHONG Y, KASSON BG. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates steroidogenesis and adenosine 3, 5-monophosphate accumulation in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, v.135, p.207-213, 1994.

ZHOU H, ZHANG Y. Effect of growth factors on in vitro development of caprine preantral follicle oocytes. *Anim Reprod Sci*, v.90, p.265-272, 2005.

ZHOU J, ADESANYA OO, VATZIAS G. HAMMOND JM, BONDY CM. Selective expression of insulin-like growth factor system components during porcine ovary follicular selection. *Endocrinology*, v.137, p.4893-4901, 1996.

## **Dinâmica folicular de vacas da raça Guzera submetidas a três protocolos de sincronização da ovulação**

*Follicular dynamics of Guzera breed subjected to three protocols for synchronization of ovulation*

**A.M. Fraga Junior<sup>1</sup>, G.A. Veras<sup>1</sup>, P.F.M.P. Souto<sup>2</sup>, A.S. Santos Filho<sup>3</sup>, C.C. Bartolomeu<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Aluno do Programa de Pós-graduação em Sanidade e Reprodução em Ruminantes, UAG/UFRPE, Garanhuns, PE, Brasil

<sup>2</sup>Aluno do Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, UFRPE, Recife, PE, Brasil

<sup>3</sup>Depto. de Pesquisa, Instituto de Agrônomo de Pernambuco, IPA, Recife, PE, Brasil.

<sup>4</sup>Depto. de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, PE, Brasil.  
Correspondência: fragaam@gmail.com

### **Resumo**

Este trabalho teve por objetivo avaliar a dinâmica folicular de vacas da raça Guzera tratadas com três protocolos para sincronização da ovulação onde se utilizaram implantes vaginais impregnados com progesterona ou o protocolo Ovsynch, além da utilização de benzoato de estradiol ou GnRH como indutor da ovulação. Foram utilizadas 18 vacas PO da raça Guzera, múltiparas, não-lactantes, com idades entre quatro e sete anos, escore de condição corporal de 3,0 a 4,0 (escala de 1 a 5). Os animais foram mantidos em regime extensivo, onde a dieta fornecida supriu as exigências nutricionais, receberam sal mineral proteinado e água “*ad libitum*”. Os animais foram divididos em três grupos, No grupo 1 (n=6) foi aplicado no D0, mesmo dia do dispositivo intravaginal CIRD<sup>®</sup>, 2 mg de benzoato de estradiol, no dia oito (D8), foram aplicados 0,530 mg de análogo de prostaglandina, 300 UI de eCG e foi retirado o dispositivo intravaginal, no dia nove (D9) foi aplicado 1 mg de benzoato de estradiol. No grupo 2 (n=6) foi aplicado no D0, mesmo dia do dispositivo intravaginal CIRD<sup>®</sup>, 2 mg de benzoato de estradiol, no dia oito (D8), foram aplicados 0,530 mg de análogo de prostaglandina, 300 UI de eCG IM e foi retirado o dispositivo intravaginal, no dia nove (D9) foi aplicado 17 µg de um análogo do GnRH. No grupo 3 (n=6) foi aplicado no D0, 200 µg de análogo do GnRH, 0,530 mg de análogo da prostaglandina no dia sete (D7) no dia nove (D9) foi aplicado 100 µg de análogo do GnRH. A partir do dia zero até o dia 8 os animais foram examinados diariamente (24/24 h) por via trans-retal com auxílio de ultrassom. Após a retirada do implante no dia 8 (grupos 1 e 2) e aplicação da prostaglandina no dia 7 (grupo 3) os animais foram avaliados 4 vezes por dia (6/6 horas) até o dia 10 do protocolo. Uma nova emergência da onda folicular para os grupos 1, 2 e 3 ocorreu respectivamente, em  $2,6 \pm 0,16$ ;  $2,7 \pm 0,18$  e  $2,9 \pm 0,16$  dias, não havendo diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre os grupos (Tabela 1). Houve diferença

estatística para os grupos 1, 2 e 3 no intervalo entre emergência da onda e ovulação em dias,  $7,1 \pm 0,18$ ;  $6,37 \pm 0,31$ ;  $5,33 \pm 0,66$ ; intervalo entre a retirada do implante e a ovulação em horas,  $64,2 \pm 6,99$ ;  $61,0 \pm 12,36$ ; intervalo entre a aplicação do indutor e a ovulação em horas,  $43,6 \pm 6,89$ ;  $41,0 \pm 11,25$ ;  $38,2 \pm 7,89$ , maior diâmetro do FD (dia 8),  $10,71 \pm 0,30$ ;  $9,41 \pm 0,24$ ;  $9,75 \pm 0,35$ , maior diâmetro do FD (dia 10),  $13,1 \pm 0,23$ ;  $11,7 \pm 0,22$ ;  $12,0 \pm 0,34$ ; Média de crescimento do folículo até dia 8 – (mm/dia),  $1,36 \pm 0,07$ ;  $0,92 \pm 0,10$ ;  $1,10 \pm 0,11$ ; Média de crescimento do folículo do dia 8-10 – (mm/dia),  $2,40 \pm 0,08$ ;  $2,28 \pm 0,11$ ;  $2,23 \pm 0,10$  e na porcentagem de animais que ovularam, 83,34% (5/6), 66,67% (4/6), 50% (3/6). Portanto os três protocolos foram eficientes em promover a sincronização da ovulação e são indicados para utilização em programa de inseminação artificial em tempo fixo em vacas da raça Guzera.

**Palavras-chave:** Benzoato de Estradiol, GnRH, Ovsynch, indutor da ovulação.

#### Abstract

This study aimed to assess the follicular dynamics of Guzera cows treated with three protocols for synchronization of ovulation where they used vaginal implant impregnated with progesterone or the Ovsynch protocol, besides the use of estradiol benzoate or GnRH to induce ovulation. There were used 18 PO Guzera cows, multiparous non-lactating, aging between four and seven years, good body score condition, ranging from 3.0 to 4.0. The animals were kept in extensive management, where the diet provided met the nutritional requirements including protein mineral salt and water "ad libitum". The animals were divided into three groups, in group 1 (n = 6) it was applied at the D0, an intravaginal device CIDR<sup>®</sup> along with 2 mg of estradiol benzoate, at D8 it was administered 300 mg of a prostaglandin analogue and 300 IU of eCG besides intravaginal device removal, at D9 it was administered 1 mg of estradiol benzoate and at D11 artificial insemination was carried out. In group 2 (n = 6) it was used the same protocols as in group 1 except for the induction of ovulation when it was used 17 mg of a GnRH analogue and at D11 artificial insemination was carried. In group 3 (n = 6) was applied at D0, 200 mg of GnRH analogue, 0.530 mg of prostaglandin analogue at D7, at D9 it was administered 100 mg of GnRH analogue and at D10 artificial insemination was carried. From D0 to D8 animals were examined daily (24/24 h) by transrectal ultrasound. After removal of the implant on D8 in groups 1 and 2 and application of prostaglandin D7 (group 3) animals were assessed

