

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

**ESTERÓIDES NO CONTROLE DA REGRESSÃO DE
FOLÍCULOS DE DIFERENTES DIÂMETROS PARA
USO EM SISTEMAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL
EM TEMPO FIXO DE VACAS DE CORTE NO PÓS-
PARTO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Lucas Carvalho Siqueira

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**ESTERÓIDES NO CONTROLE DA REGRESSÃO DE
FOLÍCULOS DE DIFERENTES DIÂMETROS PARA USO EM
SISTEMAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO
FIXO DE VACAS DE CORTE NO PÓS-PARTO**

por

Lucas Carvalho Siqueira

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.

2007

**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

**ESTERÓIDES NO CONTROLE DA REGRESSÃO DE FOLÍCULOS DE
DIFERENTES DIÂMETROS PARA USO EM SISTEMAS DE
INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO DE VACAS DE
CORTE NO PÓS-PARTO**

elaborada por
Lucas Carvalho Siqueira

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

Comissão Examinadora:

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

Marcelo Bertolini, PhD. (UDESC)

Marlon Nadal Maciel, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 13 fevereiro de 2007

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Aos meus orientadores, Paulo Bayard Dias Gonçalves e João Francisco Coelho de Oliveira;

Aos demais amigos e colegas do BioRep;

À minha família;

Ao CNPq pelo suporte financeiro;

Enfim, a todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria

ESTERÓIDES NO CONTROLE DA REGRESSÃO DE FOLÍCULOS DE DIFERENTES DIÂMETROS PARA USO EM SISTEMAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO DE VACAS DE CORTE NO PÓS-PARTO

AUTOR: LUCAS CARVALHO SIQUEIRA

ORIENTADOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES

Data e Local da Defesa: Santa Maria 13 de fevereiro de 2007.

A associação de progestágenos ao benzoato de estradiol (BE) tornou-se o tratamento mais utilizado para indução de estro em vacas de corte. No entanto, os programas que utilizam esta associação hormonal ainda precisam ser aperfeiçoados, buscando aumentar as taxas de prenhez e facilitar o manejo. Dois experimentos foram delineados com este intuito: o primeiro determinou se a capacidade da associação progestágeno-estradiol em induzir a regressão folicular é dependente da fase de crescimento folicular no momento do tratamento. Para isso, avaliou-se a dinâmica folicular de 36 vacas amamentando, que receberam 3 tratamentos com progestágenos associados ao BE antes (foliculos de 5-7mm), durante (8-10mm) ou depois (>10mm) do momento esperado da divergência folicular. Foi observado que todas as fêmeas tratadas apresentaram regressão dos maiores foliculos, concluindo-se que independentemente do tamanho folicular, vacas com foliculos em crescimento apresentam respostas semelhantes quando tratadas com progestágenos associados ao BE. O segundo experimento objetivou comparar dois protocolos de indução de estro para vacas no período pós-parto, utilizando hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e inseminação artificial (IA) em dois dias ou BE e inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Para isso, foram utilizadas 250 vacas, amamentado, que receberam um pessário vaginal, contendo 250mg de acetato de medroxi-progesterona (MAP) e uma injeção intramuscular (IM) de 5mg de BE no dia 0 (início do tratamento). O pessário vaginal permaneceu por sete dias. No dia 6, foram aplicadas 400UI de gonadotrofina coriônica equina por via IM e 5mg de Dinoprost na submucosa vulvar, realizando nesse momento o início do desmame por 96 h. Após a retirada dos pessários (dia 7), as vacas foram distribuídas em dois grupos. No grupo BioRep (n=150), as fêmeas foram observadas duas vezes por dia para detecção de estro por 48h e IA 12h após sua manifestação. Os animais que não foram detectados em estro nesse período receberam uma injeção IM de 100µg de GnRH, sendo IATF, nas 16 às 18h seguintes. No grupo BE (n=100), as vacas receberam uma injeção de 1mg de BE IM no dia 8 (24h após a retirada do MAP) e foram IATF no dia 9 (54h após a retirada do MAP). O diagnóstico de gestação foi realizado por exame ultra-sonográfico 40 dias após IA. A percentagem de prenhez no grupo BioRep (54,7%) foi maior ($p<0,01$) do que no grupo BE (33,3%). Sendo assim, a fim de obter melhores taxas de prenhez, os protocolos de indução de estro de eleição para o período pós-parto poderão empregar observação de estro por dois dias e utilização de IATF com GnRH ao contrário de BE associado exclusivamente a IATF.

Palavras-chave: pós-parto; dinâmica folicular; IATF; GnRH; benzoato de estradiol.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria

STEROIDS CONTROLLING THE REGRESSION OF FOLLICLES WITH DIFFERENT DIAMETERS FOR USE IN FIXED TIME ARTIFICIAL INSEMINATION SYSTEMS OF POST PARTUM BEEF COWS

AUTOR: LUCAS CARVALHO SIQUEIRA

ORIENTADOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES

Data e Local da Defesa: Santa Maria 13 de fevereiro de 2007.

