

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**SISTEMA PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL SEM
OBSERVAÇÃO DE ESTRO EM VACAS DE CORTE
AMAMENTANDO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luiz Felipe Krueel Borges

Santa Maria, RS, Brasil

2008

**SISTEMA PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL SEM OBSERVAÇÃO
DE ESTRO EM VACAS DE CORTE AMAMENTANDO**

por

Luiz Felipe Krueel Borges

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Fisiopatologia da Reprodução, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof. Paulo Bayard Dias Gonçalves

Santa Maria, RS, Brasil.

2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**SISTEMA PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL SEM OBSERVAÇÃO
DE ESTRO EM VACAS DE CORTE AMAMENTANDO**

elaborada por
Luiz Felipe Krueel Borges

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora:

Paulo Bayard Dias Gonçalves, PhD.
(Presidente/Orientador)

Alceu Mezzalira, Dr. (UDESC)

Marlon Nadal Maciel, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 27 fevereiro de 2008

DEDICATÓRIA

À minha avó Dely Piccini Borges (*in memoriam*),
pelo exemplo de vida, crescimento humano e apoio,
à ti, minha gratidão, meu reconhecimento e minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

A todos os meus familiares, em especial ao meu pai Luiz Francisco Piccini Borges e minha mãe Karin da Silva Kruehl, pelo apoio e carinho nos vários períodos de minha vida;

Aos meus “*tios-pais*” Antônio Augusto Piccini Borges e Martha Paniz Borges pelo exemplo de vida e referência de família unida e feliz.

À minha avó Dely Piccini Borges (*in memoriam*) pelo incansável incentivo no meu aprendizado e formação;

À Caroline Flores Zielinski, pelo amor, carinho e conforto por todos estes anos;

Aos meus orientadores Paulo Bayard Dias Gonçalves e João Francisco Coelho de Oliveira, pela orientação, pela amizade e sinceridade nas decisões de pesquisa.

A todos os colegas do laboratório BioRep (UFSM), em especial ao Rogério Ferreira, Lucas Carvalho Siqueira, Rodrigo Camponogara Bohrer e Jacson William Borstmann, pela amizade que sempre demonstraram e ajuda incondicional em todas as etapas deste trabalho, vocês foram essenciais para realização deste trabalho;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, pela transmissão de conhecimentos;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo ao longo do curso;

Aos amigos veterinários Gabriel Amilcar Bó, Lucas Cutaia e David Maraña Peña pela amizade, ensinamentos e principalmente pela oportunidade de conhecê-los;

Aos amigos Igor Carlotto, Juliana Argenta, Marcelo Weiss e Ricardo Rocha pela amizade sincera e parceria por todos estes anos que nos conhecemos, vocês foram muito importante na minha caminhada;

Aos proprietários e funcionários da Estância do Angico pela cedência dos animais, apoio e, principalmente, pela adesão à tecnologia ligada ao campo;

Enfim, a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram e torceram por mim.

Muito obrigado!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

SISTEMA PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL SEM OBSERVAÇÃO DE ESTRO EM VACAS DE CORTE AMAMENTANDO

AUTOR: LUIZ FELIPE KRUEL BORGES

ORIENTADOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 27 de fevereiro de 2008.

O objetivo deste estudo foi desenvolver um protocolo de inseminação artificial com tempo fixo (IATF) em vacas de corte amamentando, avaliando o intervalo entre a retirada do progestágeno e a aplicação de GnRH sobre a dinâmica folicular e a prenhez. Para isto, 227 vacas 60-80 dias pós-parto receberam benzoato de estradiol (5mg) e um pessário vaginal de acetato de medroxiprogesterona (250mg MAP; dia 0). No dia seis, cloprostenol sódico (125µg), gonadotrofina coriônica eqüina (400UI) e desmame temporário (88h). O MAP foi retirado no dia sete (Grupo BioRep) ou no dia oito (Grupo IATF) e, 48h ou 24h após os animais receberam GnRH (100µg; dia 9), respectivamente. No experimento I, o monitoramento das estruturas ovarianas de 14 vacas foi realizado a cada 24h, desde o dia seis até 36h após a aplicação de GnRH em ambos os grupos. O tamanho médio do folículo dominante no dia nove foi de $11,1 \pm 0,99$ mm (BioRep n=7) e $11,5 \pm 0,65$ mm (IATF n=7) e todos os animais ovularam. No experimento II, no grupo BioRep (n=106), após a retirada do MAP, as fêmeas foram inseminadas com detecção de estro durante 48 horas. O restante dos animais do grupo BioRep e todos do grupo IATF (n=107) receberam 100µg de GnRH (dia 9) e, após 16h, IATF. Os índices de prenhez foram de 57,6% (BioRep) e de 52,3% (IATF). O intervalo de 24h entre a retirada do MAP, mantido por 8 dias, e a aplicação de GnRH não interfere na dinâmica folicular e prenhez, viabilizando inseminar vacas de corte amamentando sem observação de estro.

Palavras-chave: vacas de corte, pós-parto, IATF, GnRH, MAP, dinâmica folicular, ovulação.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

ARTIFICIAL INSEMINATION SYSTEM WITHOUT ESTRUS OBSERVATION IN SUCKLED BEEF COWS

AUTOR: LUIZ FELIPE KRUEL BORGES
ORIENTADOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 27 de fevereiro de 2008.

The aim of this study was to develop a timed artificial insemination system (TAI) in suckled beef cows. For this, in 227 cows 60-80 days postpartum, received estradiol benzoate (5mg) and a vaginal device containing 250mg of medroxyprogesterone acetate (MAP; day 0). On day six, prostaglandin analogous (125µg), eCG (400IU) was administered and calves were removed for 88h. The device was removed on day seven (BioRep group) or on day eight (TAI group) and the cows of both groups received GnRH (100µg; day 9) 48h or 24h after device withdrawal, respectively. Experiment I: the follicular growth was daily monitored, from day 6 to day 9 (36h after GnRH), in 14 cows. The average of dominant follicle size on day nine was 11.1 ± 0.99 mm (BioRep, n=7) and 11.5 ± 0.65 mm (TAI, n=7) and all animals ovulated. Experiment II: in the BioRep group (n=106), the cows was observed for estrus behavior after withdrawal the device, twice a day during 48h and inseminated at 12h after detection; In the TAI group (n=107), the devices were withdrawn on day eight and after 24h these cows and those from the BioRep group, which were not stand in estrus, received 100µg of GnRH and TAI 16h later. The pregnancy rates were 57.6% (BioRep) and 52.3% (TAI). The time of MAP exposure and the period from MAP to GnRH did not affect the follicular dynamic and pregnancy rates. Furthermore, the treatment for eight days allows an efficient TAI system in suckled beef cows.

Key words: beef cows, postpartum, TAI, GnRH, MPA, follicular dynamic, ovulation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Delineamento experimental, sendo que o painel A corresponde ao grupo BioRep e o painel B ao grupo IATF. MAP: pessário vaginal contendo 250mg de acetato de medroxiprogesterona; BE: 5mg de benzoato de estradiol intramuscular; PGF_{2alfa}: 125µg de análogo de prostaglandina na submucosa vulvar; eCG: 400UI de gonadotrofina coriônica eqüina intramuscular; Desmame: separação dos bezerros temporariamente por 88h; GnRH: 100µg de GnRH intramuscular; IATF: inseminação artificial em tempo fixo. No experimento I: os exames ultra-sonográficos em ambos os grupos foram desde o dia 6 até 36h após o GnRH. No experimento II: a IATF foi 16h após aplicação de GnRH.....41

FIGURA 2 - Tamanho do folículo dominante desde a aplicação do eCG (dia 6) até a aplicação de GnRH (dia 9). A média dos diâmetros foliculares não diferiu entre os grupos. Também, não houve interação grupo X dia. Porém, foi observado um crescimento folicular durante os dias de avaliação ($P < 0,001$).....42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Índices de concepção e prenhez em vacas 60-80 dias pós-parto, sincronizadas com distintos tempos de exposição ao acetato de medroxiprogesterona (MAP).....	43
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang-II: angiotensina II

BE: benzoato de estradiol

BMP15: fator ósseo morfogenético 15

CC: condição corporal

CG: células da granulosa

CL: corpo lúteo

CT: células da teca

eCG: gonadotrofina coriônica eqüina

E2: estradiol

FD: folículo dominante

FGF: fator de crescimento fibroblástico

FGFr: receptor para FGF

FSH: hormônio folículo estimulante

GDF9: fator de crescimento de diferenciação 9

GnRH: hormônio liberador de gonadotrofinas

h: hora

IA: inseminação artificial

IATF: inseminação em tempo fixo

IGF: fator de crescimento semelhante à insulina

IGFBPs: proteínas ligadoras do fator de crescimento semelhante à insulina

IM: intramuscular

LH: hormônio luteinizante

MAP: acetato de medroxi-progesterona

mg: miligrama

mm: milímetro

PGF₂alfa: prostaglandina

P4: progesterona

TGF β : fator de crescimento transformante β

UI: unidade internacional

μ g: micrograma

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	3
AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
SUMÁRIO	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Ciclo estral e dinâmica folicular	14
2.2 Período pós-parto	17
2.3 Sincronização e indução de estros	20
2.3.1 Prostaglandina	20
2.3.2 Hormônio Liberador de Gonadotrofinas - GnRH	20
2.3.3 Progestágenos e progesterona.....	22
2.3.4 Prostaglandina, progestágenos e estrógenos.....	23
3 CAPÍTULO 1	25
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura de corte no Brasil é caracterizada por uma baixa eficiência produtiva e reprodutiva. O período de anestro pós-parto prolongado é um dos fatores determinantes, permitindo que animais improdutivos permaneçam na propriedade. A disseminação e o sucesso da técnica de inseminação artificial (IA) são comprometidos diretamente por falhas na detecção de estro, acarretando perdas econômicas e gerando descrédito dessa biotecnologia de melhoramento animal. Isso se torna mais grave em rebanhos *Bos taurus indicus* e cruzas cujo comportamento reprodutivo apresenta particularidades, como estro de curta duração e elevado percentual de manifestação de estro durante a noite (GALINA et al., 1996; PINHEIRO et al., 1998; MIZUTA, 2003). A sincronização e indução de estros é uma biotécnica reprodutiva que tem por objetivo manipular o ciclo estral, controlando a dinâmica folicular. Assim, surge como uma ferramenta de manejo auxiliar, para melhorar as taxas de prenhez em vacas no pós-parto, visando induzir a ciclicidade, minimizar os efeitos ambientais e da amamentação, e principalmente facilitar o uso da IA. Desta maneira, o uso dessa biotécnica possibilita aumento da eficiência produtiva e sustentabilidade econômica do setor primário.

O conhecimento da regulação hormonal do ciclo estral e a racionalidade dos processos de indução/sincronização de estros são indispensáveis para adequar o seu uso, bem como a criação de novas biotecnologias. A associação de progestágenos ao benzoato de estradiol (BE) causam a supressão temporária da liberação de gonadotrofinas (O'ROURKE et al., 2000; MARTINEZ et al., 2005) independente do tamanho folicular (SIQUEIRA et al., 2006) e tem sido utilizado para indução de estro em vacas de corte (MAPLETOFT et al., 2002; BÓ, et al., 2003). No entanto, apesar das taxas aceitáveis de prenhez com médias próximas de 50% (FIKE et al., 1997; LAMMOGLIA et al., 1998; LUCY et al., 2001; MARTINEZ et al., 2002a,b; COLAZO et al., 2004), a variabilidade dos resultados é grande, oscilando entre 25 e 67% (FIKE et al., 1997; STEVENSON et al., 2000; FERNANDES et al., 2001; GEARY et al., 2001; BARUSELLI et al., 2002; MARTINEZ et al., 2002ab; BARUSELLI et al., 2003; KASIMANICKAM et al., 2006; SIQUEIRA et al., 2008). Um dos progestágenos sintéticos utilizados em bovinos é o acetato de medroxiprogesterona (MAP). Os pessários vaginais contendo MAP são uma alternativa interessante, proporcionando bons resultados com custo inferior aos outros dispositivos com progestágenos disponíveis no mercado (MORAES &

JAUME, 1997; MACIEL et al., 2001; BASTOS et al., 2004; LOGUÉRCIO et al., 2005; BRAGANÇA et al., 2007; SIQUEIRA et al., 2008).