four times a day (6/6 hours) until D10 of the Protocol. A new follicular wave emergence for groups 1, 2 and 3 was observed respectively,  $2.6 \pm 0.16$ ;  $2.7 \pm 0.18$  and  $2.9 \pm 0.16$  days, with no statistical difference ( $P < 0.05$ ) between groups. There was statistical difference for groups 1, 2 and 3 in the range of wave emergence and ovulation in days,  $7.1 \pm 0.18$ ;  $6.37 \pm 0.31$ ;  $5.33 \pm 0.66$ , the interval between implant removal and ovulation in hours,  $64.2 \pm 6.99$ ,  $61.0 \pm 12.36$ , interval between the application of inducing ovulation and in hours,  $43.6 \pm 6.89$ ,  $41.0 \pm 11.25$ ,  $38.2 \pm 7.89$ , greatest diameter of the DF (day 8),  $10.71 \pm 0.30$ ,  $9.41 \pm 0.24$ ,  $9.75 \pm 0.35$ , greatest diameter of the DF (day 10),  $13.1 \pm 0.23$ ,  $11.7 \pm 0.22$ ,  $12.0 \pm 0.34$ , Average follicle growth until day 8 - (mm / day),  $1.36 \pm 0.07$ ,  $0.92 \pm 0.10$ ,  $1.10 \pm 0.11$ , Average follicle growth of 8-10 days - (mm / day),  $2.40 \pm 0.08$ ,  $2.28 \pm 0.11$ ,  $2.23 \pm 0.10$  and the percentage of animals that ovulated, 83.34% (5/6), 66.67% (4/6), 50% (3/6). So the protocols of experimental groups 1 and 2 were more effective in promoting the synchronization of ovulation and are indicated to be used in a program of fixed-time artificial insemination in Guzerat cows.

**Keywords:** Estradiol benzoate, GnRH, Ovsynch, ovulation induction.

### Introdução

A otimização da eficiência reprodutiva é um dos principais fatores que contribuem para melhora do desempenho produtivo e da lucratividade dos rebanhos bovinos (BARUSELLI, et al., 2004). Para que essa eficiência seja alcançada em um rebanho é necessário que todos os aspectos fisiológicos, nutricionais e de manejo estejam perfeitamente integrados e em pleno funcionamento. A rentabilidade na exploração de bovinos de corte é diretamente dependente da porcentagem de vacas que são capazes de obter um intervalo de partos em torno de 365 dias. Isto implica na necessidade da concepção acontecer no máximo até o 85º dia pós-parto (OLIVEIRA FILHO et al., 1999).

Com o intuito de maximizar esses índices, várias técnicas vêm sendo desenvolvidas, como a transferência de embriões, inseminação artificial em tempo fixo, e produção *in vitro* de embriões. Porém ainda são escassos os estudos sobre a fisiologia reprodutiva de fêmeas submetidas a protocolos hormonais. (FERRAZ et al., 2008).

No entanto, segundo Ball et al. (2006), para maximização do potencial reprodutivo, especialmente de fêmeas domésticas, é importante estudar a foliculogênese a fim de se

compreender os mecanismos e fatores envolvidos neste evento. Compreender os fenômenos fisiológicos associados ao crescimento folicular e à ovulação é fundamental para aperfeiçoar as biotecnias da reprodução e, conseqüentemente, a eficiência reprodutiva dos rebanhos (BARUSELLI et al., 2007).

A dinâmica folicular representa um dos aspectos mais importantes da fisiologia ovariana, sendo intensamente estudada em raças taurinas (SAVIO et al., 1988; SIROIS e FORTUNE, 1988; BADINGA et al., 1994). O número de trabalhos com raças zebuínas (*Bos taurus indicus*) e seus mestiços é, contudo, reduzido, particularmente nas raças de maior importância para a pecuária nacional (FIGUEIREDO et al., 1997; GAMBINI et al., 1998).

O presente trabalho teve por objetivo realizar um estudo ultrassonográfico e determinação do momento da ovulação de vacas da raça Guzerá submetidas a três protocolos de sincronização do estro e da ovulação.

## **Material e Métodos**

### **Local do Experimento**

O experimento foi realizado no mês de setembro de 2010, na Estação Experimental do Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA, situado na Fazenda Saco, município de Serra Talhada – PE, Microrregião do Sertão do Alto Pajeú, com uma área total de 3.200ha, e tendo como coordenadas geográficas latitude 07° 59' 31", longitude 38° 17' 54" e altitude média de 429 metros. Foi registrada precipitação média no mês de setembro de 1,3 mm e anual de 621,2 mm, temperatura média mensal de 25,2°C. (IPA, 2010)

### **Seleção dos Animais**

Foram utilizadas 18 vacas PO da raça Guzerá, cíclicas, multíparas, não-lactantes, com idades entre quatro e sete anos, escore de condição corporal entre 3 e 4 (escala de 1 a 5) segundo Ferreira et al. (1990).

O status reprodutivo das fêmeas foi avaliado pelos exames ultrassonográfico, segundo proposição de Santos et al. (2004), e vaginoscópico preconizado por Grunert et al. (2005), para identificar possíveis alterações clínicas ou reprodutivas. Os animais foram mantidos em regime semi-extensivo, com pastagens predominante de capim-buffel (*Cenchrus ciliaris L.*), receberam uma suplementação de silagem de milho no cocho uma vez ao dia, sal mineral proteinado e água “*ad libitum*”.