Progestin associated to estradiol benzoate (EB) became the most used treatment for estrous induction in beef cow. However, those programs that use this association still can be enhanced to produce better pregnancy rates and easily the management. Two experiments were designed with this aim. In the first, it was investigated if progestin-estradiol association is able to induce follicular regression in different stages of ovarian follicular waves in cattle. For this, the follicular dynamics of 36 suckling cows, whose received 3 progestin treatments associated to EB before (follicles between 5-7mm), during (8-10mm) or after (>10mm) expected follicular deviation moment. Since, all cows presented regression of the largest follicles, it was concluded that independent of follicular size, cows bearing emerged growing follicles presented similar responses on follicular wave dynamics when treated with EB and different progestin protocols. The second experiment was design to compare two estrus induction protocols for cows in postpartum period, using GnRH and two-day artificial insemination (AI) or EB and fixed-time artificial insemination (TAI). A total of 250 suckled beef cows received a vaginal device containing 250mg of medroxyprogesterone acetate (MPA) and an injection of 5mg of EB intramuscularly (IM) on day 0. The vaginal device was removed on day 7. On day 6, the cows were injected with 400IU eCG (IM) and 5mg Dinoprost (into vulvar submucosa) and calves were removed for 96h. After removing the vaginal devices (day 7), the cows were divided in two groups. In BioRep group (n=150), estrus detection was carried out twice a day during 48h and the animals were inseminated 12h after detection. Cows not detected in estrus received 100µg of GnRH and were inseminated after 16 to 18h. In EB group, cows received im 1mg of EB on day 8 (24h after removing MPA) and were inseminated on day 9 without estrus detection (54h after removing MPA). The diagnosis of pregnancy was performed 40 days after AI with ultrasound. The data were analyzed by Chi-square test. The pregnancy rate was higher ($p<0.01$) in BioRep group (54.7%) than EB group (33.3%). To obtain high pregnancy rate, the estrus induction protocols for postpartum beef cows should use two-day AI and GnRH to induce ovulation instead of EB with TAI.

Key words: postpartum; follicular dynamic; artificial insemination; GnRH; estradiol benzoate;

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Follicular dynamics of cows treated at 5-7mm, 8-10mm or >10mm expected moment receiving estradiol benzoate associated to progestin treatments. The follicular dynamics were not different among the three treatments when the initial follicular size effect was removed from the statistical analysis.....41

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1 - After treatment, maximum diameter (mm±s.e.m) of larger follicle and timing (days±s.e.m) to reach maximum follicular size, to begin follicular regression, new wave emergence and days at plateau of cows with low (<1ng ml-1) or high (>1ng ml-1) endogenous P4, at pre-deviation (5-7mm), deviation (8-10mm) or post-deviation (>10mm) expected moment, receiving estradiol benzoate associated to one of the following progestin treatments, P4 vaginal device, MPA vaginal device or MPA vaginal device plus P4 IM injection.....40

CAPÍTULO 2

TABELA 1 - Percentagens de estro, concepção e prenhez em vacas de corte no pós-parto, submetidas somente a IATF, utilizando como indutor da ovulação o benzoato de estradiol (grupo BE) ou a 48h de observação de estro e inseminação convencional associada à IATF com GnRH (grupo BioRep).....56

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
RESUMO	4
ABSTRACT	5
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS	7
SUMÁRIO.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1. Pós-parto.....	11
2.2. Dinâmica folicular.....	16
2.3. Indução/sincronização de estros em Bovinos.....	21
3. CAPÍTULO 1	27
4. CAPÍTULO 2	42
5. DISCUSSÃO.....	57
6. CONCLUSÕES.....	59
7. REFERÊNCIAS.....	60

1. INTRODUÇÃO

O período de anestro pós-parto prolongado prejudica a lucratividade da bovinocultura de corte, permitindo que animais subfêrteis e improdutivos permaneçam na propriedade (NEVES et al., 1999; YAVAS & WALTON, 2000). Uma alternativa para melhorar as taxas de prenhez em vacas no pós-parto é a utilização de programas hormonais que visem induzir a ciclicidade, minimizar os efeitos ambientais e da amamentação, possibilitar a utilização de inseminação artificial (IA) e otimizar o uso da mão-de-obra, incrementando assim, a produtividade deste setor do agro-negócio. O entendimento da racionalidade destes programas, bem como do comportamento da dinâmica folicular após a utilização destas associações hormonais, permite adequar seu uso para as diferentes situações e também possibilita a criação de novas biotecnologias.