Nosso laboratório, tendo como base diversos estudos de dinâmica folicular, gerou um protocolo para indução/sincronização de estros, denominado Sistema BioRep, que associa MAP por sete dias e BE (5mg). Além destes hormônios é utilizada a gonadotrofina coriônica eqüina (eCG; 400UI) e cloprostenol sódico (análogo de prostaglandina $F_{2\alpha}$; 125 μ g) no sexto dia. No nono dia os animais que não manifestarem estro são tratados com hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH; 100 μ g). Paralelamente a esse protocolo hormonal é realizado um desmame temporário dos bezerros por 88 horas. Todos os animais são inseminados até 65h após a retirada dos pessários vaginais, porém, associa um período de IA com detecção de estro de 48h e IA em tempo fixo (IATF). Para utilização desse processo, os animais devem estar com pelo menos 60 dias pós-parto e condição corporal mínima 3 (escala 1-5). Este sistema proporciona, com uma única IA, resultados que variam de 50-80% (MACIEL et al., 2001; BASTOS et al., 2004; LOGUÉRCIO et al., 2005; SIQUEIRA et al., 2008) com uma média de 65% de prenhez baseado na inseminação de mais de 3.000 animais (LOGUÉRCIO, et al., 2005). Porém, apesar desses resultados satisfatórios, esse sistema apresenta deficiências, como a utilização de desmame temporário por 88h e a necessidade de detecção de estro. Buscando eliminar a observação de estro deste sistema, Siqueira et al., (2008) substituíram o GnRH por BE e anteciparam a aplicação desse indutor da ovulação para 24h após a retirada do MAP, que foi mantido por 7 dias. Essa estratégia, no entanto, resultou em apenas 33% de prenhez comparado a 53% do sistema BioRep. Baseado nesses resultados pode-se formular a hipótese de que mantendo a exposição ao MAP por 8 dias e aplicando o GnRH 24h após a retirada do MAP, a manifestação de estro será minimizada, possibilitando a IATF com resultados semelhantes ao sistema BioRep.

A redução do manejo de detecção de estros é importante para difundir a inseminação nos rebanhos de corte e a IATF é uma ferramenta que possibilita a IA em muitos sistemas de produção. No entanto, é fundamental que esta diminuição de manejo não prejudique as taxas de prenhez. Deste modo, é importante avaliar se o intervalo entre a retirada do MAP e a aplicação do GnRH interfere no crescimento do folículo dominante. E ainda, verificar se a redução do intervalo entre a retirada do MAP, mantido por 8 dias, e a aplicação de GnRH permite IA sem detecção de estro.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ciclo estral e dinâmica folicular

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

A 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 uma delas com um folículo crescendo até o diâmetro pré-ovulatório. O advento da ultra-sonografia, técnica de avaliação não invasiva e em tempo real, confirmou a teoria de que os bovinos apresentam ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral, e foi demonstrado que cada ciclo tinha de duas até quatro ondas de crescimento folicular (PIERSON & GINTHER, 1988; SAVIO et al., 1988). Com esse tipo de exame, foi possível analisar a dinâmica folicular mediante a correlação temporal entre os eventos endocrinológicos e o aparecimento das estruturas ovarianas no decorrer do ciclo estral (GINTHER et al., 1989a; ADAMS et al., 1992).

A primeira onda de crescimento folicular inicia no dia da ovulação (Dia 0), e é reconhecida ultra-sonograficamente pela visualização de um grupo de folículos antrais (3 a 5mm) responsivos às gonadotrofinas. Essa etapa, denominada fase de recrutamento está associada à elevação das concentrações plasmáticas do hormônio folículo estimulante (FSH; ADAMS et al., 1992; HAUGIAN et al., 2004). A partir desse momento, os folículos crescem de forma linear e as concentrações de estrógenos e andrógenos aumentam (SUNDERLAND et al., 1994). Um folículo com diâmetro de aproximadamente 8,5mm adquire receptores para o hormônio luteinizante (LH) nas células da granulosa, momento denominado desvio (GARVERICK et al., 1992). Ao atingir o platô, pelo efeito positivo do LH, esse folículo dominante (FD), com altos níveis de estrógeno e inibina, entra na fase denominada estática na qual exerce sua dominância, causando a atresia dos demais folículos, denominados subordinados (GINTHER et al., 1989b). No entanto, o seu crescimento é limitado pela

progesterona (P4) secretada pelo corpo lúteo (CL; RAJAMAHENDRAN & MANIKKAN, 1994), que promove a diminuição da frequência dos pulsos de LH (BERGFELD et al., 1995).

Portanto, o crescimento do folículo, antes da fase de seleção, requer para o seu desenvolvimento a presença do FSH. Após esta fase, pulsos de LH são requeridos. Então, as concentrações de FSH são progressivamente diminuídas, até alcançarem níveis basais e no momento da seleção folicular, o crescimento do folículo e a produção folicular de estradiol necessitam pulsos de LH (GINTHER et al., 1997, 2000, 2002a; WILTBANK et al., 2002). O processo de crescimento e de atresia dos folículos perdura enquanto o corpo lúteo se mantiver funcional, o que ocorre mesmo durante a gestação (GINTHER et al., 1989b). Quando não há o reconhecimento materno da gestação, determinado pelo conceito através da produção de interferon-tau ocorre o processo de luteólise (THATCHER et al., 2001). O momento da regressão do corpo lúteo determina se o FD será ovulatório (GINTHER et al., 1989b). O crescimento do FD promove o aumento das concentrações de estrógenos, que desencadeia o mecanismo de retroalimentação positiva para a secreção do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) e o conseqüente pico de LH, promovendo a ovulação (FORTUNE, 1993).

Para que o processo de seleção e dominância folicular ocorra, além das gonadotrofinas, são necessários outros hormônios endócrinos, e principalmente fatores autócrinos e parácrinos produzidos no ambiente ovariano (GINTHER et al., 2001; RHODES et al., 2001; GINTHER et al., 2002b; BEG et al., 2002; HENDRIKSEN et al., 2003). De acordo com Fortune (1993), por um mecanismo de retroalimentação negativa no eixo hipotalâmico-hipofisário, a presença de altas concentrações de estradiol e inibina produzidas pelo FD provocam a diminuição das concentrações plasmáticas de FSH a níveis basais, bloqueando o crescimento dos folículos FSH-dependentes e acarretando a sua atresia. Entretanto, Fortune et al. (2004) demonstraram a importância do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) no mecanismo de dominância. Durante o desenvolvimento folicular, parte das ações do IGF-I está envolvida na estimulação da célula da granulosa, na proliferação da teca e na esteroidogênese (SPICER & STEWART, 1996).

O sistema IGF é composto dos dois ligantes (IGF I e II), dois receptores (tipo I e II), e seis proteínas ligadoras de IGF, as IGFBPs (1, 2, 3, 4, 5 e 6). As ações do IGF são mediadas principalmente através dos receptores tipo I e moduladas pelas IGFBPs, as quais inibem a diferenciação e crescimento folicular induzido pelas gonadotrofinas. Desta forma, mudanças nos níveis das IGFBPs levam a mudanças na biodisponibilidade de IGF, regulando a ação das gonadotrofinas nas células do folículo (FORTUNE et al., 2001). É importante salientar que a

IGFBP-4 é a proteína de ligação que inibe a ação do IGF em uma variedade de tecidos. Os folículos subordinados têm altos níveis de IGFBP-4 em relação ao dominante e a esteroidogênese é inibida pelas células ovarianas *in vitro*. Os efeitos inibitórios sobre o IGF podem ser antagonizados por ação de proteases específicas para IGFBP-4.

O fluido folicular obtido de folículos pré-ovulatórios de ciclos estrais naturais apresenta atividade proteolítica para IGFBP-4. Essa atividade é decorrente de uma metaloprotease. Além disso, o fluido folicular do folículo dominante apresenta maior atividade proteolítica, em relação aos subordinados ao redor do dia esperado da seleção folicular. Sendo assim, sugere-se que a aquisição, por parte do folículo dominante de uma atividade proteolítica para as IGFBPs-4, é fundamental no processo de dominância folicular. A protease IGFBP-4 reduz os níveis dessas proteínas, proporcionando uma maior biodisponibilidade de IGFs e mantendo o crescimento e desenvolvimento continuado do folículo selecionado em resposta à ação do FSH (RIVERA et al., 2001).

Além do sistema IGF, mais recentemente, outros fatores de crescimento têm sido estudados, tais como, membros da superfamília do fator de crescimento transformante- β (TGF β), fator de crescimento de diferenciação 9 (GDF9) e fator ósseo morfogenético-15 (BMP15) e membros da família do fator de crescimento fibroblástico (FGF; SUGIURA et al., 2007). Os BMPs agem como citocinas multifuncionais capazes de regular a proliferação celular, diferenciação, morfogênese e a apoptose. Fatores são expressos em ovários de mamíferos, incluindo BMP -4, -6, -7, -15 (GDF-9B), GDF-9 (ERICKSON & SHIMASAKI, 2003) e FGFs (BERISHA et al., 2000). Antes do pico do hormônio luteinizante (LH), BMP-15 e GDF-9 suprimem o hormônio folículo estimulante (FSH) e estimulam a expressão de RNAm para receptores de LH nas células da granulosa e após o pico do LH, estimulam a expansão das células do cumulus (SUGIURA et al., 2007).

Estudos recentes têm demonstrado a participação dos FGF durante a foliculogênese, evidenciando suas ações no crescimento folicular. Até o presente momento, o RNAm e/ou as proteínas dos FGF-1, 2, 7, 8, 10, 13 (PARROTT & SKINNER, 1998; BERISHA et al., 2004; BURATINI et al., 2004, 2005) e também dos receptores para FGF (FGFr) 2b, 3c e 4, já foram detectados em células de folículos antrais (BURATINI et al., 2005). O FGF-2 é o FGF mais extensivamente investigado na fisiologia folicular e seu principal sítio de expressão e produção é a camada da teca nos folículos antrais bovinos (BERISHA et al., 2000). Embora estudos de ligação tenham sugerido que o principal alvo do FGF-2 é a camada da granulosa (WANDJI et al., 1992), receptores para o FGF-2 também são expressos em células da teca (CT; BERISHA et al., 2004, BURATINI et al., 2005). De fato, ambos os tipos celulares

parecem responder ao FGF-2, já que ele induziu a proliferação e inibiu a esteroidogênese tanto em cultivo de células da granulosa (CG; VERNON & SPICER, 1994) quanto de CT (NILSSON et al., 2001). O FGF-7 é capaz de reduzir a produção de estrógeno nas células da granulosa. O FGF-10, o qual é produzido no oócito e nas CT, diminui sua expressão durante o crescimento folicular antral, sugerindo seu envolvimento no processo de recrutamento e emergência folicular (BERISHA et al., 2004; BURATINI et al., 2004).

Outro peptídeo que parece influenciar a foliculogênese é a angiotensina II (Ang-II). Ela pertence ao sistema renina-angiotensina-angiotensinogênio. Na reprodução dos bovinos, a Ang II está envolvida na maturação oocitária (GIOMETTI et al., 2005), fertilização *in vitro* (STEFANELLO et al., 2006), crescimento folicular (SCHAUSER et al., 2001; PORTELA et al., 2006) e no processo de indução da ovulação (ACOSTA et al., 1999; FERREIRA et al., 2007). Em outras espécies como no coelho, este peptídeo parece interagir com o sistema IGF e influenciar a esteroidogênese (YOSHIMURA et al., 1994; 1996). Em bovinos, aparentemente, a Ang-II influencia o crescimento folicular através do remodelamento da matriz extracelular (PORTELA et al., 2006). Porém, o mecanismo de ação pelo qual a angiotensina atua na foliculogênese ainda não está esclarecido.

2.2 Período pós-parto

O anestro pós-parto é um período de transição onde o útero e a função do eixo reprodutivo se restabelecem após uma gestação. É caracterizado como um momento onde as fêmeas bovinas não ovulam, principalmente devido a uma inadequada liberação de gonadotrofinas (YAVAS & WALTON, 2000a). A duração do anestro pós-parto está influenciada principalmente pela amamentação, estado nutricional e alguns outros fatores como estação que ocorreu o parto, idade e outros (YAVAS & WALTON 2000b).