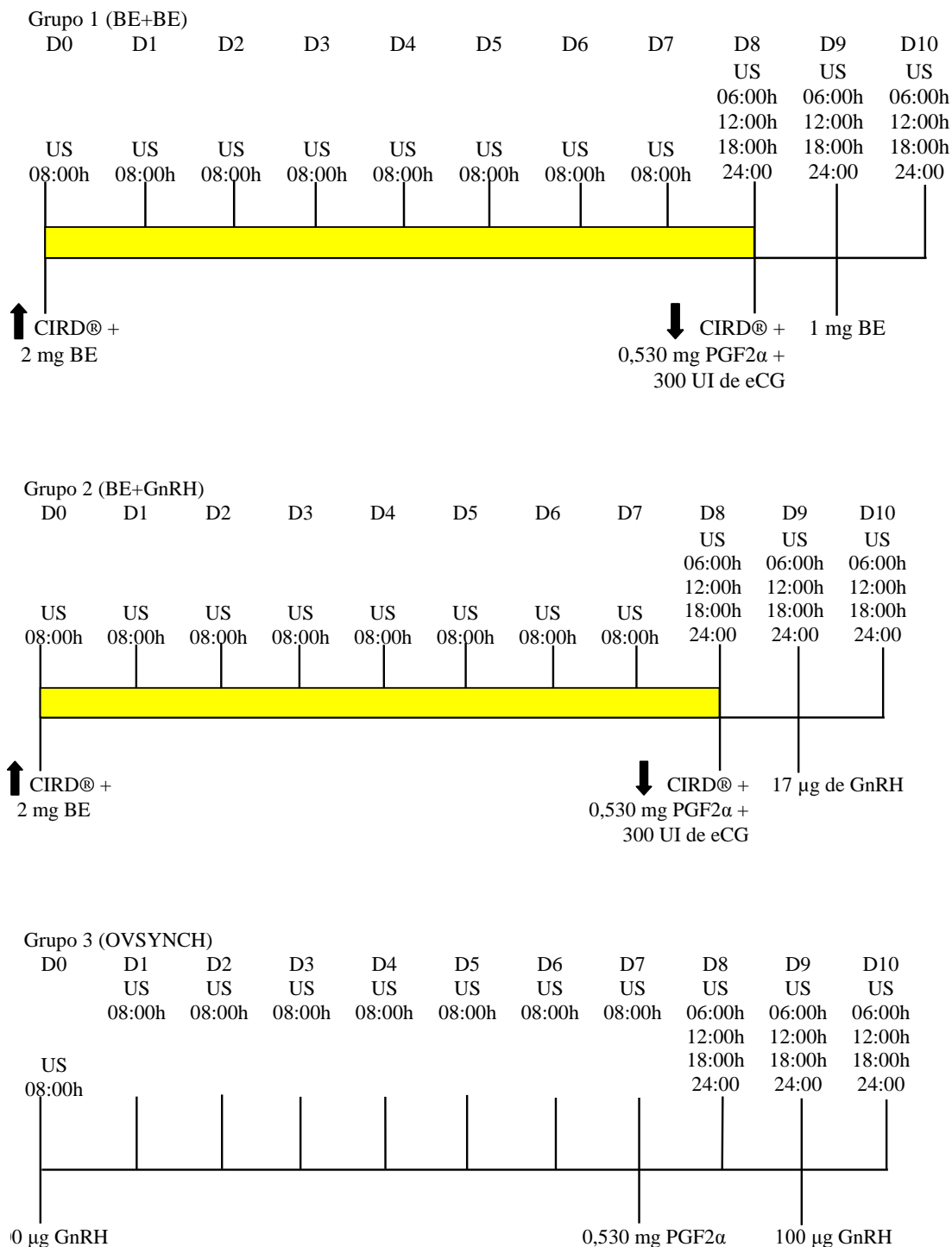


### **Delineamento Experimental**

Antes da composição dos grupos experimentais os animais foram divididos em blocos casualizados formando três grupos homogêneos quanto à composição genética, idade e escore corporal. Os componentes de cada bloco foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais. No grupo 1 (n=6) foi aplicado no D0, mesmo dia do dispositivo intravaginal CIRD® (Eazi-Breed CIRD®, Pfizer, Nova Zelândia), 2 mg de benzoato de estradiol (BE, Estrogin®, Farmavet), no dia oito (D8), foram aplicados 300 µg de análogo de prostaglandina (Ciosin®, INTERVET - SCHERING), 300 UI de eCG (Novormon®, INTERVET – SCHERING) e foi retirado o dispositivo intravaginal, no dia nove (D9) foi aplicado 1 mg de benzoato de estradiol (BE, Estrogin®, Farmavet) e no dia dez (D10) foi realizada a inseminação artificial.

No grupo 2 (n=6) foi aplicado no D0, mesmo dia do dispositivo intravaginal CIRD® (Eazi-Breed CIRD®, Pfizer, Nova Zelândia), 2 mg de benzoato de estradiol (BE, Estrogin®, Farmavet), no dia oito (D8), foram aplicados 300 µg de análogo de prostaglandina (Ciosin®, INTERVET - SCHERING), 300 UI de eCG (Novormon®, INTERVET – SCHERING) IM e foi retirado o dispositivo intravaginal, no dia nove (D9) foi aplicado 17 µg de GnRH (GESTRAN PLUS®, TECNOPEC) e no dia dez (D10) foi realizada a inseminação artificial.

No grupo 3 (n=6) foi aplicado no D0, 200 µg de análogo do GnRH (GESTRAN PLUS®, TECNOPEC), 300 µg de análogo de prostaglandina (Ciosin®, INTERVET - SCHERING) no dia sete (D7) no dia nove (D9) foi aplicado 100 µg de análogo do GnRH (GESTRAN PLUS®, TECNOPEC) e no dia dez (D10) a inseminação artificial.



**Figura 1 – Esquema do Protocolo dos grupos experimentais**

### **Exames Ultrassonográficos**

A partir do dia zero até o dia 7 os animais foram examinados diariamente (24/24 h) por via trans-retal com auxílio de ultrassom (Águila Vet® - Pie Medical) equipado com um transdutor linear de 8 MHz sendo os exames realizados pelo mesmo operador para reduzir erros com o objetivo de monitorar a dinâmica folicular nos ovariana. As estruturas ovarianas foram mapeadas e mensuradas. Após a retirada do implante no dia 8 (grupos 1 e 2) e aplicação da prostaglandina no dia 7 (grupo 3) os animais foram avaliados 4 vezes por dia (6/6 horas) até o dia 10 do protocolo.

Os animais foram conduzidos diariamente, dos piquetes até um tronco de contenção, localizado no curral de manejo para realização do exame ultrassonográfico. O reto foi esvaziado por palpação retal, e em seguida, introduziu-se o transdutor devidamente lubrificado. O posicionamento do transdutor era dorsoventral e medio-lateral aos ovários para a identificação das imagens dos folículos conforme técnica sugerida por Santos et al. (2004), realizando movimentos látero-laterais, na busca de uma imagem de melhor diâmetro dos folículos. Algumas imagens foram congeladas e gravadas no cartão de memória.

O dia da emergência da onda de desenvolvimento folicular foi identificado como o dia em que o folículo dominante apresentou, retrospectivamente, diâmetro de 4-5 mm. A determinação da ovulação foi observada quando o folículo dominante com mais de 10 mm de diâmetro desapareceu entre duas avaliações ultrassonográficas. Como essas avaliações foram realizadas em intervalos de 6 horas, estabeleceu-se a média desse intervalo como o momento da ovulação.

### **Análise Estatística**

Os dados foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA) com um fator, seguido do teste de Newman-Keuls para comparação entre médias, quando a variação dos dados foi significativa entre os tratamentos. O nível de significância da prova estatística foi de 5%. Os dados foram tabelados e registrados todos os valores descritivos da amostra, utilizando-se o Programa BioEstat 2.0 (AYRES et al., 2000; ZAR, 1996).

## Resultados e Discussão

Uma nova emergência da onda folicular para os grupos 1, 2 e 3 ocorreu respectivamente, em  $2,6 \pm 0,16$ ;  $2,7 \pm 0,18$  e  $2,9 \pm 0,16$  dias, não havendo diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre os grupos (Tabela 1).

TABELA 1 – Dia da emergência da onda folicular e intervalos entre emergência, retirada do implante e aplicação do indutor para a ovulação de vacas da raça Guzerá tratadas com três protocolos para sincronização da ovulação.

	Grupo 1 (BE+BE)	Grupo 2 (BE+GnRH)	Grupo 3 (OVSYNCH)
Número de Animais	6	6	6
Emergência da onda em dias	$2,6 \pm 0,16^a$	$2,7 \pm 0,18^a$	$2,9 \pm 0,16^a$
Intervalo entre emergência da onda e ovulação em dias	$7,1 \pm 0,18^a$	$6,37 \pm 0,31^a$	$5,33 \pm 0,66^b$
Intervalo entre a retirada do implante e a ovulação em horas	$64,2 \pm 6,99^a$	$61,0 \pm 12,36^b$	-----
Intervalo entre a aplicação do indutor e a ovulação em horas	$43,6 \pm 6,89^a$	$41,0 \pm 11,25^b$	$38,2 \pm 7,89^b$

<sup>a,b</sup>Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ )

Uma nova emergência da onda folicular para os grupos 1, 2 e 3 ocorreu, em  $2,6 \pm 0,16$ ;  $2,7 \pm 0,18$  e  $2,9 \pm 0,16$  dias, respectivamente não havendo diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre os grupos (Tabela 1).