A associação de progestágenos ao benzoato de estradiol (BE) tornou-se o tratamento mais utilizado para indução de estro em vacas de corte (MAPLETOFT et al., 2002; BÓ, et al., 2003). No entanto, apesar de resultados aceitáveis de prenhez serem atingidos com esta associação (FIKE et al., 1997; LAMMOGLIA et al., 1998; LUCY et al., 2001; MARTINEZ et al., 2002a,b; COLAZO et al., 2004), falhas em induzir a emergência de uma nova onda folicular são relatadas (BÓ et al., 1995; DUFFY et al., 2004; KASTELIC et al., 2004; MARTINEZ et al., 2005). Estas podem influenciar os resultados dos programas hormonais, por induzirem a ovulação de oócitos com baixa capacidade de chegar até a vida fetal (AHMAD et al., 1995; KINDER et al., 1996).

Os progestágenos associados a estrógenos causam a supressão temporária da liberação de gonadotrofinas (O'ROURKE et al., 2000; MARTINEZ et al., 2005). No entanto, durante o período de divergência folicular, o crescimento do futuro folículo dominante é pouco dependente destes hormônios endócrinos, estando mais relacionado com fatores autócrinos e parácrinos ovarianos (para revisão: FORTUNE et al., 2004; BEG & GINTHER, 2006). Sendo assim, as falhas em induzir a emergência da nova onda, podem estar relacionadas à fase do crescimento folicular em que a vaca recebe o tratamento (KASTELIC et al., 2004).

Um dos progestágenos sintéticos utilizados em bovinos é o acetato de medroxi-progesterona (MAP). Os pessários vaginais contendo esta substância são uma alternativa interessante para indução de estro em bovinos, pois permitem que sejam alcançadas elevadas taxas de prenhez, com um custo inferior aos outros dispositivos com progestágenos disponíveis no mercado (MORAES & JAUME, 1997; BASTOS et al., 2004; LOGUÉRCIO et al., 2006a). No entanto, ainda não se sabe como o tratamento com MAP e BE influencia o

crescimento folicular de vacas no pós-parto. Por isso, é necessário caracterizar a dinâmica folicular de vacas recebendo esta associação, bem como comparar suas ações a de outros protocolos de progestágenos e BE.

O MAP e BE são utilizados como parte do Sistema BioRep para inseminação de vacas no pós-parto. Além destes hormônios, são utilizados a gonadotrofina coriônica eqüina (eCG), a prostaglandina sintética e o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Aliada a esta associação hormonal ainda é realizado o desmame temporário dos terneiros. Neste processo todas as fêmeas do rebanho com pelo menos 50 dias pós-parto e que apresentam condição corporal mínima 3 (1-caquética, 5-obesas), são inseminadas até às 65h após a retirada dos pessários vaginais, com um período de 48h de detecção de estro e IA em tempo fixo (IATF). Com este protocolo obtem-se, com uma única IA e sem repasse de touro, uma média de 65% de prenhez (LOGUÉRCIO, et al., 2006a).

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 (DISKIN et al., 2002; MAPLETOFT et al., 2002). No entanto, é fundamental que esta diminuição de manejo não prejudique as taxas de prenhez. Atualmente, o indutor da ovulação mais utilizado para IATF em bovinos de corte é o BE (FIKE et al., 1997; BURKE et al., 2001; BARUSELLI et al., 2002; MAPLETOFT et al., 2002; MARTINEZ et al., 2002a,b; BÓ, et al., 2003; BARUSELLI et al., 2004). Sendo assim, a fim de facilitar ainda mais o manejo de IA e utilizar o mesmo protocolo de indução de estro do Sistema BioRep, é importante avaliar a utilização exclusiva da IATF com BE, comparando com o sistema tradicional, o qual associa um curto período de detecção de estro a IATF.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Período pós-parto em bovinos

O anestro pós-parto é um período de transição durante o qual a função do eixo reprodutivo se recompõe após uma gestação. É caracterizado como um momento onde as fêmeas bovinas não ovulam, principalmente devido a uma inadequada liberação de gonadotrofinas (YAVAS & WALTON, 2000). A secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) parece estar normalizada na primeira semana pós-parto, permitindo que ondas foliculares emergam periodicamente, a partir deste momento (WILLIAMS et al., 1983). Porém, a produção e a liberação do hormônio luteinizante (LH) somente será restabelecida posteriormente no decorrer do pós-parto. Se espera que o conteúdo hipofisário deste hormônio esteja normalizado até 30 dias pós-parto, porém Connor et al. (1990) demonstraram que animais em piores condições corporais (CC) ao parto podem apresentar redução neste conteúdo. A partir disto, a frequência de liberação de pulsos de LH passa a estar sob influência, principalmente de uma complexa associação entre condição nutricional e a amamentação. A baixa frequência de pulsos de LH induzida por esta interação é a principal responsável por impedir o crescimento final e ovulação dos folículos dominantes. Vacas em pós-parto amamentando e que recebem reposição hormonal a fim de incrementar a frequência de liberação de LH, apresentam prolongamento da fase de dominância e podem ovular o primeiro folículo dominante formado no pós-parto (DUFFY et al., 2000).