Uma vaca de cria tem a potencialidade de produzir uma cria por ano, com intervalo entre partos de 12 meses (STAGG et al., 1995). No entanto, para atingir estes índices as vacas devem ficar prenhes entre os 75 e 85 dias pós-parto (BARUSELLI et al., 2003). Durante o final da gestação, o eixo hipotálamo-hipófise responde à ação de um feedback negativo dos esteróides placentários e ováricos (progesterona e estrógenos). Isto resulta em uma acumulação de FSH na hipófise anterior, suprimindo sua liberação, e esgotando as reservas de LH, provocando o bloqueio da atividade ovárica (YAVAS & WALTON, 2000b). Após o parto, os níveis de FSH e GnRH aumentam drasticamente, enquanto que os níveis de LH são muito baixos (YAVAS & WALTON, 2000a), produzindo a emergência da primeira onda

folicular entre os dias 2 e 7 depois do parto (WILTBANK et al., 2002). A dominância folicular é observada entre os dias 10 e 21 pós-parto, no entanto, esse folículo dominante é incapaz de ovular (STAGG et al., 1995) devido ao esgotamento das reservas de LH na hipófise anterior. Essas reservas são restabelecidas gradualmente após o dia 15 a 30 pós-parto (WILLIAMS et al., 1996; YAVAS & WALTON, 2000b) e é nesse período que o efeito da amamentação torna-se o principal fator que evita a ovulação das vacas com cria.

Segundo Short et al. (1972), além do estímulo espoliativo da mamada (sucção), o período de anestro pós-parto parece ser afetado por uma variedade de interações sensoriais e comportamentais entre a vaca e o seu terneiro. Em determinados momentos do pós-parto, a simples presença física do terneiro junto à mãe, é suficiente pra prolongar o período de anestro. A amamentação e interação do terneiro com sua mãe produzem liberação de opióides endógenos por parte da vaca, provocando um feedback negativo do estradiol sobre a liberação do GnRH (WILTBANK et al., 2002; YAVAS & WALTON, 2000b), evitando desta maneira a liberação pulsátil de LH necessária para a maturação e ovulação dos folículos.

Conforme o período pós-parto se estende, o hipotálamo torna-se menos sensível ao efeito do feedback negativo do estradiol, e então a liberação do GnRH ocorre cada vez mais freqüente, assim como os pulsos de LH, produzindo a maturação folicular, aumento dos níveis de estradiol, surgimento do pico pré-ovulatório de LH e finalmente a ovulação. O corpo lúteo (CL) resultante sofrerá uma lise precoce (ciclo curto), devido à prematura secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio, a qual possivelmente está relacionada com níveis baixos de progesterona (ZOLLERS et al., 1993) e estradiol (MANN & LAMMING, 2000) antes da ovulação e/ou com a liberação de ocitocina induzida pela amamentação (YAVAS & WALTON, 2000b). A partir deste momento, a ciclicidade será normal.

A condição nutricional durante o pós-parto precoce parece não afetar a quantidade de folículos que emergem em cada onda, nem o tempo necessário para apresentar o primeiro folículo dominante. Porém, o destino deste, ovulação ou atresia, é correlacionado com o balanço energético (anabolismo ou catabolismo) em que o animal se encontra (CICCIOLI et al., 2003). Sabe-se que deficiências nutricionais, principalmente de energia, têm um efeito negativo na liberação de GnRH e, portanto, nos pulsos de LH, na presença de baixas concentrações de estradiol circulantes (WILTBANK et al., 2002).

O desmame temporário e a aplicação de eCG propiciam condições de crescimento folicular e seu uso tem se mostrado satisfatório em rebanhos com baixa ciclicidade, condição corporal comprometida e pós-parto precoce (BARUSELLI et al., 2003, PEÑA et al., 2005a). As técnicas de desmame visam minimizar os efeitos inibitórios da amamentação, visuais e

táteis sobre a liberação de GnRH/LH no pós-parto (STAGG et al., 1998, GEARY et al., 2001). Podem ser realizados através de tabletas, por no mínimo 14 dias (PEÑA et al., 2005b) ou através da separação total dos terneiros por 48-120h, proporcionando incremento na pulsatilidade de GnRH/LH e diminuindo o intervalo entre partos (STAGG et al., 1998, GEARY et al., 2001). A gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) tem ação similar ao FSH e também ao LH, estimulando a esteroidogênese e o crescimento folicular (MURPHY & MARTINUK, 1991; DUFFY et al., 2004). O efeito da sua administração varia de acordo com a dose e o momento da aplicação, podendo levar à superovulação, se a administração ocorrer antes ou durante o processo de seleção e divergência folicular. Em programas de indução de estros, a aplicação da eCG ao final do período de exposição aos progestágenos, propicia um incremento na fertilidade de animais com baixas condições corporais (BARUSELLI et al., 2004). Quando este hormônio é administrado em doses baixas, antes da retirada do pessário vaginal, permite ao folículo dominante atingir maiores diâmetros nas 48h após a retirada do pessário (LOGUÉRCIO et al., 2005) resultando em incremento nas taxas de ovulação.

Outro fator que tem sido investigado como responsável em realizar a ligação entre a nutrição e a reprodução é a leptina. Esse hormônio e seus receptores já foram demonstrados em vários tecidos, como pâncreas, intestino, fígado, placenta, musculatura esquelética, cérebro, hipotálamo, hipófise e ovários. Porém, o principal local de produção deste hormônio é no tecido adiposo. Assim, animais com baixa condição corporal (CC) apresentam menores níveis plasmáticos de leptina, relacionando os seus efeitos sobre a reprodução de bovinos (ZIEBA et al., 2005). A administração exógena deste hormônio somente apresenta efeitos estimulatórios durante períodos de estresse nutricional (AMSTALDEN et al., 2003; GARCIA et al., 2004). A leptina em novilhas submetidas a jejum é capaz de prevenir a redução na frequência de pulsos de LH e também de aumentar a responsividade da hipófise anterior ao GnRH (MACIEL et al., 2004a). Em vacas em jejum, ela é capaz de alterar a secreção de GnRH e de LH (AMSTALDEN et al., 2002). Porém, estes efeitos não são importantes quando os animais estão bem alimentados (MACIEL et al., 2004b; ZIEBA et al., 2004; AMSTALDEN et al., 2005). Ao contrario do LH, o padrão de secreção de FSH parece não ser afetado pela subnutrição e conseqüente diminuição na leptinemia, possivelmente devido a uma menor influência do GnRH sobre a liberação deste hormônio (PADMANBHAN & MCNEILLY, 2001). Isto pode explicar por que vacas em pós-parto apresentam emergência folicular, mas não ovulação.

2.3 Sincronização e indução de estros

2.3.1 Prostaglandina

A prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) foi descoberta como uma luteolisina natural no início da década de 70 (McCRACKEN, 1972). A partir de então, esta substância e seus análogos têm sido os agentes farmacológicos mais utilizados nos tratamentos para sincronização do estro em fêmeas bovinas (ODDE, 1990). O sucesso da sincronização do estro com $PGF_{2\alpha}$ depende da presença de um CL, já que a ação da mesma é desencadear a regressão morfológica e funcional dessa estrutura. A maturidade do CL no momento da aplicação da $PGF_{2\alpha}$ influencia a resposta luteolítica. Assim, a $PGF_{2\alpha}$ não induz efetivamente a luteólise durante os primeiros 5 ou 6 dias após o estro (RATHBONE et al., 2001).

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 $PGF_{2\alpha}$ 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 3 ou 4 dias. Por outro lado, se a $PGF_{2\alpha}$ for aplicada quando o folículo dominante estiver no meio ou no final da sua fase estática, a ovulação irá ocorrer 5 a 7 dias mais tarde, após o crescimento do folículo dominante da próxima onda folicular (KASTELIC & GINTHER, 1991). As grandes variações no intervalo de tempo entre o tratamento e a ovulação, além do manejo da detecção de estro, reforçam a necessidade de protocolos destinados a controlar tanto o estado luteal quanto o crescimento folicular e ovulação. Assim, sincronizando o estro e a ovulação elimina-se a necessidade de detecção do cio e possibilita a inseminação artificial em tempo fixo.

2.3.2 Hormônio Liberador de Gonadotrofinas - GnRH

O GnRH é liberado de maneira pulsátil dos neurônios em direção a rede de vasos do sistema porta-hipotálamico-hipofisário. Por intermédio dessa rede, alcança os gonadotrofos na hipófise anterior. Nessas células, o GnRH liga-se à receptores específicos de membrana celular promovendo uma série de eventos, os quais incluem microagregação e interiorização do receptor de GnRH, ativação do sinal de transcrição de segundo mensageiro, nova síntese de LH e FSH e liberação de LH. A interiorização dos receptores para o GnRH após se ligar ao

GnRH, induz um transitório estado de insensibilidade nas células dos gonadotrofos ao GnRH. Em situações normais, novos receptores para o GnRH são reciclados retornando à superfície dos gonadotrofos, recuperando dessa forma, a sensibilidade ao estímulo subsequente do GnRH (D' OCCHIO et al., 2000).

É aceito que o GnRH atua no desenvolvimento folicular ovariano e na função do corpo lúteo de maneira indireta via a liberação induzida de LH e FSH da hipófise. A administração de GnRH eleva essas gonadotrofinas na circulação periférica dentro de 2 a 4h (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).

A combinação de GnRH e $\text{PGF}_{2\alpha}$ para inseminação artificial em tempo fixo tem sido usada com bons resultados tanto em vacas de leite como em vacas de corte (RATHBONE, 2001). Esse protocolo é conhecido como *Ovsynch* e, em vacas de leite, consiste na utilização de GnRH seguida por uma aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ 7 dias mais tarde e uma segunda aplicação de GnRH 48 horas após o tratamento com $\text{PGF}_{2\alpha}$. A inseminação artificial é realizada, então, 15 horas mais tarde, sem detecção de cio (PURSLEY et al., 1995; PURSLEY et al., 1997). Em vacas de corte, protocolo similar tem sido utilizado com um intervalo de 6 dias entre a primeira aplicação de GnRH e o tratamento com $\text{PGF}_{2\alpha}$ (MARTINEZ et al., 2001).

A explicação para a efetividade desse tratamento é que a primeira aplicação de GnRH promove a ovulação ou a luteinização do maior folículo presente e a emergência de uma nova onda folicular após 2 dias. A aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ irá causar a lise do CL formado em consequência da aplicação da primeira dose de GnRH. A segunda aplicação de GnRH é responsável por uma melhor sincronização da ovulação do folículo dominante presente na

onda folicular induzida pela primeira aplicação de GnRH (THATCHER et al., 1993; BÓ et al., 2002).

O protocolo *Ovsynch* tem mostrado melhores resultados em vacas do que em novilhas (PURSLEY et al., 1997; MARTINEZ et al., 2001). Em novilhas, Pursley et al. (1995) mostraram que a primeira aplicação de GnRH nem sempre resulta em ovulação ou luteinização do folículo dominante, tendo os autores obtido 85% de ovulações em vacas lactantes e apenas 54% em novilhas, após a primeira injeção de GnRH. A emergência de uma nova onda folicular será possível somente se o tratamento com GnRH causar ovulação ou luteinização de folículos da onda em crescimento; portanto, a ovulação provocada pela segunda aplicação de GnRH será insuficientemente sincronizada se a primeira aplicação não sincronizar a emergência de uma nova onda folicular (BÓ et al., 2002).

Além disso, algumas novilhas mostram sinais de estro antes da segunda aplicação do GnRH. A utilização de uma fonte exógena de P4 pode prevenir essas ovulações precoces, e tem mostrado aumento significativo nas taxas de prenhez de novilhas inseminadas em tempo fixo (MARTINEZ et al., 2000).