Os resultados dos grupos 1 e 2, onde se utilizou 2 mg de BE ao início do tratamento, estão de acordo com os achados de Bridges et al. (1999), onde se obteve com a administração de 2 mg de BE no momento da inserção de um implante vaginal impregnado com progesterona, a emergência de uma nova onda folicular em  $3,1 \pm 0,6$  dias.

Moreno et al. (2001) obtiveram com a aplicação de 2 mg de BE + 50 mg de progesterona no dia da colocação de um implante vaginal contendo progesterona, a emergência de uma nova onda folicular em  $4,0 \pm 0,2$  dias. Da mesma forma, Carvalho (2008) obteve com a aplicação de 2 mg de BE no dia da colocação de um implante de progesterona, a emergência de uma nova onda folicular em  $3,5 \pm 0,1$

dias em novilhas corroborando Melo (2009) que obteve emergência de uma nova onda em  $3,7 \pm 1,1$ ;  $3,7 \pm 0,7$  dias.

Caccia e Bó (1998), avaliando diferentes doses de BE, observaram que o grupo de vacas que recebeu 2,5 mg de BE + 50 mg de progesterona no dia da colocação do implante CIDR, teve a emergência da onda folicular mais sincronizada ( $4,0 \pm 0,1$  dias, variação de 3 a 4 dias) do que o grupo que recebeu 5 mg de BE + 50 mg de progesterona ( $4,0 \pm 0,8$  dias, variação de 2 a 5 dias).

O intervalo entre o tratamento com estradiol e a emergência da onda folicular depende do aumento dos níveis de FSH, o qual ocorre, como tem sido demonstrado, após as concentrações de estradiol diminuírem até níveis basais (O'ROURKE et al., 2000).

Cavalieri et al. (2008), utilizando 2 mg de BE no início do tratamento com CIDR, observaram um aumento nas concentrações de estradiol entre os dias 0,5 e 4. Nas vacas tratadas com BE, a concentração de estradiol no plasma atingiu o pico entre 0,5 e 1 dia após a administração e foi gradualmente diminuindo, mas ainda foi maior do que nas vacas não tratadas com BE até o dia 4. As concentrações de FSH foram menores nas vacas tratadas com BE entre os dias 0,5 e 2 e entre os dias 2 e 4. As baixas concentrações de FSH nas vacas tratadas com BE corresponderam ao período em que as concentrações de estradiol mantiveram-se elevadas. O aumento nas concentrações de FSH foi detectado  $0,17 \pm 0,33$  dias antes da emergência da onda ser observada.

Em estudo realizado por Martinez et al. (2005), o padrão de concentração plasmática de estradiol em vacas ovariectomizadas tratadas com o implante vaginal CIDR foi dependente da formulação de estradiol utilizado ao início do tratamento. A concentração de estradiol atingiu o pico em 12 horas nos animais tratados com 5 mg de  $17\beta$ -estradiol, retornando até níveis basais em aproximadamente 36 horas, sendo que nos animais tratados com 5 mg de BE ou VE o pico de concentração ocorreu entre 12 e 24 horas e a concentração atingiu níveis basais aproximadamente 96 horas pós-tratamento.

Houve diferença estatística para os grupos 1, 2 e 3 no intervalo entre emergência da onda e ovulação em dias,  $7,1 \pm 0,18$ ;  $6,37 \pm 0,31$ ;  $5,33 \pm 0,66$ ; intervalo entre a retirada do implante e a ovulação em horas,  $64,2 \pm 6,99$ ;  $61,0 \pm 12,36$ ; intervalo entre a aplicação do indutor e a ovulação em horas,  $43,6 \pm 6,89$ ;  $41,0 \pm 11,25$ ;  $38,2 \pm 7,89$ , maior diâmetro do FD (dia 8),  $10,71 \pm 0,30$ ;  $9,41 \pm 0,24$ ;  $9,75 \pm 0,35$ , maior diâmetro do FD (dia 10),  $13,1 \pm 0,23$ ;  $11,7 \pm 0,22$ ;  $12,0 \pm 0,34$ ; Média de crescimento do folículo até dia 8 – (mm/dia),  $1,36$

$\pm 0,07$ ;  $0,92 \pm 0,10$ ;  $1,10 \pm 0,11$ ; Média de crescimento do folículo do dia 8-10 – (mm/dia),  $2,40 \pm 0,08$ ;  $2,28 \pm 0,11$ ;  $2,23 \pm 0,10$  e na porcentagem de animais que ovularam, 83,34% (5/6), 66,67% (4/6), 50% (3/6). Os resultados estão apresentados nas tabelas 1, 2 e 3 e nas figuras 2, 3 e 4.

TABELA 2 – Diâmetro e média de crescimento folicular de vacas da raça Guzerá tratadas com três protocolos para sincronização da ovulação.

	Grupo 1 (BE+BE)	Grupo 2 (BE+GnRH)	Grupo 3 (OVSYNCH)
Número de Animais	6	6	6
Maior diâmetro do FD (dia 8) - mm	$10.71 \pm 0.30^a$	$9.41 \pm 0.24^b$	$9.75 \pm 0.35^b$
Maior diâmetro do FD (dia 10) - mm	$13.1 \pm 0.23^a$	$11.7 \pm 0.22^b$	$12.0 \pm 0.34^b$
Média de crescimento do folículo até dia 8 – (mm/dia)	$1.36 \pm 0.07^a$	$0.92 \pm 0.10^b$	$1.10 \pm 0.11^b$
Média de crescimento do folículo do dia 8-10 – (mm/dia)	$2.40 \pm 0.08^a$	$2.28 \pm 0.11^a$	$2.23 \pm 0.10^a$

<sup>a,b</sup>Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ )

TABELA 3 – Porcentagem vacas da raça Guzerá que ovularam tratadas com três protocolos para sincronização da ovulação.

	Grupo 1 (BE+BE)	Grupo 2 (BE+GnRH)	Grupo 3 (OVSYNCH)
Número de Animais	6	6	6
	83,34% (5/6) <sup>a</sup>	66,67% (4/6) <sup>b</sup>	50% (3/6) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ )

No presente estudo, as taxas de crescimento do FD até o D8 foi de  $1,36 \pm 0,07$ ;  $0,92 \pm 0,10$  e  $1,10 \pm 0,11$  havendo diferença estatística entre os animais do grupo 1 em relação ao animais dos grupos 2 e 3, e as taxas de crescimento do FD do D8 ao D10 foi de  $2,40 \pm 0,08$ ;  $2,28 \pm 0,11$  e  $2,23 \pm 0,10$  não havendo diferença significativa entre os grupos (Tabela 2).

As taxas de crescimento até o oitavo dia foram menores em comparação com a taxa de crescimento do folículo dominante da onda ovulatória de um ciclo estral normal ( $1,2 \pm$

0,1 mm/dia; GINTHER et al., 1989), em contra partida as taxas de crescimento do D8 ao D10 foram maiores sendo o aumento na frequência dos pulsos de LH pela diminuição nos níveis de progesterona uma justificativa para tal resultado.

Lammoglia et al. (1998) observaram que a administração de BE 24 a 30 horas após a retirada do implante de progesterona em vacas e novilhas resultou em um maior pico na concentração de  $17\beta$ -estradiol, maior número de animais demonstrando estro, maior número de animais apresentando o pico pré-ovulatório de LH e reduziu o intervalo entre a retirada do implante e o pico de LH. A aplicação de 0,5 a 1,0 mg de BE 24 horas após a retirada dos implantes de progesterona sincroniza o estro e a ovulação aumentando inclusive a porcentagem de fêmeas bovinas que ovulam após o tratamento (MACMILLAN, 1999).