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). Animais com melhores condições nutricionais no pré e pós-parto apresentam intervalo entre partos mais curtos. Vacas submetidas a estresses nutricionais apresentam redução da liberação de LH (RICHARDS et al., 1991).

As maiores necessidades energéticas na vida das fêmeas bovinas adultas são durante o pós-parto, quando elas precisam despender energia para manutenção dos seus processos vitais e ainda para a produção de leite para alimentar o terneiro. No Rio Grande do Sul, este maior requerimento energético coincide com o período de inverno, durante o qual a oferta de nutrientes nos campos nativos encontra-se diminuída. Isso contribui para que os bovinos

passem por carências nutricionais, as quais afetam os índices reprodutivos, principalmente o intervalo entre partos.

Dentre os processos fisiológicos, a reprodução é a primeira a ser inibida frente a estresses nutricionais (KEISLER & LUCY, 1996). Nestes períodos de adversidade, o sistema nervoso central interpreta informações periféricas, que o induzem a priorizar a demanda energética para todos os processos indispensáveis a manutenção da vida. Frente a este “risco de vida”, de forma aguda a síntese e liberação do GnRH é reduzida (I’ANSON et al., 1997; KRIEGSFELD et al., 2006), afetando assim, principalmente a taxa de ovulação. Dentro deste conceito de sinalizadores periféricos, a leptina parece ser responsável em realizar a ligação entre a nutrição e a reprodução.

A leptina é um produto do gene *ob/ob*, que regula o apetite e foi primeiramente estudado em ratos obesos que apresentavam hiperfagia. Demonstrou-se que estes animais carregavam uma mutação neste gene não produzindo este hormônio. Concomitantemente eles apresentavam problemas reprodutivos. Porém, após a administração exógena de leptina, estes animais gradualmente normalizavam seus hábitos alimentares, seu peso corporal e a capacidade reprodutiva (MOUNZIH & CHEHAB, 1997). Os mesmos sinais clínicos foram observados em animais e humanos que possuem uma mutação no gene que codifica os receptores para leptina, impedindo que o hormônio, apesar de ser produzido em quantidades fisiológicas, exerça suas funções (BJORBAEK et al., 1998). Devido a esta ação, acredita-se que ela exerça influência sobre o eixo reprodutivo, atuando no sistema nervoso central (SNC) e em órgãos reprodutivos (SPICER & FRANCISCO, 1998). A leptina 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 CC apresentam menores níveis plasmáticos de leptina, relacionando os seus efeitos sobre a reprodução de bovinos (revisado em ZIEBA et al., 2005).

A administração exógena deste hormônio somente possui características estimulatórias 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 contrário 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 porque vacas em pós-parto apresentam emergência folicular, mas não ovulação.

A secreção de GnRH pode ser influenciada pela leptina, porém o exato mecanismo de interação destes hormônios ainda precisar ser elucidado. Os neurônios produtores de GnRH não possuem receptores para a leptina, por isso, acredita-se que sua ação seja mediada por neurotransmissores, principalmente via neuropeptídeo Y (NPY; MERCER et al., 1996). Este peptídeo possui um padrão elevado de expressão no hipotálamo e na hipófise anterior, sendo encontrado no corpo celular e em terminações nervosas de diversas áreas do cérebro, principalmente naquelas relacionadas com a regulação do consumo alimentar e o balanço energético (THOMAS et al., 1999). A administração central de NPY, além de induzir hiperfagia, altera o padrão de liberação de GnRH e LH, porém não o de FSH (GAZAL et al., 1998). No entanto, apesar da leptina ser capaz de reduzir a síntese e secreção de NPY (SAHU, 1998), ela não foi capaz de atenuar os efeitos sobre a liberação do LH, quando este neurotransmissor foi injetado diretamente no SNC (GARCIA et al., 2004), sugerindo que em bovinos a leptina controla apenas as ações pré-secretórias do NPY. Ainda, parece que o NPY é capaz de controlar a liberação do LH em nível hipofisário, pois após a infusão deste peptídeo diretamente no terceiro ventrículo hipotalâmico, a liberação do LH permaneceu totalmente bloqueada, mesmo após a pulsatilidade do GnRH estar restabelecida (GAZAL et al., 1998).