2.3.3 Progestágenos e progesterona

Os progestágenos são compostos utilizados desde a década de 60 com o objetivo de simular uma fase luteal por períodos que permitam a regressão espontânea do CL, o que leva a uma sincronização do estro dentro de aproximadamente 4 dias após a remoção do agente progestacional (RATHBONE et al., 2001). A liberação de LH pela hipófise é primariamente controlada pela progesterona (P4) e pelo estradiol (E2; KINDER et al., 1996). Assim, a ovariectomia de fêmeas bovinas adultas resulta em aumento na frequência dos pulsos de LH pela hipófise (SCHALLENBERGER & PETERSON, 1982), enquanto a administração de P4 nas fêmeas ovariectomizadas resulta na supressão da liberação de LH (BECK et al., 1976). No início da fase luteal (2 ou 3 dias após a ovulação, quando o CL ainda não está completamente formado), as concentrações de P4 são menores e os pulsos de LH ocorrem numa frequência maior do que no meio da fase luteal (PETERS et al., 1994; CUPP et al., 1995). O mesmo ocorre após a luteólise, quando há maior concentração e frequência dos pulsos de LH, em consequência de uma concentração mais baixa de P4 circulante (IMAKAWA et al., 1986). A P4 inibe o estro, a ovulação e altera a dinâmica folicular, atuando sobre o hipotálamo e regulando a liberação de GnRH (PETERS et al., 1994; MIHM & AUSTIN, 2002) e, conseqüentemente, do LH (KINDER et al., 1996). Assim, a administração de progestágenos

por um período suficiente para permitir a regressão natural do CL (ou seja, 14 dias ou mais) pode induzir o estro sincronizado (RATHBONE et al., 2001), uma vez que a supressão do tratamento progestacional leva à ocorrência do pico de LH e à ovulação (KESNER et al., 1982). O tratamento com progestágenos por tempo prolongado, de 14 a 21 dias, é efetivo para a sincronização do estro, no entanto, a fertilidade deste estro sincronizado é reduzida (ODDE, 1990). A maior sincronia obtida pelo tratamento com progestágeno por tempo prolongado ocorre porque o padrão de desenvolvimento de ondas foliculares não é mantido, e o folículo dominante de tamanho acima do normal persiste até que o tratamento seja interrompido (SIROIS & FORTUNE, 1990). Assim, a ovulação destes folículos persistentes pode ser a razão da baixa fertilidade decorrente da sincronização do estro com a utilização de progestágenos (ODDE, 1990; SAVIO et al., 1993). Para evitar esses problemas de persistência folicular, é necessário que o tratamento com progestágenos não seja muito prolongado, preferencialmente entre 7-9 dias (CAVALIERI et al., 2004). Além disso, é fundamental que uma onda folicular se inicie durante este período (BÓ et al., 1995). Com esta finalidade, a associação entre progestágenos e estradiol é o tratamento para indução e/ou sincronização de estro mais utilizado em bovinos de corte.

Um dos progestágenos sintéticos utilizados em bovinos é o acetato de medroxiprogesterona (MAP). Os pessários vaginais contendo MAP tornam-se uma alternativa interessante, atingindo bons resultados com custo inferior aos outros dispositivos com progestágenos disponíveis no mercado (MORAES & JAUME, 1997; BASTOS et al., 2004; LOGUÉRCIO et al., 2005; BRAGANÇA et al., 2007; SIQUEIRA et al., 2008). Uma das vantagens dos tratamentos baseados no emprego de progesterona e/ou progestágenos, além de permitir a sincronização de estro em fêmeas ciclando, é a possibilidade de induzir a retomada da ciclicidade em vacas em anestro. O tratamento de fêmeas amamentando, no período do pós-parto com progestágenos mantém o folículo dominante para que o mesmo alcance sua maturação final e ovule após a retirada do hormônio (YAVAS & WALTON, 2000a).

2.3.4 Prostaglandina, progestágenos e estrógenos

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 & GINTHER, 1991). A fase do desenvolvimento folicular pode ser avaliada por uma série de

exames ultra-sonográficos. Todavia, essas observações consomem muito tempo e são laboriosas. Assim, uma alternativa é a indução eletiva da emergência de uma onda folicular para garantir a presença de um folículo dominante em sua fase final de crescimento no momento da indução da luteólise ou da retirada do progestágeno (BÓ et al., 1995).

Vários trabalhos sugerem que a emergência de uma nova onda folicular está relacionada com a remoção do efeito supressivo do folículo dominante (THATCHER et al., 1993; BÓ et al., 1995; CACCIA & BÓ, 1998; SIQUEIRA et al., 2006). A remoção do folículo dominante por eletrocautério durante laparotomia acelerou a emergência da próxima onda folicular (ADAMS et al., 1993). Da mesma forma, a ablação guiada por ultra-som transvaginal de todos os folículos maiores que 5mm de diâmetro foi seguida por aumento nas concentrações plasmáticas de FSH e emergência de uma nova onda folicular dentro de 2 dias (BERGFELT et al., 1994). Entretanto, apesar da ablação folicular ser uma técnica relativamente fácil, esse procedimento não tem a simplicidade de um tratamento injetável (MAPLETOFT et al., 2000). A administração de estrógeno suprime a fase de crescimento do folículo dominante, tendo-se observado que esta supressão é mais intensa quando o tratamento é combinado com P4 (BÓ et al., 1995). O mecanismo responsável pela supressão do folículo dominante ainda não está bem esclarecido, mas parece ser mais um efeito sistêmico do que local, envolvendo a supressão do FSH e, possivelmente, do LH (BÓ et al., 1994; MIHM & AUSTIN, 2002). A aplicação de BE associado ao progestágeno induz efetivamente a emergência de uma nova onda folicular 4-5 dias após o tratamento (CACCIA & BÓ, 1998) independente do tamanho folicular no início do tratamento (SIQUEIRA et al., 2006). O uso do valerato de estradiol (BÓ et al., 1995; MAPLETOFT et al., 1999) ou do cipionato de estradiol (THUNDATHIL et al., 1998) provoca a regressão folicular, mas sua meia-vida longa resulta numa emergência da onda em um intervalo de tempo menos previsível do que a determinada por fármacos de ação mais curta, como o 17 β -estradiol (BÓ et al., 1995) e o BE (CACCIA & BÓ, 1998).

3 CAPÍTULO 1

TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

SISTEMA PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL SEM OBSERVAÇÃO DE ESTRO EM VACAS DE CORTE AMAMENTANDO

Luiz Felipe Kruel Borges, Rogério Ferreira, Lucas Carvalho Siqueira,

Rodrigo Camponogara Bohrer, Jacson William Borstmann,

João Francisco Coelho de Oliveira, Paulo Bayard Dias Gonçalves

Ciência Rural, 2008

1 **Sistema para inseminação artificial sem observação de estro em vacas de corte**
2 **amamentando**

3 **Artificial insemination system without estrus observation in suckled beef cows**

4
5 **Luiz Felipe Kruel Borges^I, Rogério Ferreira^I, Lucas Carvalho Siqueira^I,**
6 **Rodrigo Camponogara Bohrer^{II}, Jacson William Borstmann^{II},**
7 **João Francisco Coelho de Oliveira^{III}, Paulo Bayard Dias Gonçalves^{III*}**

8
9 **RESUMO**

10
11 O objetivo deste estudo foi desenvolver um protocolo de inseminação artificial com
12 tempo fixo (IATF) em vacas de corte amamentando, avaliando o intervalo entre a retirada do
13 progestágeno e a aplicação de GnRH sobre a dinâmica folicular e a prenhez. Para isto, 227
14 vacas 60-80 dias pós-parto receberam benzoato de estradiol (5mg) e um pessário vaginal de
15 acetato de medroxiprogesterona (250mg MAP; dia 0). No dia seis, cloprostenol sódico
16 (125µg), gonadotrofina coriônica eqüina (400UI) e desmame temporário (88h). O MAP foi
17 retirado no dia sete (Grupo BioRep) ou no dia oito (Grupo IATF) e, 48h ou 24h após os
18 animais receberam GnRH (100µg; dia 9), respectivamente. No experimento I, o
19 monitoramento das estruturas ovarianas de 14 vacas foi realizado a cada 24h, desde o dia seis
20 até 36h após a aplicação de GnRH em ambos os grupos. O tamanho médio do folículo
21 dominante no dia nove foi de 11,1±0,99mm (BioRep n=7) e 11,5±0,65mm (IATF n=7) e
22 todos os animais ovularam. No experimento II, no grupo BioRep (n=106), após a retirada do

^IPrograma de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS, Brasil.

^{II}Curso de Medicina Veterinária, UFSM, Santa Maria-RS, Brasil.

^{III}Departamento de Clínica de Grandes Animais, Hospital Veterinário, UFSM, 97105-900, Santa Maria-RS, Brasil. E-mail: bayard@biorep.ufsm.br. *Autor para correspondência.

1 MAP, as fêmeas foram inseminadas com detecção de estro durante 48 horas. O restante dos
2 animais do grupo BioRep e todos do grupo IATF (n=107) receberam 100µg de GnRH (dia 9)
3 e, após 16h, IATF. Os índices de prenhez foram de 57,6% (BioRep) e de 52,3% (IATF). O
4 intervalo de 24h entre a retirada do MAP, mantido por 8 dias, e a aplicação de GnRH não
5 interfere na dinâmica folicular e prenhez, viabilizando inseminar vacas de corte amamentando
6 sem observação de estro.

7

8 **Palavras-chave:** vacas de corte, pós-parto, IATF, GnRH, MAP, dinâmica folicular, ovulação.

9

10 **ABSTRACT**

11

12 The aim of this study was to develop a timed artificial insemination system (TAI) in
13 suckled beef cows. For this, in 227 cows 60-80 days postpartum, received estradiol benzoate
14 (5mg) and a vaginal device containing 250mg of medroxyprogesterone acetate (MAP; day 0).
15 On day six, prostaglandin analogous (125µg), eCG (400IU) was administered and calves were
16 removed for 88h. The device was removed on day seven (BioRep group) or on day eight (TAI
17 group) and the cows of both groups received GnRH (100µg; day 9) 48h or 24h after device
18 withdrawal, respectively. Experiment I: the follicular growth was daily monitored, from day 6
19 to day 9 (36h after GnRH), in 14 cows. The average of dominant follicle size on day nine was
20 11.1 ± 0.99 mm (BioRep, n=7) and 11.5 ± 0.65 mm (TAI, n=7) and all animals ovulated.
21 Experiment II: in the BioRep group (n=106), the cows was observed for estrus behavior after
22 withdrawal the device, twice a day during 48h and inseminated at 12h after detection; In the
23 TAI group (n=107), the devices were withdrawn on day eight and after 24h these cows and
24 those from the BioRep group, which were not stand in estrus, received 100µg of GnRH and
25 TAI 16h later. The pregnancy rates were 57.6% (BioRep) and 52.3% (TAI). The time of MAP

1 exposure and the period from MAP to GnRH did not affect the follicular dynamic and
2 pregnancy rates. Furthermore, the treatment for eight days allows an efficient TAI system in
3 suckled beef cows.

4

5 **Key words:** beef cows, postpartum, TAI, GnRH, MPA, follicular dynamic, ovulation.

6

7 **INTRODUÇÃO**

8

9 A sincronização e indução de estros são alternativas de manejo interessantes para uso
10 em sistemas de produção de vacas de corte amamentando, pois possibilitam que a maior parte
11 do rebanho retorne à ciclicidade e inicie uma nova gestação em um período reduzido de
12 tempo. Programas hormonais que eliminam a necessidade de detecção de estro, permitindo a
13 inseminação artificial em tempo fixo (IATF) são mais atrativos, porém apresentam taxas de
14 prenhez que oscilam entre 25 e 67% (FIKE et al., 1997; STEVENSON et al., 2000;
15 FERNANDES et al., 2001; GEARY et al., 2001; BARUSELLI et al., 2002; MARTINEZ et
16 al., 2002ab; BARUSELLI et al., 2004; KASIMANICKAM et al., 2006; SIQUEIRA et al.,
17 2008). Esta variação se deve, principalmente, ao percentual de animais ciclando no período
18 pós-parto precoce (60 dias), as condições ambientais e nutricionais em que estes animais se
19 encontram e a associação hormonal utilizada.

20 Nosso laboratório desenvolveu um protocolo para vacas pós-parto que associa um
21 curto período de inseminação com observação de estro (48h) e IATF. Esse protocolo utiliza o
22 tratamento com benzoato de estradiol (BE) e acetato de medroxiprogesterona (MAP) por sete
23 dias associado com desmame temporário por 88h, aplicação de gonadotrofina coriônica
24 eqüina (eCG) e cloprostenol sódico (análogo de prostaglandina F_{2alfa}) no sexto dia. Este
25 sistema, denominado BioRep, proporciona resultados médios de prenhez de 65% com uma

1 amplitude de 50 a 80%, baseado na utilização em aproximadamente 3.000 animais. Usando
2 esse protocolo, aproximadamente 50% das fêmeas foram detectadas em estro nas 48h após a
3 retirada do pessário vaginal (BASTOS et al., 2004; LOGUÉRCIO et al., 2005; SIQUEIRA et
4 al., 2008). Porém, apesar dos bons resultados, este sistema apresenta limitações, como o
5 desmame e, principalmente, a necessidade de detecção de estro, sendo esta apontada como o
6 fator limitante no sucesso da inseminação artificial em bovinos. Na tentativa de eliminar a
7 observação de estro, Siqueira et al. (2008) utilizaram BE 24h após a retirada do MAP,
8 mantido por 7 dias. No entanto, os resultados de prenhez foram de apenas 33% comparado
9 com 53% do sistema BioRep.