O uso de um indutor da ovulação após a retirada do implante de progesterona, como foi realizado nos grupos 1, 2 e 3 onde se utilizou 1 mg de BE e 100  $\mu$ g de GnRH, só vem auxiliar nos índices de sucesso de programas de sincronização de estro para IATF.

Neste estudo, o diâmetro médio do maior folículo presente nos ovários no momento da retirada do implante de progesterona (grupo 1 -  $10,71 \pm 0,30$ , grupo 2 -  $9,41 \pm 0,24$  e grupo 3 -  $9,75 \pm 0,35$ ) nos embasa de que houve uma resposta adequada ao protocolo de sincronização utilizado, visto que Pursley et al. (1995) relataram que folículos com diâmetros iguais ou superiores a 8 mm possuem maior capacidade ovulatória, por apresentarem maior quantidade de receptores para LH nas células da granulosa.

O diâmetro médio do folículo ovulatório (D10) foi de  $13,1 \pm 0,23$  mm (grupo 1),  $11,7 \pm 0,22$  (grupo 2) e  $12,0 \pm 0,34$  (grupo 3) (tabela 1). Estes valores são semelhantes aos 11,60 mm verificados por Cavalieri et al. (2002) em novilhas *Bos taurus indicus* sincronizadas com dispositivo intravaginal de P4 e aplicação de BE 24 horas após a remoção do progestágeno.

Nestas mesmas condições, Garcia e Salaheddine (2001) verificaram média de 13,60 mm para o folículo ovulatório de novilhas da raça Holandesa. Figueiredo et al. (1997) encontraram valores entre 11,00 e 12,00 mm para os folículos pré-ovulatórios de vacas Nelore durante o ciclo estral normal.

Coutinho et al. (2007) ao analisarem o diâmetro médio de folículo ovulatório em bovinos da raça Guzerá, com ciclos de duas, três e quatro ondas de crescimento folicular, relataram que a ovulação ocorre com diâmetro folicular médio de  $12,31 \pm 0,53$  mm.

Martinez et al. (2000) encontraram valor médio de 12,80 mm para o folículo pré-ovulatório de novilhas taurinas submetidas a protocolos que utilizaram a associação entre progestágenos e estradiol no início do protocolo superovulatório. Nestas mesmas condições, Garcia e Salaheddine (2001) verificaram média de 13,60 mm para o folículo ovulatório de novilhas da raça Holandesa. Esses dois últimos trabalhos apresentaram valores de diâmetro médio do folículo ovulatório muito próximos dos 13,30 mm descritos por Sirois e Fortune (1988) para novilhas Holandesas durante o ciclo estral normal.

Adicionalmente aos autores citados, Bridges et al. (1999) relataram 11,80 mm como diâmetro médio do folículo no momento da ovulação, em vacas taurinas de corte submetidas à sincronização da ovulação, resultado esse também iguais ao sugerido nesse estudo, também com animais zebuínos.

A situação da disponibilidade reduzida de forragem para as matrizes no presente estudo, não se refletiu em incapacidade de resposta ovariana à estimulação hormonal, como pode ser observado pelo tamanho médio dos folículos pré-ovulatórios (Tabela 1), o que corrobora com os relatos de Sá Filho et al. (2009), ao descreverem influência significativa da condição corporal sobre a taxa de prenhez.

A ovulação ocorreu, em média,  $43,6 \pm 6,89$  horas para os animais do grupo 1,  $41,0 \pm 11,25$  para os animais do grupo 2 e  $38,2 \pm 7,89$  para os animais do grupo 3 após a aplicação do BE ou do GnRH no D9 do protocolo.

Barros et al. (2000) relataram intervalo de 44,16 horas entre a aplicação do BE e a ovulação em vacas Nelore. Cavalieri et al. (2002), trabalhando com novilhas meio-sangue zebuíno de corte, observaram intervalo de  $50,4 \pm 1,7$  horas entre a aplicação do BE e a ovulação. Segundo Martinez et al. (2005), este mesmo intervalo foi de  $53,3 \pm 1,9$  horas em vacas taurinas. Os valores obtidos neste estudo estão abaixo dos relatados pela literatura, provavelmente devido ao menor diâmetro do FD observado neste experimento. Para os intervalos anteriormente discutidos verificou diferença ( $p > 0,05$ ) entre os animais do grupo 1 e os animais do grupo 2 e 3.

Nos animais as ovulações ocorreram entre 45,6 e 57 horas, o que demonstra o alto grau de sincronia promovido por tais protocolos. Se os animais fossem inseminados entre 52 e 56 horas após a retirada do implante, como recomendado por CUTAIA et al. (2003), provavelmente apresentariam bons resultados de fertilidade.

As taxas de ovulação dos grupos 1, 2 e 3 foram respectivamente, 83,34% (5/6), 66,67% (4/6) e 50% (3/6). A taxa de ovulação dos animais do grupo OVSYNCH (grupo 3)



foi considerada baixa quando comparada aos 100% de taxa de ovulação verificado em vacas *Bos taurus taurus* (PURSLEY, 2006).

Dados de literatura relatam que a taxa de ovulação em vacas Nelore submetidas à IATF varia de 64,3% (SALES et al., 2008) a 93,3% (CREPALDI et al., 2009) e está relacionada com a condição corporal (SALES et al., 2009). Meneghetti et al. (2009) encontraram taxa de ovulação de 90,9% em vacas Nelore com condição corporal 3 e de 91,1% e 91,5% em vacas com condição corporal 3,5 e 4, respectivamente. Outros estudos recentes (PERES et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2010b) encontraram resultados similares. No entanto, vacas com baixa condição corporal apresentam baixa taxa de ovulação após o protocolo para IATF com P4 e BE (SÁ FILHO et al., 2009).

Estudos indicam que nem sempre o tratamento com GnRH promove a ovulação ou a luteinização do folículo dominante, e que a emergência sincronizada da nova onda de crescimento folicular ocorre somente quando o tratamento induz a ovulação (PURSLEY, 2006).