O peptídeo semelhante à galanina (GALP) é outra substância responsiva a leptina, recentemente encontrada no hipotálamo, e que parece estar envolvida na regulação da ingestão de alimentos e na secreção de LH (SETH et al., 2004). Além do NPY e do GALP, outros neuro-hormônios foram correlacionados com as ações da leptina na regulação do consumo de alimento, mas sem função aparente sobre a regulação do GnRH/LH (revisado em INGVARTSEN & ANDERSEN, 2000).

Além da leptina influenciar a reprodução de bovinos atuando no SNC, suas ações diretas nos órgãos reprodutivos parecem ser significativas. A produção da leptina é principalmente extragonadal, pois as variações no líquido folicular acompanham as plasmáticas (SPICER & FRANCISCO, 1998; GARCIA et al., 2004). Ainda, as células da teca (CT) e granulosa (CG) apresentam receptores para esta proteína, sendo a leptina capaz de atuar no crescimento folicular, estimulando a esteroidogênese (SPICER & FRANCISCO, 1998). Na produção *in vitro* de embriões, ela vem apresentando efeitos positivos, incrementando a maturação oocitária e as taxas de desenvolvimento embrionário (CRAIG et al., 2004; BOELHAUVE et al., 2005). Seu mecanismo de ação ainda precisa ser elucidado,

porém já se sabe que ela atua nas células do cumulus e também diretamente no oócito, alterando o padrão de expressão de alguns genes, principalmente relacionados à apoptose (PAULA-LOPES et al., 2006).

O exato mecanismo pelo qual o SNC recebe e interpreta as informações metabólicas periféricas precisa ser elucidado. Espera-se que o uso de hormônios metabólicos, em especial a leptina, como parte dos programas de indução do ciclo estral, permita o incremento das taxas de repetição de cria. Nesses processos, a administração exógena desses sinalizadores metabólicos, permitiria que as vacas, mesmo sob estresse nutricional, reiniciassem sua ciclicidade e emprenhassem. A racionalidade disto, é que quando estas fêmeas realmente necessitassem direcionar energia para o conceito (terço final de gestação), poderiam ser colocadas em pastagens melhoradas (inverno) ou o aporte nutricional dos campos nativos já estaria melhorando (primavera/verão), permitindo que as gestações fossem levadas a termo.

Além da CC, a duração do pós-parto em vacas de corte esta relacionada a fatores ambientais e individuais, como por exemplo, características raciais, paridade, doenças puerperais e, principalmente, à amamentação (para revisão: YAVAS & WALTON, 2000). Esta última, está correlacionada com a CC ao parto, onde vacas que estão em piores CC são mais sensíveis aos efeitos inibitórios da amamentação sob o restabelecimento da ciclicidade (STAGG et al., 1998; CICCIONI et al., 2003). As vacas que aleitam seus produtos permanecem mais tempo em anestro pós-parto (SHORT et al., 1979). Diferentemente do que ocorre em vacas que são ordenhadas, naquelas que alimentam seus terneiros, a amamentação, além de atuar como fator espoliativo aumentando a necessidade nutricional, possui ação inibitória sobre a secreção de GnRH/LH, impedindo que ocorra a ovulação (WALTERS et al., 1982). A amamentação quando realizada mais de uma vez ao dia é capaz de prolongar o período anovulatório do pós-parto (STAGG et al., 1998, LAMB et al., 1999). Já a restrição total da amamentação, por um período mínimo de 48h, é capaz de aumentar tanto a secreção de GnRH, como a responsividade da hipófise ao GnRH. Isto incrementa principalmente a liberação de LH, aumentando assim a taxa de crescimento folicular e de ovulação e diminuindo o intervalo entre partos (WALTERS et al., 1982; SALFEN et al., 2001).

O efeito negativo da amamentação sob o restabelecimento da ciclicidade da vaca não ocorre somente pelo ato de sucção do teto, mas também por estímulos táteis, visuais e olfativos gerados pela presença física do seu filhote (SILVEIRA et al., 1993; WILLIAMS et al., 1993; STEVENSON et al., 1994). Os mecanismos pelos quais estes “laços maternos” atuam ainda não são completamente elucidados, porém acredita-se que é resultado de uma complexa interação entre estrógenos ovarianos, peptídeos opióides endógenos (POE) e leptina. Aparentemente, os hormônios relacionados com a lactação, como a prolactina, o

cortisol e a ocitocina apresentam uma importância menor no reinício da ciclicidade (FORREST et al., 1980; STEVENSON et al., 1994).