10 O controle do momento da ovulação é fundamental para a IATF. O hormônio
11 liberador de gonadotrofinas (GnRH) é um indutor da ovulação amplamente utilizado em
12 bovinos, e deve ser aplicado entre 36-48h após a retirada dos dispositivos com progestágeno e
13 realizar a IATF 12-18h após (TWAGIRAMUNGU et al., 1995; PURSLEY et al., 1995;
14 STEVENSON et al., 2000; MARTINEZ et al., 2002b; AMBROSE et al., 2005; COLAZO et
15 al., 2008). Tratamentos com progestágenos são efetivos no bloqueio da liberação de GnRH e
16 conseqüentemente na frequência de liberação de hormônio luteinizante (LH), inibindo a
17 manifestação estral e a ovulação (YAVAS & WALTON, 2000). Vários estudos demonstram
18 que o diâmetro do folículo dominante, a sincronização do estro e a ovulação não são
19 influenciadas pelo tempo de permanência do progestágeno, desde que este seja mantido por
20 um período de sete a nove dias (UTT et al., 2003; CAVALIERI et al., 2004; CAVALIERI et
21 al., 2007). Portanto, formulou-se a hipótese de que, prolongando o período do progestágeno,
22 de sete para oito dias, diminui-se o intervalo entre a retirada do pessário e a aplicação de
23 GnRH, assim a manifestação estral será minimizada e a sincronização da ovulação otimizada,
24 possibilitando a IATF no sistema BioRep. Desta forma, este trabalho tem por objetivo avaliar
25 se o intervalo entre a retirada do MAP e a aplicação do GnRH interfere no crescimento do

1 folículo dominante. E ainda, verificar se a redução do intervalo entre a retirada do MAP,
2 mantido por 8 dias, e a aplicação de GnRH permite IA sem detecção de estro.

3

4 **MATERIAL E MÉTODOS**

5

6 Animais e modelo experimental

7 Os experimentos foram conduzidos utilizando um total de 227 vacas de corte, sendo
8 destas, 162 Hereford (*Bos taurus taurus*) e 65 Hereford/Nelore (*Bos taurus taurus/Bos taurus*
9 *indicus*), multíparas, amamentando, entre 60 e 80 dias pós-parto e em condição corporal 3
10 (sendo 1-extremamente magra e 5-extremamente gorda), nos meses de janeiro e fevereiro de
11 2007, no município de Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brasil.

12 Os animais receberam 5mg de benzoato de estradiol (BE) intramuscular (IM) e um
13 pessário vaginal contendo 250mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP; dia 0). No sexto
14 dia, os animais receberam 125µg de cloprostenol sódico (PGF₂alfa, Sincrocio[®], Ourofino,
15 Brasil) na submucosa vulvar, 400UI de Gonadotrofina Coriônica Eqüina (eCG, Prógon[®],
16 Diprost, Uruguai) IM e os bezerros foram desmamados por 88 horas. Nesse momento, os
17 animais foram distribuídos uniformemente em dois grupos: nos animais do Grupo BioRep, o
18 pessário vaginal foi retirado no dia sete (24h após a eCG), já nos animais do Grupo IATF, os
19 pessários vaginais foram retirados no dia oito (48h após o tratamento com eCG). No dia nove
20 (72h após eCG), administrou-se em todos os animais 100µg de gonadorelina (GnRH,
21 Profertil[®], Tortuga, Brasil) IM (Figura 1).

22

23 Experimento I

1 Visando comparar o crescimento folicular nos grupos experimentais, após a aplicação
2 de eCG (dia 6), os ovários de 14 vacas Hereford (Grupo BioRep n=7; Grupo IATF n=7)
3 foram examinados por ultra-sonografia transretal (Pie-Medical Scanner 200[®], sonda linear de
4 7,5MHz) a cada 24h até o dia nove. Nesses exames, cada folículo acima de 5mm de diâmetro
5 foi mensurado e representado de forma esquemática em planilhas, possibilitando sua
6 identificação nas avaliações subseqüentes. Para determinar a ovulação, foram realizados dois
7 exames ultra-sonográficos, 24 e 36h após a aplicação de GnRH (dia 9). A ocorrência de
8 ovulação foi caracterizada pela não visualização do folículo dominante presente na avaliação
9 anterior.

10

11 Experimento II

12 Foram utilizadas 148 vacas Hereford e 65 vacas Hereford/Nelore distribuídas
13 uniformemente nos grupos experimentais. Nos animais do Grupo BioRep (n=106), o pessário
14 vaginal foi retirado no dia sete e as fêmeas foram observadas duas vezes por dia para detecção
15 de estro, durante 48h, e inseminadas 12h após sua manifestação. Nos animais do Grupo IATF
16 (n=107), o pessário vaginal foi retirado no dia oito e 24h após nos animais deste grupo e nos
17 animais que não manifestaram estro no grupo BioRep aplicou-se 100µg de GnRH (dia 9) IM
18 e após 16h foram inseminados em tempo fixo (IATF). O diagnóstico de gestação foi realizado
19 com o auxílio do ultra-som (Pie-Medical Scanner 200[®]) equipado com uma sonda linear
20 transretal de 5MHz 35 dias após a IA.

21

22 Análise estatística

23 No experimento I, o diâmetro folicular foi comparado utilizando um modelo de análise
24 para dados repetidos (PROC MIXED; SAS, 1996), sendo os efeitos principais grupo e dia,
25 assim como a interação grupo x dia. A diferença do diâmetro folicular entre os grupos em

1 determinado dia foi comparada pelo “estimate statement – PROC GLM”, também no SAS.
2 No experimento II, as taxas de prenhez foram analisadas pelo teste não-paramétrico (Qui-
3 Quadrado) utilizando o PROC CATMOD do SAS.

4

5 **RESULTADOS**

6

7 Experimento I

8 Este experimento foi delineado para determinar se a manutenção do progestágeno por
9 8 dias afeta o crescimento folicular e a ovulação em resposta ao GnRH em vacas de corte
10 entre 60 e 80 dias pós-parto, em um programa que utiliza eCG e desmame. A média dos
11 diâmetros foliculares, nos dias de avaliações (6,7,8 e 9), não diferiu entre o Grupo BioRep
12 ($6,4\pm 0,93\text{mm}$; $7,7\pm 0,81\text{mm}$; $9,7\pm 0,97\text{mm}$ e $11,1\pm 0,99\text{mm}$) e o Grupo IATF ($6,3\pm 0,83\text{mm}$;
13 $7,6\pm 0,88\text{mm}$; $9,5\pm 0,80\text{mm}$ e $11,5\pm 0,65\text{mm}$). Da mesma maneira, não houve interação grupo
14 x dia, mas foi observado um crescimento folicular diário ($P < 0,001$; Figura 2), porém similar
15 em ambos os grupos ($P > 0,05$) durante o período entre a aplicação de eCG e GnRH. Todos os
16 animais ovularam, sendo que dois animais do Grupo BioRep ovularam antes da aplicação de
17 GnRH, enquanto que cinco animais do Grupo BioRep e três animais do Grupo IATF
18 ovularam até 24h após o GnRH. O restante dos animais ovularam entre 24 e 36h após a
19 aplicação do GnRH.

20

21 Experimento II

22 Como o crescimento folicular foi similar entre os grupos BioRep e IATF no
23 experimento I, foi delineado este segundo experimento para avaliar o uso exclusivo da IATF,
24 com o intervalo de 24h entre a retirada do MAP (mantido por oito dias) e a aplicação de
25 GnRH. O Grupo BioRep obteve uma distribuição de estro durante as 12h, 24h, 36h e 48h da

1 retirada do pessário vaginal de 8,5%, 7,6%, 16% e 18,8% respectivamente, totalizando 50,9%
2 de manifestação estral e, destas, 72,2% conceberam. No grupo IATF, foi obtido nas 24h da
3 retirada do progestágeno 7,5% de manifestação estral, coincidindo com a aplicação do
4 GnRH, e foram inseminados em tempo fixo. Os índices de prenhez não diferiram entre o
5 Grupo BioRep (57,6%; 61/106) e o Grupo IATF (52,3%; 56/107; tabela 1) .

6

7 **DISCUSSÃO**

8

9 Os resultados do presente estudo confirmam a hipótese de que a ação do progestágeno
10 por um maior período, associado à redução do intervalo entre a retirada do pessário e a
11 aplicação do GnRH, minimiza a manifestação estral, proporcionando uma melhor sincronia
12 do momento da ovulação, possibilitando a IATF com resultados iguais de prenhez. A
13 associação de progestágeno e benzoato de estradiol no início do tratamento suprime o
14 crescimento dos folículos (BÓ et al., 1995), independentemente do tamanho folicular e
15 sincroniza a emergência de uma nova onda de crescimento folicular entre 4 a 5 dias
16 (SIQUEIRA et al., 2006). Neste estudo, as avaliações ultra-sonográficas foram realizadas
17 após o sexto dia de tratamento (eCG e desmame), identificando, desta maneira, o folículo
18 dominante e acompanhando o seu crescimento até a ovulação. Os resultados apresentados na
19 figura 2 evidenciam a emergência sincronizada de uma onda folicular com crescimento
20 folicular similar nos dois grupos. Isso demonstra que a alteração do protocolo, proposta neste
21 estudo, não altera a dinâmica folicular. Da mesma forma, os resultados do experimento 1
22 indicaram uma melhor sincronia da ovulação, pois todos os animais ovularam até 36 horas
23 após a aplicação GnRH. O protocolo foi validado no experimento 2, onde a utilização de
24 IATF proporcionou resultados finais de prenhez similares ao protocolo BioRep.

1 O sistema proposto, com eCG e desmame temporário, fornece condições de
2 crescimento folicular e seu uso têm se mostrado eficaz em rebanhos com baixa ciclicidade,
3 condição corporal comprometida e no período pós-parto precoce (BARUSELLI et al., 2003;
4 PEÑA et al., 2005a). A ação do progestágeno por um maior período mantém os níveis
5 plasmáticos subluteais de P4 e inibe o estro e a ovulação, atuando sobre o hipotálamo e
6 regulando a liberação do GnRH (PETERS et al., 1994; MIHM & AUSTIN, 2002) e,
7 conseqüentemente, do LH (KINDER et al., 1996). Para a realização da IATF é necessário
8 conhecer o momento esperado da ovulação. A utilização de indutores da ovulação após o
9 período de exposição aos progestágenos tem sido amplamente estudada (GEARY et al., 2001;
10 BARUSELLI et al., 2002; MARTINEZ et al., 2002a,b; BARUSELLI et al., 2004; BASTOS
11 et al., 2004; KASIMANICKAM et al., 2006; SIQUEIRA et al., 2008). Atualmente, o BE e os
12 agonistas do GnRH são os mais utilizados, propiciando resultados de prenhez variados. A
13 administração de GnRH induz um pico de LH que se inicia logo após sua aplicação (LUCY &
14 STEVENSON, 1986), induzindo a ovulação, que ocorre em folículos pré-ovulatórios com
15 concentrações adequadas de receptores para LH. Esses receptores são encontrados em
16 folículos com diâmetros superiores a 11mm (EVANS & FORTUNE, 1997) ou maiores que
17 10mm para animais *Bos taurus indicus* e 12mm para animais *Bos taurus taurus* (SARTORI et
18 al., 2001). Os resultados em vacas de corte em pós-parto são variados e, geralmente, atingem
19 baixos índices de concepção quando utilizados em programas de IATF (STEVENSON et al.,
20 2000; FERNANDES et al., 2001; BARUSELLI et al., 2002), devido ao tamanho inadequado
21 do folículo dominante no momento da administração do indutor da ovulação (BURKE et al.,
22 2001). Ambos os protocolos utilizados neste estudo proporcionaram folículos pré-ovulatórios
23 responsivos ao GnRH (Figura 2), ovulando até 36 horas após a sua aplicação.