Figura 2 – Dinâmica folicular dos animais do grupo 1 (BE+BE) do D0 ao D10

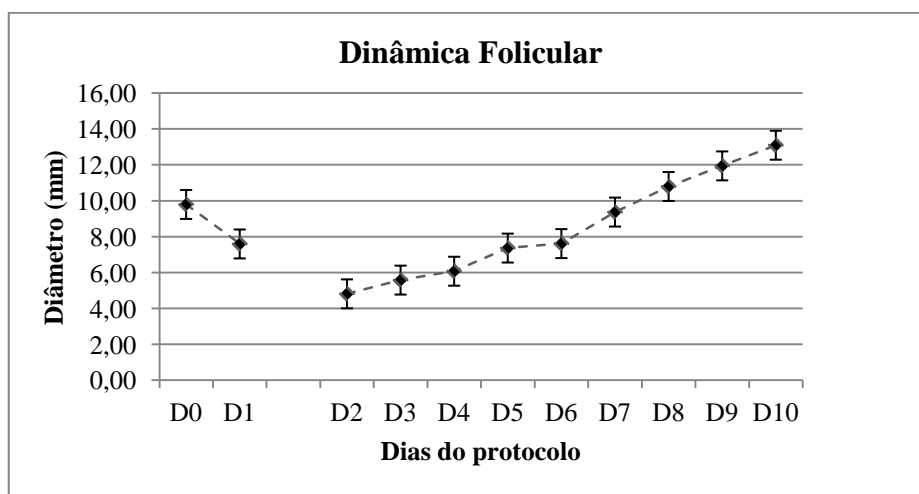


Figura 3 – Dinâmica folicular dos animais do grupo 2 (BE+GnRH) do D0 ao D10

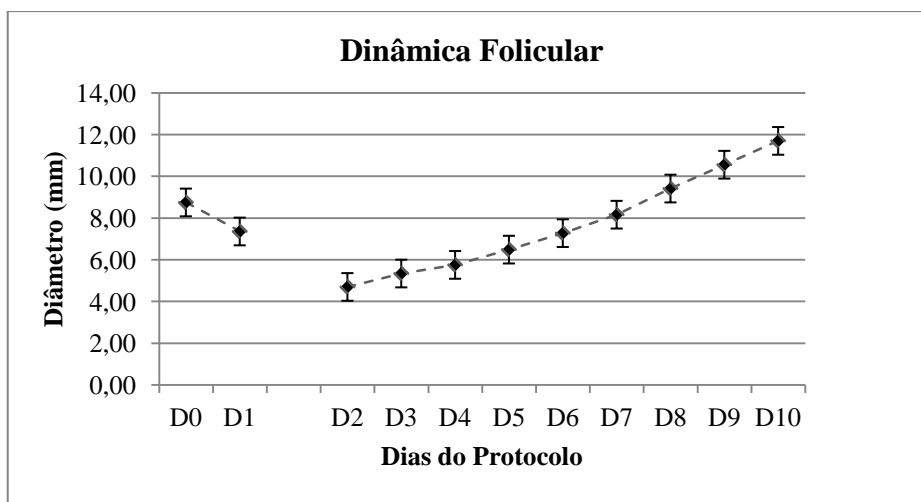
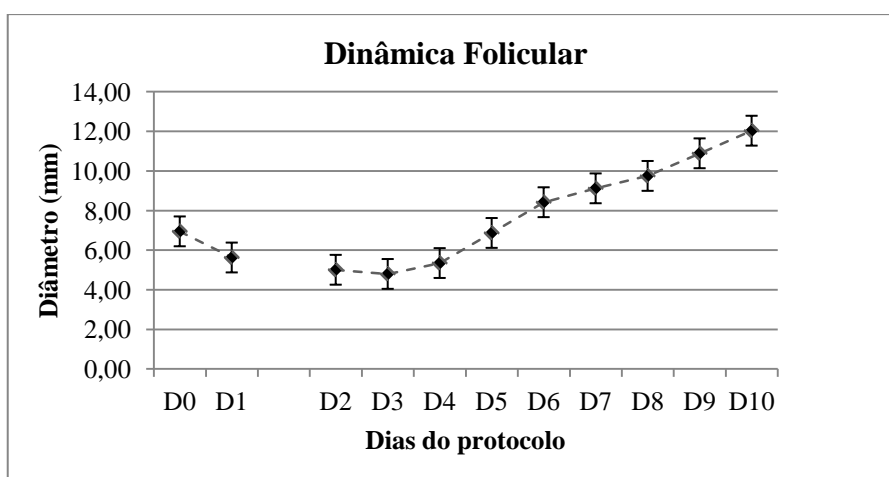


Figura 4 – Dinâmica folicular dos animais do grupo 3 (OVSYNCH) do D0 ao D10



### Conclusão

Podemos concluir, portanto que os protocolos dos grupos experimentais 1 e 2 foram mais eficientes em promover a sincronização da ovulação e são indicados para utilização em programa de inseminação artificial em tempo fixo em vacas da raça Guzerá.

## Referências

- AYRES, M., AYRES Jr., M., AYRES, D.L., SANTOS, A.S. BioEstat 2.0 – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil Mamirará: Belém, Brasília: CNPq
- BADINGA, L.; THATCHER, W.W.; WILCOX, C.J. Effect of season on follicular dynamics and plasma concentrations of estradiol-17 $\beta$ , progesterone and luteinizing hormone in lactating holstein cows. *Theriogenology*, v.42, p.1263-1274, 1994.
- BALL, P. J. H.; PETERS, A. R. Reprodução em bovinos. 3.ed. São Paulo: Roca, 2006. 232p.
- BARROS, C.M., M.P.B. MOREIRA, R.A. FIGUEIREDO, A.B. TEIXEIRA AND L.A. TRINCA. 2000. Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using GnRH, PGF2 $\alpha$  and estradiol benzoate. *Theriogenology*, 53: 1121-1134.
- BARUSELLI P.S., REIS, E.L., MARQUES M.O., NASSER L.F., BÓ G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci*, v.82-83, p.479-486, 2004.
- BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v. 31,n.2, p. 205-211. 2007.
- BRIDGES, P. J. et al. Follicular growth, estrus and pregnancy after fixed-timed insemination in beef cows treated with intravaginal progesterone inserts and estradiol benzoate. *theriogenology*, v. 52, p. 573-583, 1999.
- CACCIA M. & BÓ, G.A. 1998. Follicle wave emergence following treatment of CIDR implanted beef cows with estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology*. 49: 34.
- CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, N. A.T.; REIS, E. L.; NICHI, M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in

Bos indic us, Bos indicus x Bos taurus, and Bos taurus heifers. *Theriogenology*, v. 69, p. 167-175, 2008.

CAVALIERE, J.; SMART, V. M.; HEPWORTH, G.; RYAN, M.; MacMILLAN, K. L. Ovarian follicular development and hormone concentrations in inseminated dairy cows with resynchronized estrous cycles. *Theriogenology*, v. 70, p. 946-955, 2008.

CAVALIERI, J., C. COLEMAN, H. RODRIGUES, K.L. MACMILLAN AND L.A. FITZPATRICK. 2002. The effect of timing of administration of oestradiol benzoate on characteristics of oestrus, timing of ovulation and fertility in Bos indicus heifers synchronized with a progesterone releasing intravaginal insert. *Aust. Vet. J.*, 80: 217-223.

COUTINHO, G. T. R. M. et al. Avaliação ultra-sonográfica da dinâmica folicular e lútea em vacas da raça Guzerá. *arq. bras. med. vet. Zootec.* v. 59, p. 1089-1096, 2007.

CREPALDI, G. A. Eficácia de diferentes protocolos de indução da ovulação e de intervalos de inseminação em vacas de corte submetidas à IATF. 2009. 87 f. . Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CUTAIA, L. et al. Inseminación artificial a tiempo fijo utilizando dispositivos intravaginales con progesterona: criterios para la elección del tratamiento y factores condicionantes. In: 2º Simpósio de Reprodução de Bovinos, Porto Alegre-RS, p.28-40, 2003.

FERRAZ, H.T.; VIU, M.A.O.; LOPES, D.T. Sincronização da ovulação para realização da inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. *PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia* v.2, n.12, 2008. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/texto.php?id=180> Acesso em: 05/09/2011.

FERREIRA, A. M. Efeito da amamentação e do nível nutricional na atividade ovariana de vacas mestiças leiteiras. 1990. 134f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

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

FIGUEIREDO, R.A., C.M. BARROS, O.L. PINHEIRO AND J.M.P. SOLER. 1997. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*, 47: 1489-1505.