Os estrógenos ovarianos, mesmo quando secretados em baixas quantidades, possuem efeito negativo sobre a liberação de GnRH/LH durante o pós-parto (SHORT et al., 1979). Esta situação de “hipersensibilidade” a estes esteróides é o oposto da que ocorre em vacas ciclando, onde a presença de baixas concentrações de progesterona e a crescente secreção de estrógenos induzem a liberação de GnRH/LH (SHORT et al., 1979; DAY et al., 1987; HARRIS et al., 1998; CHAPPELL & LAVINE, 2000; KANEKO et al., 2002). Aparentemente, os neurônios GnRH são influenciados indiretamente por neurônios localizados na região antroventral paraventricular hipotalâmica e diretamente pela subunidade beta do receptor de estrógeno (PETERSEN et al., 1995; SHUGHRUE et al., 1997; HRABOVSKY et al., 2000). As ações indiretas são principalmente mediadas por neurotransmissores, principalmente o ácido gama aminobutírico e o glutamato (para revisão: CLARKSON & HERBISON, 2006). Porém, o exato mecanismo de ação dos esteróides regulando a secreção de GnRH e LH ainda precisa ser elucidado.

Acredita-se que pelo menos parte das ações inibitórias da amamentação sejam realizadas pelos POE, os quais modulariam as ações dos estrógenos no pós-parto (LESHIN et al., 1991; WOLFE et al., 1991). Os POE, especialmente as β -endorfinas, funcionam como neurotransmissores atuando no hipotálamo, diminuindo a secreção de GnRH e a liberação de LH. Quando a ação dos POE é inibida, vacas em pós-parto retornam a ciclicidade mais rapidamente (WHISNANT et al., 1986; MYERS et al., 1989). Estudos em ratos sugerem ainda uma ação independente do estrógeno ovariano, onde estes neurotransmissores fariam uma interação com hormônios adrenérgicos (dopamina), alterando a secreção de LH. Experimentos em novilhas pré-púberes demonstraram os efeitos isolados dos POE e dos adrenérgicos, porém não confirmaram este efeito cumulativo entre eles (HONARAMOOZ et al., 2000). Ainda, a inibição da liberação de LH pela amamentação ocorre independentemente dos esteróides gonadais, pois vacas castradas amamentando apresentam redução na secreção desta gonadotrofina em relação a vacas desmamadas (GARCIA-WINDER et al., 1984; HINSHELWOOD et al., 1985).

Os estrógenos são correlacionados com uma diminuição no consumo alimentar voluntário em bovinos e esta redução na ingesta parece ser suprimida pela progesterona (GRUMMER et al., 1990). Durante o pós-parto, onde é observada maior sensibilidade aos estrógenos e baixos níveis de progesterona endógena, este bloqueio hormonal que impede a retomada da ciclicidade mais uma vez estaria ligado à nutrição, provavelmente via leptina e NPY (TITOLO et al., 2006).

A complexa interação entre nutrição, amamentação e retorno a ciclicidade precisa ser melhor analisada. As pesquisas têm avaliado a importância de cada fator isoladamente, porém, compreender exatamente como todos os fatores interagem é imprescindível. Assim, estudos comparativos precisam ser realizados possibilitando que novas tecnologias sejam geradas, incrementando a produtividade dos rebanhos bovinos.

2.2. Dinâmica folicular em bovinos

O ciclo estral em bovinos é dinâmico e caracterizado por crescimento em ondas foliculares, que são compostas por uma seqüência de eventos que incluem o recrutamento, emergência, divergência e dominância folicular (FORTUNE, 1994). O destino do folículo dominante será a ovulação ou a atresia, dependendo da capacidade deste manter seu processo esteroidogênico ativado (BAO et al., 1997a,b).

A emergência folicular é caracterizada por ser um processo onde um grupo de aproximadamente 8 a 12 folículos cresce simultaneamente no ovário, concomitantemente ao pico de liberação do FSH (ADAMS et al., 1992; HAUGHIAN et al., 2004). Neste momento, esses folículos apresentam em torno de 4 milímetros (mm) de diâmetro, sendo responsivos e dependentes dessa gonadotrofina, pois se a ação deste hormônio for impedida, os folículos recém emergidos entrarão em atresia (GIBBONS, et al., 1997; GINTHER et al., 2002a). O FSH permite que estes mantenham seu crescimento e proliferação celular, aumentando gradualmente sua capacidade esteroidogênica (ADAMS et al., 1992; RHODES et al., 2001; HENDRIKSEN et al., 2003; LUO & WILTBANK, 2006).