24 A eCG possui ação de FSH e em menor proporção de LH, e tem efeito positivo
25 quando utilizado para estimular o crescimento de folículos no pós-parto, gerando folículos

1 pré-ovulatórios maiores (MURPHY & MARTINUK, 1991). Em estudo recente, Bó et al.,
2 (2006) observaram em vacas superestimuladas, com doses sucessivas de FSH, ovulações mais
3 sincrônicas utilizando GnRH 24h, comparado com 36h ou 48h, após a remoção do pessário
4 com progesterona, mantido por sete dias e meio ou oito dias. Porém, AMBROSE et al. (2005)
5 e COLAZO et al. (2008) indicam a aplicação do GnRH entre 36-48h após a retirada dos
6 dispositivos com progestágeno, obtendo melhores resultados de ovulação. Neste estudo, a
7 manifestação de estral resultou em 50,9%, no período de 48h entre a retirada do pessário e
8 aplicação de GnRH 48h, com eCG e desmame temporário, confirmando resultados de estudo
9 anteriores usando o protocolo BioRep (BASTOS et al., 2004; LOGUÉRCIO et al., 2005;
10 SIQUEIRA et al., 2008).

11 Vacas inseminadas após detecção de estro podem apresentar de 50 a 90% de taxa de
12 concepção. Esta variação está normalmente correlacionada com perdas embrionárias
13 precoces, que oscilam entre 20 a 30% até o trigésimo dia após inseminação (HUMBLOT et
14 al., 2001; SANTOS et al., 2004). Porém, outros fatores podem influenciar a concepção, como
15 a qualidade do sêmen utilizado, habilidade do inseminador, condição corporal e fertilidade
16 das vacas (YAVAS & WALTON, 2000). Os resultados de prenhez observados neste estudo
17 estão próximos da média (50%) encontrada na literatura para vacas no pós-parto após
18 protocolos de indução de estro (MACIEL et al., 2001; BARUSELLI et al., 2004; BASTOS et
19 al., 2004; LOGUÉRCIO et al., 2005; KASIMANICKAM et al., 2006; SIQUEIRA et al.,
20 2008), porém, com a vantagem da IA sem detecção de estro. Desta forma, o intervalo de 24h
21 entre a retirada do MAP, mantido por 8 dias, e a aplicação de GnRH, associado a eCG e
22 desmame temporário no sexto dia, dispensa a necessidade de detecção de estro e proporciona
23 um sistema de IATF eficiente para o uso em vacas de corte 60-80 dias pós-parto.

24

25 **AGRADECIMENTOS**

1
2 Os autores agradecem à propriedade rural Estância do Angico pela disponibilização
3 dos animais, a CAPES pela bolsa de estudo e ao CNPq e FAPERGS pelo suporte financeiro.

4 **REFERÊNCIAS**

6
7 AMBROSE, J.D. et al. Progesterone (CIDR)-based timed AI protocols using GnRH, porcine
8 LH or estradiol cypionate for dairy heifers: Ovarian and endocrine responses and pregnancy
9 rates. **Theriogenology**, v.53, p.1121–1134, 2005.

10 BARUSELLI, P.S. et al. Efeito de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo
11 fixo na eficiência reprodutiva de vacas de corte lactantes. **Revista Brasileira Reprodução**
12 **Animal**, v.26, p.218–221, 2002.

13 BARUSELLI, P.S. et al. Effect of eCG on pregnancy rates of lactating zebu beef cows treated
14 with CIDR-B devices for time artificial insemination. **Theriogenology**, v.59, p.214, 2003.

15 BARUSELLI, P.S. et al. The use of hormonal treatments to improve reproductive
16 performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**,
17 v.82, p.479–486, 2004.

18 BASTOS, G.M. et al. Hormonal induction of ovulation and artificial insemination in suckled
19 beef cows under nutritional stress. **Theriogenology**, v.62, p.847–853, 2004.

20 BÓ, G.A. et al. Exogenous control of follicular wave emergency in cattle. **Theriogenology**,
21 v.43, p.31–40, 1995.

22 BÓ, G.A. et al. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle.
23 **Theriogenology**, v.65, p.89–111, 2006.

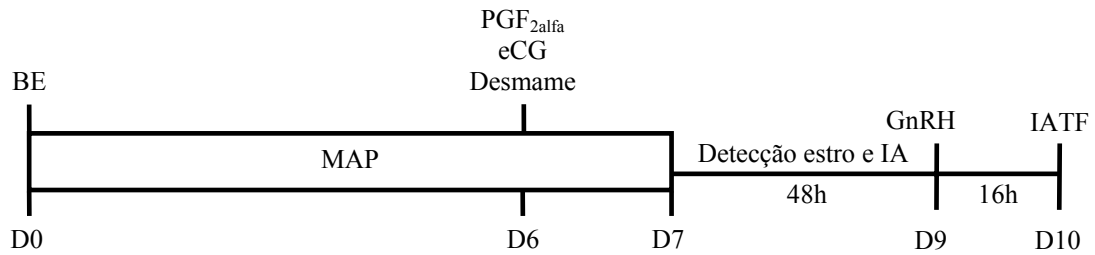
- 1 BURKE, C.R. et al. Effects of maturity of the potential ovulatory follicle on induction of
2 oestrus and ovulation in cattle with oestradiol benzoate. **Animal Reproduction Science**, v.66,
3 p.161–174, 2001.
- 4 CAVALIERI, J.; HEPWORTH, G.; MACMILLAN, K.L. Ovarian follicular development in
5 Holstein cows following synchronization of oestrus with oestradiol benzoate and an
6 intravaginal progesterone releasing insert for 5-9 days and duration of the oestrus cycle and
7 concentrations of progesterone following ovulation. **Animal Reproduction Science**, v.81,
8 p.177-193, 2004.
- 9 CAVALIERI, J. et al. Reproductive performance of lactating dairy cows and heifers
10 resynchronized for a second insemination with an intravaginal progesterone-releasing device
11 for 7 or 8 d with estradiol benzoate injected at the time of device insertion and 24 h after
12 removal. **Theriogenology**, v.67, p.824–834, 2007.
- 13 COLAZO, M.G. et al. Effects of plasma progesterone concentrations on LH release and
14 ovulation in beef cattle given GnRH. **Domestic Animal Endocrinology**, v.34, p.109-117,
15 2008.
- 16 EVANS, A.C.O.; FORTUNE, J.E. Selection of the dominant follicle occurs in the absence of
17 the differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors.
18 **Endocrinology**, v.138, p.2963–2971, 1997.
- 19 FERNANDES, P. et al. Timed artificial insemination in beef cattle using GnRH agonist
20 PGF2alpha and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v.55, p.1521–1532, 2001.
- 21 FIKE, K.E. et al. Estrus and luteal function in suckled beef cows that were anestrous when
22 treated with an intravaginal device containing progesterone with or without a subsequent
23 injection of estradiol benzoate. **Journal of Animal Science**, v.75, p.2009-2015, 1997.

- 1 GEARY, T.W. et al. Calf removal improves conception rates to the Ovsynch and Co-Synch
2 protocols. **Journal of Animal Science**, v.79, p.1-4, 2001.
- 3 HUMBLLOT, P. et al. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor
4 pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in
5 ruminants. **Theriogenology**, v.56, p.1417-1433, 2001.
- 6 KASIMANICKAM, R. et al. Effect of timing of prostaglandin administration, controlled
7 internal drug release removal and gonadotropin releasing hormone administration on
8 pregnancy rate in fixed-time AI protocols in crossbred Angus cows. **Theriogenology**, v.66,
9 p.166-172, 2006.
- 10 KINDER, J.E. et al. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and
11 development of persistent ovarian follicles in cattle. **Journal of Animal Science**, v.74,
12 p.1424-1440, 1996.
- 13 LOGUÉRCIO, R.S. **Regulação de receptores esteróides e dinâmica folicular em um**
14 **sistema de indução hormonal pós-parto em vacas de corte**. 2005. 80f. Tese (Doutorado em
15 Medicina Veterinária), Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade
16 Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.
- 17 LUCY, M.C.; STEVENSON, J.S. Gonadotropin-releasing hormone at estrus: luteinizing
18 hormone, estradiol, and progesterone during the periestrus and postinsemination periods in
19 dairy cattle. **Biology of Reproduction**, v.35, p.300-311, 1986.
- 20 MACIEL, M.N. et al. Programa hormonal associado ao desmame temporário na indução de
21 ovulação em vacas de corte durante o pós-parto. **Ciência Rural**, v.31, n.3, p.473-478, 2001.
- 22 MARTINEZ, M.F. et al. The use of progestins in regimens for fixed-time artificial
23 insemination in beef cattle. **Theriogenology**, v.57, p.1049-1059, 2002a.

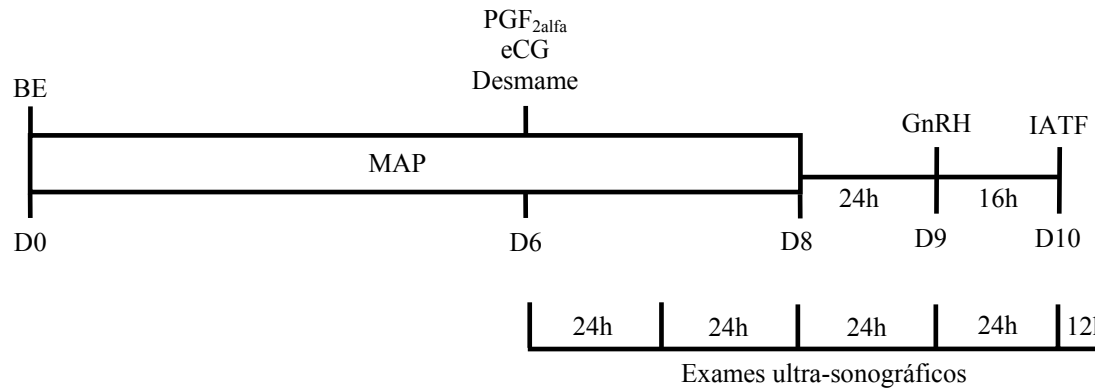
- 1 MARTINEZ, M.F. et al. The use of a progesterone-releasing device (CIDR) or melengestrol
2 acetate with GnRH, LH or estradiol benzoate for fixed-time AI in beef heifers. **Journal of**
3 **Animal Science**, v.80, p.1746–1751, 2002b.
- 4 MIHM, M.; AUSTIN, E.J. The final stages of dominant follicle selection in cattle.
5 **Domestical Animal Endocrinology**, v.23, p.155-166, 2002.
- 6 MURPHY, B.D.; MARTINUK, S.D. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrine Reviews**,
7 v.12, p.27-44, 1991.
- 8 PEÑA, D.M. et al. Efecto de la aplicación de eCG y destete temporario sobre los porcentajes
9 de preñez em vacas posparto tratadas com DIB y benzoato de estradiol In: VI SIMPOSIO
10 INTERNACIONAL DE REPRDUCIÓN ANIMAL, 2005, Cordoba, CO. **Anais...** Córdoba:
11 IRAC, 2005. V.6. 515p. p.408.
- 12 PETERS, K.E. et al. Luteinizing hormone has a role in development of fully functional
13 corpora lutea (CL) but is not required to maintain CL function in heifers. **Biology of**
14 **Reproduction**, v.51, n.6, p.1248-1254, 1994.
- 15 PURSLEY, J.R. et al. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂ α and GnRH.
16 **Theriogenology**, v.44, p.915-923, 1995.
- 17 SANTOS, J.E.P. et al. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus
18 synchronization programs. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.513–535, 2004.
- 19 SARTORI, R. et al. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine
20 follicles. **Biology of Reproduction**, v.65, p.1403–1409, 2001.
- 21 SAS. User's guide: statistics version 5. Cary: SAS Institute, 1996. CD-ROM. 10 arquivos,
22 305.437.692 bytes.