GAMBINI, A.L.G.; MOREIRA, M.B.P.; CASTILHO, C. Desenvolvimento folicular e sincronização da ovulação em vacas da raça Gir. *Rev.Bras. Reprod. Anim.*, v.22, p.201-210, 1998.

GARCIA, A.; SALAHEDDINE, M. Effect of oestrus synchronization with estradiol 17 $\beta$  and progesterone on follicular wave dynamics in dairy heifers. *reproduction of Domestic animals*, v. 36, p. 301-307, 2001.

GINTHER O.J., KASTELIC J.P. & KNOPF L. 1989. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Animal Reproduction Science*. 20(3): 187-200.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E.H.; VALE, W.G. Semiologia do trato genital feminino. In: \_\_\_ Patologia e clínica da reprodução dos animais mamíferos domésticos: ginecologia. São Paulo: Varela, 2005a, p.181-251.

Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA. Dados de Precipitação Pluviométrica de Pernambuco. Disponível em: <http://www.ipa.br>. Acesso em: 05/10/2011.

LAMMOGLIA M.A., SHORT R.E., BELLOWS S.E., BELLOWS R.A., MACNEIL M.D. & HAF H.D. 1998. Induced and synchronized estrus in cattle: Dose titration of estradiol benzoate in prepubertal heifers and post-partum cows after treatment with an intravaginal progesterone-releasing insert and prostaglandin F $_{2\alpha}$ . *Journal of Animal Science*. 76(6): 1662-1670.

MARTINEZ, M. F. et al. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. *theriogenology*, v. 54, p. 757-769, 2000.

MARTINEZ, M.F., J.P. KASTELIC, G.A. BÓ, M. CACCIA AND R.J. MAPLETOFT. 2005. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 86: 37-52.

MELO, L. C. Dinâmica folicular de vacas de corte tratadas com três protocolos de sincronização da ovulação. Santa Maria-RS: Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária). *Reproduction Science*, v.60-61, p.433-442, 2000.

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

MORENO D., CUTAIA L., VILLATA L., ORTISI F. & BO G. 2001. Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol and progesterone. In: *Proceedings of the Annual Conference International Embryo Transfer Society (Omaha, U.S.A.)*. p.408.

O'ROURKE M., DISKIN M.G., SREENAN J.M. & ROCHE J.F. 2000. The effect of dose and route of oestradiol benzoate administration on plasma concentrations of oestradiol and FSH in long-term ovariectomised heifers. *Animal Reproduction Science*. 59(1-2): 1-12.

PURSLEY, J. R. As chances não existem.. IN: *Novos enfoques na produção e reprodução de bovinos 10. Anais... Uberlândia, CONAPEC Jr., 2006*

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

SALES, J. N. S.; CARVALHO, J. B. P.; CREPALDI, G. A.; MAIO, J. R. G.; CARVALHO, C. A. B.; BARUSELLI, P. S. Rate and timing of ovulation in Nelore cows treated with estradiol cypionate or benzoate to induce ovulation on FTAI protocols. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 16.; 2008, Budapeste. [Proceedings...]. Berlin: Wiley-Blackwell, 2008. v. 43. p. 181.

SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A.; DIAS, L.M.K.; TEIXEIRA, A.A.; CARDOSO, G.G.C.; GRANDINETTI, R.R.; OLIVEIRA, V.G.; COMBI, I.M.; BARUSELLI, P. S. Evaluation of different protocols to induce cyclicity in prepubertal beef heifers. In: International Symposium on Animal Biology of Reproduction, 2., São Paulo. Animal Reproduction. Belo Horizonte: Brazilian College of Animal Reproduction, 2009. v. 6. p. 234.

SANTOS, M.H.B. et al. Diagnóstico de gestação por ultra-sonografia de tempo real. In: \_\_\_ et al. Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha. São Paulo: Varela, 2004. p.97-116.

SAVIO JD, KEENAN L, BOLAND MP, ROCHE JF. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. J Reprod Fertil, v.83, p.663-671, 1988.

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

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

SMITH, R.F.; DOBSON, H. Hormonal interactions within the hypothalamus and pituitary with respect to stress and reproduction in sheep. Domestic Animal Endocrinology, v.23, p.75-85, 2002.

ZAR, J.H. Biostatistical analysis Third Edition. Prentice Hall, New Jersey, 1996.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação pode-se concluir que manejos reprodutivos sejam aplicados para vacas da raça Guzerá, especialmente quanto ao momento de aplicação do indutor de ovulação. Embora os tratamentos com implantes vaginais de progesterona no início do protocolo de sincronização tenham apresentados tendências em sincronizar de forma mais eficiente a ovulação se comparados aos aniamis do protocolo Ovshych, concluímos que os três protocolos são indicados para utilização em programas de inseminação artificial em tempo fixo.



## APÊNDICES

## APÊNDICE A – ANIMAIS QUE FIZERAM PARTE DO EXPERIMENTO



## APÊNDICE B – IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS DO EXPERIMENTO





## APÊNDICE C – LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXAMES ULTRASSONOGRÁFICOS



## APÊNDICE D – REALIZAÇÃO DOS EXAMES ULTRASSONOGRÁFICOS





## ANIMAL REPRODUCTION

### Instructions to authors

The Animal Reproduction–AR publishes original scientific papers and invited literature reviews, with a goal of contributing to a better understanding of phenomena related to animal reproduction.

All correspondence should be sent to:

Editor

Animal Reproduction

Alameda das Princesas 1275 – Bairro São José

31275-180 – Belo Horizonte, MG – Brasil

Tel.: +55 (31) 3491-7122 - Fax: +55 (31) 3491-7025

E-mail: animreprod@cbra.org.br

### Submission of Manuscripts

All manuscripts must be original and copyright should be transferred to the AR. The authors are entirely responsible for all data, concepts and information contained in the article. Manuscripts should be sent preferentially by email or by regular post on a PC readable CD-ROM, properly identified and accompanied by a copy of the written manuscript. Illustrations should be sent as separate files.

All manuscripts must be written in Standard American English. We recommend Merriam-Webster's Dictionary (Merriam-Webster's Online: <http://www.m-w.com/>) for spelling check. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by a reviewer familiar with scientific language and vocabulary. Manuscripts not written in acceptable Standard English will be returned to the author before being sent to the scientific reviewers. Manuscripts accepted for publication will be submitted to a final review of English by the Journal and the final version will be sent to the author for approval. The manuscripts that are not accepted will be returned to the authors. The AR Editors goal is to have the first decision about the acceptance or not of the manuscript in a time period of thirty days.

### Units of measurements, Abbreviations and Symbols

Units of measurements must be used according to the international System of Units. Abbreviations and Symbols – Avoid them unless using standard units of measurement.

## Complementary Information

The author is entitled to ten reprints. Copies and translation of any article for commercial use are prohibited and publication in other scientific journals must be approved by the AR.

## Revision Process

Manuscripts will be submitted to at least two reviewers and will be returned to the authors for final editing according to the reviewers suggestions. The revised manuscript should be sent to the Editor.

## Preparation of Manuscripts

1. Text Format and Files: Type all pages to A4 (21.0 x 29.7), with 3 cm margins, Times New Roman source 12, continuously and without formatting, double spaced, with numbered lines and numbered pages. The electronic file (.doc) should be formatted to MICROSOFT WORD (6.0 version or superior).