Após atingir os níveis de concentração plasmáticos máximos, o FSH começa a diminuir até níveis basais (GIBBONS et al., 1997; GINTHER et al., 1997, 2000, 2002a). Inicialmente, todos os folículos emergidos contribuem para que a secreção desta gonadotrofina diminua, pois todos produzem estrógeno, e este é o principal responsável pelo declínio do FSH (BEG et al., 2003). Tem-se sugerido que outros hormônios, principalmente os pertencentes à família do Fator α de necrose tumoral, como a inibina, também possam estar envolvidos neste processo inibitório (GLISTER et al., 2001, 2003; KNIGHT & GLISTER, 2001). Novilhas imunizadas contra inibina apresentam aumento na taxa de ovulação, evidenciando o envolvimento deste hormônio na regulação do processo de divergência folicular (MEDAN et al., 2004). No entanto, os achados ainda não são conclusivos quanto ao seu papel neste mecanismo. A inibina estimula a esteroidogênese, aumentando a produção de andrógenos (WRATHALL & KNIGHT, 1995). Ações independentes dos estrógenos têm sido

demonstradas, porém aparentemente são menos evidentes (LANE et al., 2005). Como a concentração de inibina nos dois maiores folículos é semelhante durante o processo de divergência folicular, têm-se sugerindo que ela exerça principalmente ações endócrinas na regulação do FSH (BEG et al., 2002; GINTHER et al., 2002a,b, 2003).

Do conjunto de folículos emergentes, normalmente apenas um é capaz de manter-se estrogênio-ativo, proporcionando a manutenção do seu crescimento, passando pelo processo de divergência folicular, atingindo assim a condição denominada de folículo dominante. Durante o período de dominância, a diminuição dos níveis plasmáticos de FSH induz a atresia dos subordinados, pois estes ainda são dependentes deste hormônio (GIBBONS et al., 1997; GINTHER et al., 1997, 2000, 2002a).

Durante as fases finais do crescimento folicular, o LH passa a atuar nas CG, através dos seus receptores funcionando permitindo que o folículo dominante se mantenha crescendo, com considerável independência do FSH (EVANS & FORTUNE 1997; BAO et al., 1997a,b). Estudos recentes demonstraram que na emergência folicular, algumas isoformas inativas do receptor de LH já estão sendo transcritas nas CG (ROBERT et al., 2003). Porém, a proteína capaz de se ligar ao LH somente é transcrita em momentos mais tardios, quando se espera que a dominância já esteja estabelecida (EVANS & FORTUNE, 1997). Sendo assim, como durante processo de divergência folicular o FSH encontra-se em níveis basais (GIBBONS et al., 1997; GINTHER et al., 1997, 2000, 2002), existe um período em que o futuro folículo dominante consegue manter seu crescimento mesmo em um ambiente com baixa disponibilidade de gonadotrofinas.

Até pouco tempo, acreditava-se que as gonadotrofinas possuíam papel principal no processo de divergência folicular (BADINGA et al., 1992; FORTUNE, 1994; GINTHER et al., 1996). Considerava-se simplesmente que o folículo que primeiro adquirisse receptores para LH nas CG, alteraria sua dependência de FSH para LH e seria o “escolhido” para exercer dominância sobre os demais. Porém, atualmente entende-se que 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).

Aparentemente, a capacidade de aumentar antecipadamente a produção de estrógenos, mesmo quando exposto a esta baixa concentração de gonadotrofinas é o que permite o maior folículo, normalmente, se tornar o dominante (BADINGA et al., 1992; BEG et al., 2003). O futuro folículo dominante inicia o seu crescimento mais cedo que os subordinados da onda folicular (GINTHER et al., 1997). Aparentemente, ele emerge horas antes, e no segundo dia

após a emergência já apresenta 1mm de diâmetro a mais que seus contemporâneos (EVANS & FORTUNE, 1997). Além desta diferença morfológica, as alterações bioquímicas também se iniciam antecipadamente no futuro dominante. Acredita-se que esta resposta mais rápida e precoce seja devido a uma maior sensibilidade ao FSH, no entanto, ainda não se sabe como este folículo é capaz de antecipar tal resposta (FORTUNE et al., 2004; BEG & GINTHER, 2006). O exato mecanismo que diferencia e capacita um folículo a atravessar o processo de divergência, se tornando o dominante, ainda não está completamente compreendido. No entanto, acredita-se que o sistema IGF (fator de crescimento semelhante a insulina) exerça um dos papéis principais dentro deste processo, “hipersensibilizando” o futuro dominante às ações das gonadotrofinas e impedindo que isso ocorra nos subordinados.

Ao contrário dos subordinados, o folículo dominante é capaz de produzir estrógenos mesmo em baixas concentrações de gonadotrofinas. Aparentemente, a maior quantidade de IGF-I livre no líquido folicular no momento da divergência é o principal fator que lhe atribui tal capacidade (STEWART et al., 1996; GINTHER et al., 2003; RIVERA & FORTUNE, 2003a,b), pois aumentaria sua sensibilidade ao FSH, permitindo a manutenção da esteroidogênese até que possa responder ao LH.