- 1 SIQUEIRA, L.C. et al. Progestágenos associados à estrógenos são capazes de induzir atresia
2 de folículos com baixa dependência de gonadotrofinas? Araxá, MG, 2006. In: XX REUNIÃO
3 ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2006,
4 Araxá, MG. **Anais...** Araxá: SBTE, 2006. V.34. 597p. p.361.
- 5 SIQUEIRA, L.C. et al. Sistemas de inseminação artificial em dois dias ou em tempo fixo para
6 vacas amamentando. **Ciência Rural**, v.38, n.2, p.411-415, 2008.
- 7 STEVENSON, J.S. et al. Synchronizing estrus and (or) ovulation in beef cows after
8 combination of GnRH, norgestomet, and prostaglandin F2 alpha with or with out timed
9 insemination. **Journal of Animal Science**, v.78, p.1747-1758, 2000.
- 10 TWAGIRAMUNGU, H. et al. Synchronization of ovarian follicular waves with a
11 gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: a review.
12 **Journal of Animal Science**, v.73, p.3141-3151, 1995.
- 13 UTT, M.D.; JOUSAN, F.D.; BEAL, W.E. The effect of varying the interval from follicular
14 wave emergence to progestin withdrawal on follicular dynamics and the synchrony of estrus
15 in beef cattle. **Journal Animal Science.**, v.81, p. 1562-1567, 2003.
- 16 YAVAS, Y.; WALTON, J.S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review.
17 **Theriogenology**, v.54, p.25-55, 2000.
- 18

A) Grupo BioRep

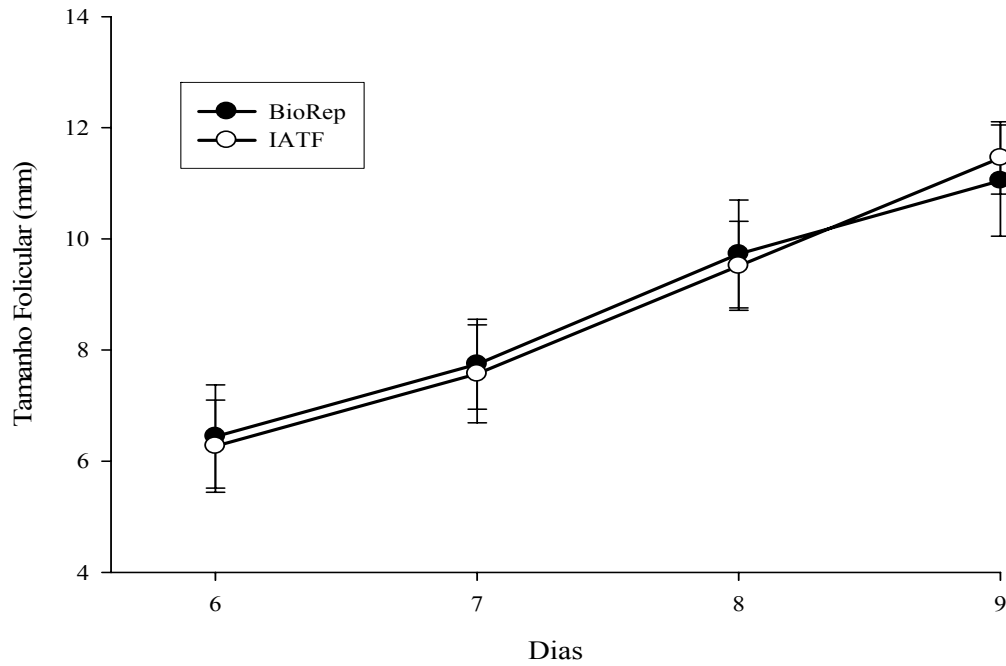


B) Grupo IATF



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

Figura 1- Delineamento experimental, sendo que o painel A corresponde ao grupo BioRep e o painel B ao grupo IATF. MAP: pessário vaginal contendo 250mg de acetato de medroxiprogesterona; BE: 5mg de benzoato de estradiol intramuscular; $PGF_{2\alpha}$: 125 μ g de análogo de prostaglandina na submucosa vulvar; eCG: 400UI de gonadotrofina coriônica equina intramuscular; Desmame: separação dos bezerros temporariamente por 88h; GnRH: 100 μ g de GnRH intramuscular; IATF: inseminação artificial em tempo fixo. No experimento I: os exames ultra-sonográficos em ambos os grupos foram desde o dia 6 até 36h após o GnRH. No experimento II: a IATF foi 16h após aplicação de GnRH.



- 1 Figura 2 - Tamanho do folículo dominante desde a aplicação do eCG (dia 6) até a aplicação
- 2 de GnRH (dia 9). A média dos diâmetros foliculares não diferiu entre os grupos.
- 3 Também, não houve interação grupo X dia. Porém, foi observado um crescimento
- 4 folicular durante os dias de avaliação ($P < 0,001$).

1 Tabela 1 – Índice de concepção e de prenhez em vacas 60-80 dias pós-parto, sincronizadas com
2 distintos tempos de exposição ao acetato de medroxiprogesterona (MAP).

Grupo	Vacas n	Estro n (%)	Concepção n (%)	Prenhez IATF n (%)	Prenhez final n (%)
Biorep	106	54 (50,9)	39 (72,2)	22 (42,3)	61 (57,6)
IATF	107	-	-	56 (52,3)	56 (52,3)

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, T.J. et al. Evidence for a Local Endothelin-Angiotensin-Atrial Natriuretic Peptide Systemin Bovine Mature Follicles In Vitro: Effects on Steroid Hormones and Prostaglandin Secretion. **Biology of Reproduction**, v.61, n.6, p.1419-1425, 1999.

ADAMS, G.P. et al. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.94, p.177–188, 1992.

ADAMS, G.P. et al. Effect of the dominant on regression of its subordinates in heifers. **Journal of Animal Science**, v.73, p.267-275, 1993.

AMSTALDEN, M. et al. Central infusion of recombinant ovine leptin normalizes plasma insulin and stimulates a novel hypersecretion of luteinizing hormone after short-term fasting in mature beef cows. **Biology of Reproduction**, v.66, p.1555–1561, 2002.

AMSTALDEN, M. et al. 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.

AMSTALDEN, M. et al. Effects of leptin on gonadotropin releasing hormone release from hypothalamic-infundibular explants and gonadotropin release from adenohypophyseal primary cell cultures: further evidence that normally-nourished cattle are resistant to leptin. **Animal Reproduction Science**, v.85, p.41–52, 2005.

BARUSELLI, P.S. et al. Efeito de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo na eficiência reprodutiva de vacas de corte lactantes. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.26, p.218–221, 2002.

BARUSELLI, P.S. et al. Effect of eCG on pregnancy rates of lactating zebu beef cows treated with CIDR-B devices for time artificial insemination. **Theriogenology**, v.59, p.214, 2003.

BARUSELLI, P.S. et al. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v.82, p.479–486, 2004.

BASTOS, G.M. et al. Hormonal induction of ovulation and artificial insemination in suckled beef cows under nutritional stress. **Theriogenology**, v.62, p.847-853, 2004.

BECK, T.W. et al. bovine serum LH, GH and prolactin following chronic implantation of ovarian steroids and subsequent ovariectomy. **Journal of Animal Science**, v.42, n.2, p.461-468, 1976.

BEG, M.A. et al. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. **Biology of Reproduction**, v.66, p.120–126, 2002.

BERGFELT, D.R. et al. Ovarian dynamics following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in cyclic heifers. **Theriogenology**, v.41, p.161-169, 1994.

BERGFELD, E.G.M. et al. Frequency of luteinizing hormone pulses and circulating 17β -oestradiol concentration in cows is related to concentration of progesterone in circulation when the progesterone comes from either an endogenous or exogenous source. **Animal Reproduction Science**, v.37, n.3, p.257-265, 1995.

BERISHA, B. et al. Expression and localization of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. **Endocrinology**, v.167, p.371-382, 2000.

BERISHA, B.; SINOWATZ, F.; SCHAMS, D. Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. **Mol. Reprod. Dev.** v.67, p.162-171. 2004.

BÓ, G.A. et al. Exogenous control of follicular wave emergency in cattle. **Theriogenology**, v.43, p.31–40, 1995.

BÓ, G.A. et al. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v.57, n.1, p.53-72, 2002.

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

BRAGANÇA, J.F.M. **Estratégias hormonais de indução/sincronização de estro em novilhas de corte entre 12 e 14 meses de idade**. 2007. 124f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

BURATINI Jr., J. et al. Fibroblast growth factor 10 (FGF-10) gene expression in bovine antral follicles. **Biology of Reproduction**, v.69, p.269, 2004.

BURATINI Jr., J. et al. Expression of fibroblast growth factor-8 and its cognate receptors, fibroblast growth factor receptor (FGFR) -3c and -4c, in fetal bovine preantral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v.70, p.255-261, 2005.

CACCIA, M.; BÓ, G.A. Follicle wave emergence following treatment of CIDR-implanted beef cows with estradiol benzoate and progesterone. **Theriogenology**, v.49, p 34, 1998.

CAVALIERI, J.; HEPWORTH, G.; MACMILLAN, K.L. Ovarian follicular development in Holstein cows following synchronization of oestrus with oestradiol benzoate and an intravaginal progesterone releasing insert for 5-9 days and duration of the oestrus cycle and concentrations of progesterone following ovulation. **Animal Reproduction Science**, v.81, p.177-193, 2004.

CICCIOLI, N.H. et al. Influence of body condition at calving and postpartum nutrition on endocrine function and reproductive performance of primiparous beef cows. **Journal of Animal Science**, v.81, p.3107-3120, 2003.

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. et al. Fertility in beef cattle given a new or previously used CIDR insert and estradiol, with or without progesterone. **Animal Reproduction Science**, v.81, p.25-34, 2004.

CUPP, A.S. et al. Secretion of gonadotrophins change during the luteal phase of the bovine oestrous cycle in the absence of corresponding changes in progesterone or 17 β -estradiol. **Animal Reproduction Science**, v.37, p.109-119, 1995.

D'OCCHIO, M.J. et al. Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.433-442, 2000.

DUFFY, P. et al. The effect of eCG or estradiol at or after norgestomet removal on follicular dynamics, estrus and ovulation in early post-partum beef cows nursing calves. **Theriogenology**, v.61, p.725-734, 2004.

ERICKSON, G.P.; SHIMASAKI, S. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, p.1-9, 2003.

FERNANDES, P. et al. Timed artificial insemination in beef cattle using GnRH agonist PGF2alpha and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v.55, p.1521-1532, 2001.

FERREIRA, R. et al. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. **Reproduction**, v.134, n.5, p.713-719, 2007.

FIKE, K.E. et al. Estrus and luteal function in suckled beef cows that were anestrous when treated with an intravaginal device containing progesterone with or without a subsequent injection of estradiol benzoate. **Journal of Animal Science**, v.75, p.2009-2015, 1997.

FORTUNE, J.E. Follicular dynamics the bovine estrous cycle: a limiting factor in improvement of fertility. **Animal Reproduction Science**, v.33, n.1-4, p.111-125, 1993.

FORTUNE, J.E. et al. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v.65, p. 648-654, 2001.

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

GALINA, C.S.; ORIHUELA, A.; BUNIO, I. Behavioural trends affecting oestrus detection in Zebu cattle. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.465-470, 1996.

GARCIA, M.R. et al. Leptin attenuates the acute effects of centrally administered neuropeptide Y on somatotropin but not gonadotropin secretion in ovariectomized cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v.26, p.189-200, 2004.

GARVERICK, H.A. et al. Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. **Animal Reproduction Science**, v.28, n.1, p.111-124, 1996.

GEARY, T.W. et al. Calf removal improves conception rates to the Ovsynch and Co-Synch protocols. **Journal of Animal Science**, v.79, p.1-4, 2001.

GINTHER, O.J.; KASTELIC, J.P.; KNOPF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. **Journal of Animal Science**, v.20, n.3, p.187-200, 1989a.

GINTHER, O.J.; KASTELIC, J.P.; KNOPF, L. Intraovarian relationships among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers. **Theriogenology**, v.32, n.5, p.787-795, 1989b.

GINTHER, O.J. et al. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v.48, p.75-87, 1997.

GINTHER, O.J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle stimulating hormone and the follicles. **Biology of Reproduction**, v.62, p. 920–927, 2000.

GINTHER, O.J. et al. Follicle Selection in Cattle: Role of Luteinizing Hormone. **Biology of Reproduction**, v.64, n.1, p.197-205, 2001
GINTHER, O.J. et al. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. **Reproduction**, v.124, p.475–482, 2002a.

GINTHER, O.J. et al. Activin A, estradiol, and free insulin-like growth factor I in follicular fluid preceding the experimental assumption of follicle dominance in cattle. **Biology of Reproduction**, v.67, p.14–19, 2002b.