### 2. Manuscript Sections

- i. Title page
- ii. Abstract
- iii. Introduction
- iv. Materials and Methods
- v. Results
- vi. Discussion
- vii. References
- viii. Acknowledgements
- ix. List of abbreviations used
- x. Tables
- xi. Figures

3. Title page: The title should be succinct but include the study design and major topics.

a. Title words should be in bold, with only the first letter of the first word in upper case.

b. Author names are to be listed below the title, only the surname in full (first and middle names will be represented by the first letter followed by a period). Follow each name with exponents in Arabic numerals to indicate affiliations and addresses (e.g.: R.A. Hess<sup>1</sup>; K. Carnes<sup>2</sup>).

c. Addresses should be listed below the author names and in numerical order.

d. Corresponding author should be listed next with complete mailing address, phone and fax number, and email address.

e. Article type: indicate the area in which the article fits best: Basic Research, Biotechnology or Applied Research.

f. Running title: no more than 50 letters, including spaces.

4. Abstract: State clearly the purpose of the work, indicate the methods used and summarize conclusions. Limit: 300 words. Keywords should be listed after the abstract. Maximum of 5 keywords.

5. Introduction: This section should provide background information leading up to the hypothesis tested. The section should end with a very brief statement of the objectives of the work.

6. Methods: Should include the design of the study, type of materials involved, number of animals per group, a clear description of all methods used and/or clear references to published methods, and the type of analysis used.

7. Results: The results section may be broken into subsections with short, informative headings. State clearly and objectively the main results found.

8. Discussion: This section may be broken into subsections with short, informative headings. The discussion should be focused on the results found. It is recommended that the main conclusions supported by the research data be stated as a last paragraph.

9. Acknowledgments: Should be briefly expressed. Grant support with the author initials (i.e., DHP) should be indicated in this section..

10. Tables: A set of alphanumerical data that is organized in lines and columns. Begin each table on a new page. Tables must be as simple as possible and only horizontal lines should be used at the top and bottom of the table. The table legend, at the top, must receive initially the word Table, followed by its number in Arabic numerals and referred to in the text as Table. The legends of the tables must be sent separately.

12. Figures and figure legends: Any illustration that contains line drawings, photographs, graphics, schemes, fluxograms etc. are considered as figures. They should be identified and sent in separate file. The list of table titles and figure legends should begin on a new page within the text. In the text refers to the figures in the numerical order that they are listed; i.e., Fig. 1, Fig. 2, Figs. 1-2, etc. The legends of the figures must be sent separately.

13. References: Begin the reference list on a new page. Please see below examples for references cited in the text and for the reference list.

TEXT CITATION - Indication of the source parenthetically after the citation in order to avoid interruption in the sequence of the text. In case the names of the authors are integrated in the text, the date of publication is mentioned between parenthesis, after the name of the author, according to the examples:

- a) sole author: (Ginther, 1992) or Ginther (1992).
- b) two authors: (Varley and Foxcroft, 1990) or Varley and Foxcroft (1990).
- c) more than two authors: (Quintero et al., 2000) or Quintero et al. (2000).
- d) more than one paper cited: (Varley and Foxcroft, 1990; Ginther, 1992; Gastal et al., 1999a; b; Quintero et al., 2000) or Varley and Foxcroft (1990); Ginther (1992); Gastal et al., (1999a; b); Quintero et al. (2000), always cited in ascending chronological order.

REFERENCE LIST - Cite only referred, published work. Use "in press" only when formal acceptance has been granted. References must be listed in alphabetical order.

- For PERIODICALS

Gastal EL, Gastal MO, Ginther OJ. 1999a. Experimental assumption of dominance by a smaller follicle and associated hormonal changes in mares. *Biol Reprod*, 61:724–730.

Gastal EL, Donadeu FX, Gastal MO, Ginther OJ. 1999b. Echotextural changes in the follicular wall during follicle deviation in mares. *Theriogenology*, 52:803-814.

Hess RA, Carnes K. 2004. The role of estrogen in testis and the male reproductive tract: a review and species comparison. *Anim Reprod*, 1:5-30.

Sartori R, Souza AH, Guenther JN, Caraviello DZ, Geiger LN, Schenk JL, Wiltbank MC. 2004. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. *Anim Reprod*, 1:86-90, 2004.

Varley MA, Foxcroft GR. 1990. Endocrinology of lactating and weaned sow. *J Reprod Fertil Suppl*, 40:47-61.

- For OTHER DOCUMENTS than periodicals

Basrur PK, Yusoff RBH. 1997. Sex anomalies in goats. In Youngquist, RS (Ed.). *Current therapy in large animal theriogenology*. Philadelphia, USA: WB Saunders. pp.553-290

Ginther OJ. 1992. *Reproductive biology of the mare: Basic and applied aspects*. 2.ed. Cross Plains, WI, USA: Equiservices Publishing. pp.105-172.

Leal MC. 2004. *Morphometric and functional analyses of testis and spermatogenic efficiency in the marmoset (Callithrix penicillata) [in Portuguese]*. Belo Horizonte, Brazil: Federal University of Minas Gerais. Thesis.

Quintero B, Porter M, Sharp D, Cleaver B, Diaz T. 2000. Effect of season on LH concentrations and LH pulse dynamics in mares located in the tropics. In *Abstracts of the 14th International Congress on Animal Reproduction, 2000, Stockholm, Sweden*. Stockholm: ICAR. pp .290.

- For ELECTRONIC DOCUMENTS  
CD-ROM

Anderson SC, Poulsen KB. 2002. Anderson's electronic atlas of hematology [CD-ROM]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Journal article on the Internet

Abood S. 2002. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [serial on the Internet], 102: 3pp. Available in: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>. Accessed in: Aug 12th 2002.

Monograph on the Internet

Foley KM, Gelband H. (Eds.). 2001. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>. Accessed in: July 9th. 2002.

Homepage/Web site

Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. 2002. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc. Available in: <http://www.cancer-pain.org/>. Accessed in: Jul 9th. 2002.

Part of a homepage/Web site

American Medical Association [homepage on the Internet]. 2001. Chicago: The Association. Available from: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>. Accessed in: Aug 12th. 2002.

Database on the Internet

Open database:

Who's Certified [database on the Internet]. 2000. Evanston, IL: The American Board of Medical Specialists. Available from: <http://www.abms.org/newsearch.asp>. Accessed in: Mar 8th. 2001.

Closed database:

Jablonski S. 2001. Online Multiple Congenital Anomaly/Mental Retardation (MCA/MR) syndromes [database on the Internet]. Bethesda, MD: National Library of Medicine. Available from:

[http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome\\_title.html](http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html). Accessed in: Aug 12th. 2002.

Part of a database on the Internet

MeSH Browser [database on the Internet]. 2002. Bethesda, MD: National Library of Medicine. Meta-analysis; unique ID: D015201; [3pp.]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html> Files updated weekly. Accessed in: Jun 10th. 2003.

- NON PUBLISHED WORK – Should be mentioned only in the text and not in the list of references.

- VERBAL INFORMATION- References concerning unpublished data and “personal communications” should not be cited in the reference list but should be mentioned in the text. After the information, the author must put the expression “verbal information” or “personal communication”)

13. There is no page charges and figures limit. Particularly in case of colorful pictures please contact the editors.

14. If you have any question please report to the Animal Reproduction Website (<http://www.cbpa.org.br/animreprod>) and see previously published articles.