GIOMETTI, I.C. et al. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. **Theriogenology**, v.63, n.4, p.1014-1025, 2005.

HAUGHIAN, J.M. et al. Relationships between FSH patterns and follicular dynamics and the temporal associations among hormones in natural and GnRH-induced gonadotropin surges in heifers. **Reproduction**, v.127, p. 23–33, 2004.

HENDRIKSEN, P.J.M. et al. Follicular dynamics around the recruitment of the first follicular wave in the cow. **Biology of Reproduction**, v.69, p.2036–2044, 2003.

IMAKAWA, K.M. et al. Regulation of pulsatile LH secretion by ovarian steroids in the heifer. **Journal of Animal Science**, v.63, n.1, p.162-168, 1986.

KASIMANICKAM, R. et al. Effect of timing of prostaglandin administration, controlled internal drug release removal and gonadotropin releasing hormone administration on pregnancy rate in fixed-time AI protocols in crossbred Angus cows. **Theriogenology**, v.66, p.166-172, 2006.

KASTELIC, J.P.; KNOFF, L.; GINTHER, O.J. Effect of day of prostaglandin F_{2alpha} treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. **Animal Reproduction Science**, v.23, p.169-180, 1990.

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.

KESNER, J.S.; PADMANABHAN, V.; CONVEY, E.M. Estradiol induces and progesterone inhibits the preovulatory surges of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in heifers. **Biology of Reproduction**, v.26, p.571-578, 1982.

KINDER, J.E. et al. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. **Journal of Animal Science**, v.74, p.1424-1440, 1996.

LAMMOGLIA, M.A. et al. Induced and synchronized estrus in cattle: dose titration of estradiol benzoate in peripubertal heifers and postpartum cows after treatment with an intravaginal progesterone releasing insert and prostaglandin F2 α . **Journal of Animal Science**, v.76, p.1662-1670, 1998.

LOGUÉRCIO, R.S. **Regulação de receptores esteróides e dinâmica folicular em um sistema de indução hormonal pós-parto em vacas de corte**. 2005. 80f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005

LUCY, M.C. et al. Efficacy of an intravaginal progesterone insert and an injection of PGF2 α for synchronizing estrus and shortening the interval to pregnancy in postpartum beef cows, peripubertal beef heifers, and dairy heifers. **Journal of Animal Science**, v.79, p.982-995, 2001.

MACIEL, M.N. et al. Programa hormonal associado ao desmame temporário, na indução de ovulação em vacas de corte durante o pós-parto. **Ciência Rural**, v.31, n.3, p.473-478, 2001.

MACIEL, M.N. et al. Leptin prevents fasting-mediated reductions in pulsatile secretion of luteinizing hormone and enhances its gonadotropin-releasing hormone-mediated release in heifers. **Biology of Reproduction**, v.70, p.229-235, 2004a.

MACIEL, M.N. et al. Chronic administration of recombinant ovine leptin in growing beef heifers: effects on secretion of LH, metabolic hormones, and timing of puberty. **Journal of Animal Science**, v.82, 2930-2936, 2004b.

MACMILLAN, K.L.; BRUKE, C.R. Effects of oestrous cycle control of reproductive efficiency. **Animal Reproduction Science**, v.42, n.1-2, p.307-320, 1996.

MACRACKEN, J.A. Prostaglandins and luteal regression – a review **Prostaglandins**, v.1, p.1-4, 1972.

MANN, G.E.; LAMMING, G.E. The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the etiology of premature luteolysis during the short oestrus cycle in cow. **Anim. Reprod. Sci.**, v.64, p.171-180, 2000.

MAPLETOFT, R.J. et al. 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.

MAPLETOFT, R.J. et al. Estrogen esters to synchronize follicular wave emergence and ovulation in CIDR-treated cattle. **Proceedings of the Annual Convention of the American Embryo Transfer Association**, p.27-38, 2002.

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

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. et al. The use of progestin in regimens for fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Theriogenology**, v.57, n.3 p.1049-1059, 2001.

MARTINEZ, M.F. et al. The use of progestins in regimens for fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Theriogenology**, v.57, p.1049–1059, 2002a.

MARTINEZ, M.F. et al. The use of a progesterone-releasing device (CIDR) or melengestrol acetate with GnRH, LH or estradiol benzoate for fixed-time AI in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v.80, p.1746–1751, 2002b.

MARTINEZ, M.F. et al. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v.86, p.37-52, 2005.

MIHM, M.; AUSTIN, E.J. The final stages of dominant follicle selection in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.155-166, 2002.

MIZUTA, K. **Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, progesterona e estradiol que precedem a ovulação em fêmeas bovinas Nelore (*Bos taurus indicus*), Angus (*Bos taurus taurus*) e Nelore x Angus (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*)**. 2003. 98 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MORAES, J.F.C.; JAUME, C.M. Sincrobovi: um pessário para sincronização de cios em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.1, n.1, p.99-101, 1997.

MURPHY, B.D.; MARTINUK, S.D. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrine Reviews**, v.12, p.27-44, 1991.

NILSSON, E.; PARROTT, J.A.; SKINNER, M.K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Molecular Cell Endocrinology**, v.175, p.123-130, 2001.

ODDE, K.G. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. **Journal Animal Science**, v.68, p.817, 1990.

O'ROURKE, M.O. et al. The effect of dose and route of oestradiol benzoate administration on plasma concentrations of oestradiol and FSH in long-term ovariectomized heifers. **Animal Reproduction Science**, v.59, p.1-12, 2000.

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

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

PEÑA, D.M. et al. Efecto de la aplicación de eCG y destete temporario sobre los porcentajes de preñez em vacas posparto tratadas com DIB y benzoato de estradiol In: VI SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRDUCIÓN ANIMAL, 2005, Cordoba, CO. **Anais...** Córdoba: IRAC, 2005. V.6. 515p. p.408a.

PEÑA, D.M. et al. Efecto de la aplicación de 400UI de eCG y enlatado sobre los porcentajes de preñez em vacas posparto tratadas com DIB y benzoato de estradiol In: VI SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRDUCIÓN ANIMAL, 2005, Cordoba, CO. **Anais...** Córdoba: IRAC, 2005. V.6. 515p. p.406b.

PETERS, K.E. et al. Luteinizing hormone has a role in development of fully functional corpora lutea (CL) but is not required to maintain CL function in heifers. **Biology of Reproduction**, v.51, n.6, p.1248-1254, 1994.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Follicular populations during the estrous cycle in heifers: III. Time of selection of the ovulatory follicle. **Animal Reproduction Science**. v.16, n.2, p.81-95, 1988.

PINHEIRO, O.L. et al. Estrus behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced prostaglandin F₂alpha or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v.49, p.667-81, 1998.

PORTELA, V.V. et al. A novel role for angiotensin II in the regulation of protease-nexin-1 expression and secretion in bovine follicles 2006; **In: 39th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction**. Abstract 452.

PURSLEY, J.R. et al. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂α and GnRH. **Theriogenology**, v.44, p.915-923, 1995.

PURSLEY, J.R. et al. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at synchronized ovulation or synchronized estrus. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.295-300, 1997.

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

RAJAMAHENDRAN, R.; MANIKKAN, M. Effects of exogenous steroid hormones on the dominant follicle maintained by a norgestomet implant in heifers. **Journal Animal Science**, v.74, n.4, p.457-464, 1994.

RATHBONE, M.J. et al. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrus cycle in cattle. **Advance Drug Delivery Reviews**, v.50, p.277-320, 2001.

RHODES, F.M.; PETERSON, A.J.; JOLLY, P.D. Gonadotrophin responsiveness, aromatase activity and insulin-like growth factor binding protein content of bovine ovarian follicles during the first follicular wave. **Reproduction**, v.122, p.561-569, 2001.

RIVERA, G.M. et al. A potential role for insulin-like factor binding protein-4 proteolysis in the establishment of ovarian follicular dominance in cattle. **Biology of Reproduction**, v.65, p.102-111, 2001.

SAVIO, J.D. et al. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.83, n.2, p.111-119. 1988.

SAVIO, J.D. et al. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.98, p.77-84. 1993.

SCHALLENBERGER, E.; PETERSON, A.J. Effect of ovariectomy on tonic gonadotropin secretion in cycle and post-partum dairy cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.64, n.1, p.47-52, 1982.

SCHAUSER, K.H. et al. Localization of the Renin-Angiotensin System in the Bovine Ovary: Cyclic Variation of the Angiotensin II Receptor Expression. **Biology of Reproduction**, v.65, n.6, p.1672-1680, 2001.

SHORT, R.E. et al. Effect suckling and mastectomy on bovine postpartum reproduction. **Journal Animal Science**, v.34, p.70, 1972.

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

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

SIQUEIRA, L.C. et al. Progestágenos associados à estrógenos são capazes de induzir atresia de folículos com baixa dependência de gonadotrofinas? Araxá, MG, 2006. In: XX REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2006, Araxá, MG. **Anais...** Araxá: SBTE, 2006. V.34. 597p. p.361.

SIQUEIRA, L.C. et al. Sistemas de inseminação artificial em dois dias ou em tempo fixo para vacas amamentando. **Ciência Rural**, v.38, n.2, p.411-415, 2008.

SPICER, L.J.; STEWART, R.E. Interactions among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin, and insulin-like growth Factor-I (IGF-I) on cell numbers and

steroidogenesis of bovine thecal cells: role of IGF-I receptors. **Biology of Reproduction**, v.54, p.255-263, 1996.

STAGG, K. et al. Follicular development in long-term anestrous suckled beef cows fed two levels of energy postpartum. **Animal Reproduction Science**, v.38, p.49-61, 1995.

STAGG, K. et al. Effect of calf isolation on follicular wave dynamics, gonadotropin and metabolic hormone changes, and interval to first ovulation in beef cows fed either of two energy levels postpartum. **Biology of Reproduction**, v.59, p.777-783, 1998.

STEFANELLO, J.R. et al. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. **Theriogenology**, v.66, p.2068-2076, 2006.

STEVENSON, J.S. et al. Synchronizing estrus and (or) ovulation in beef cows after combination of GnRH, norgestomet, and prostaglandin F2 alpha with or without timed insemination. **Journal of Animal Science**, v.78, p.1747-1758, 2000.

SUGIURA, K. et al. Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. **Development**, v.134, p.2593-2603, 2007.

SUNDERLAND, S.J. et al., Selection, dominance and atresia of follicles during the estrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, n.3, p.547-555, 1994.

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

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

THUNDATHIL, J.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R.J. Effect of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular development and ovulation in dairy cattle. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.62, n.4, p.314-316, 1998.

TWAGIRAMUNGU, H. et al. 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.

VERNON, R.K.; SPICER, L.J. Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced steroidogenesis by bovine granulosa cells. **Journal of Animal Science**, v.72, p.2696-2702, 1994.

WANDJI, S.A. et al. Ontogeny and cellular localization of ^{125}I -labeled insulin-like growth factor-I, ^{125}I -labeled follicle-stimulating hormone, and ^{125}I -labeled human chorionic gonadotropin binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. **Biology of Reproduction**, v.47, p.814-822, 1992.

WILLIAMS, G.L. et al. Mechanism regulating suckling-mediated anovulation in the cow. **Anim. Reprod. Sci.**, v.42, p.289-297, 1996.

WILTBank, M.C. et al. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v.57, p.21-52, 2002.

YAVAS, Y.; WALTON, J.S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. **Theriogenology**, v.54, p.25-55, 2000a.

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

YOSHIMURA, Y. et al. Gonadotropin stimulates ovarian renin-angiotensin system in the rabbit. **Journal of Clinical Investigation**, v.93, p.180-187, 1994.

YOSHIMURA, Y. et al. Angiotensin II induces ovulation and oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT2 receptor subtype. **Endocrinology**, v.137, n.4, p.1204-1211, 1996.

ZIEBA, D.A. et al. Regulatory roles of leptin at the hypothalamic–hypophyseal axis before and after sexual maturation in cattle. **Biology of Reproduction**, v.71, p.804–812, 2004.

ZIEBA, D.A.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, G. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: A comparative review. **Domestic Animal Endocrinology**, v.29, p.166-185, 2005.

ZOLLERS, W.G. et al. Concentrations of progesterone and oxytocin receptors in endometrium of postpartum cows expected to have a short or normal oestrus cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.97, p.329-337, 1993.