O folículo dominante em bovinos provavelmente será aquele que utilizar com sucesso ações recíprocas entre gonadotrofinas, IGF-I e estradiol visando estimular o seu crescimento e concomitantemente inibir o crescimento dos seus contemporâneos. O FSH é capaz de aumentar a expressão de IGF-I nas CG (ARMSTRONG et al., 1996; SPICER & CHAMBERLAIN, 2000). Por sua vez, o IGF-I estimula a proliferação e diferenciação das CG e também o aparecimento de receptores de LH nestas células (ARMSTRONG et al., 1996; SPICER & STEWART, 1996). Ainda, o IGF-I livre pode atuar diretamente aumentando a esteroidogênese ou indiretamente potencializando as ações do FSH e do LH (STEWART et al., 1995; SPICER & STEWART, 1996; SPICER et al., 2002). O estradiol é capaz de incrementar a síntese de IGF-I nas CG. E por fim, além de induzir a redução do FSH por incrementar a produção de estradiol, o IGF-I também estimula a biosíntese de inibina A, activina A e folistatina pelas CG (SPICER et al., 2002).

O IGF-I é produzido tanto nas CT quanto nas CG, no entanto, somente a produção deste fator nas últimas é regulada por hormônios (SPICER & CHAMBERLAIN, 2000). A disponibilidade de IGF-I no líquido folicular é regulada pela ação de proteínas ligadoras do IGF (IGFBP). A redução destas proteínas ligadoras pode ser detectada em futuros folículos dominantes, antes de apresentarem diferenças morfológicas em relação aos seus subordinados (RIVERA & FORTUNE, 2003a,b).

Aparentemente, as IGFBP mais importantes dentro do processo de divergência folicular

são aquelas que possuem baixo peso molecular (menos que 42 kD; de la SOTA et al., 1996). Dentre estas, destaca-se as IGFBP-II, IV e V, as quais já foram encontradas no líquido folicular de bovinos e são produzidas nas CT e CG (MIHM et al., 2000; RIVERA et al., 2001; VOGÉ et al., 2004a,b). Apesar das IGFBP-III também serem encontradas no ambiente intrafolicular, estas não parecem estar envolvidas no processo de seleção. Ao contrário das anteriores, as concentrações foliculares de IGFBP-III acompanham as variações plasmáticas, indicando uma produção extragonadal (de la SOTA et al., 1996; FUNSTON et al., 1996). Foliculos dominantes em crescimento, ao contrário dos dominantes atresícos e subordinados, apresentam uma quantidade reduzida de IGFBP-II, IV e V no líquido folicular (FUNSTON et al., 1996; STEWART et al., 1996; RIVERA & FORTUNE, 2003a,b).

Em bovinos existem dois mecanismos de controle das concentrações de IGFBP. O primeiro é um processo enzimático, realizado pela proteína plasmática-A associada à prenhez (PAPP-A) a qual é capaz de degradar as IGFBP-IV e V (RIVERA & FORTUNE, 2003a,b). Em resposta ao FSH, os futuros foliculos dominantes adquirem, antecipadamente, estas enzimas proteolíticas responsáveis por degradar as IGFBP (RIVERA & FORTUNE, 2001; RIVERA et al., 2001; SPICER et al., 2001). Isto permite que ao invés da maioria das moléculas de IGF-I estarem ligadas às proteínas ligadoras, como ocorre nos subordinados, elas estão livres no líquido folicular, potencializando a ação das gonadotrofinas nesses candidatos à dominância, aumentando a síntese de estradiol. Atualmente, o aumento precoce de PAPP-A é considerado o primeiro indício de dominância (RIVERA & FORTUNE, 2003b; FORTUNE et al., 2004). No entanto, a concentração desta enzima não parece ser diferente entre o dominante e os subordinados após o processo de divergência estar estabelecido (SANTIAGO et al., 2005).

Já o segundo mecanismo de regulação das proteínas ligadoras não está completamente elucidado, porém acredita-se que regule a síntese proteica de IGFBP-II (YUAN et al., 1998; SPICER et al., 2001; SANTIAGO et al., 2005), aparentemente ocorrendo em decorrência, e não como uma causa, da dominância folicular (RIVERA & FORTUNE, 2003b). Enquanto a expressão gênica das IGFBP-II, IV e V nas células foliculares de foliculos terciários grandes (>7,9mm) é inibida pelo estradiol, em foliculos pequenos (1 a 5mm) a expressão de IGFBP-II é estimulada (VOGÉ et al., 2004a).

De maneira geral, este é o mecanismo pelo qual o sistema IGF participa do processo de seleção e dominância folicular. No entanto, ele não parece ser o único capaz de atuar no processo de divergência e crescimento folicular. Outros fatores de crescimento e peptídeos localmente produzidos no foliculo, certamente são capazes de exercer efeito sobre a foliculogênese, mediando e/ou modulando a ação de hormônios endócrinos (McNATTY, et

al., 1999). Os fatores de crescimento fibroblásticos (FGF) e o sistema renina-angiotensina merecem destaque em bovinos, pois estas substâncias fazem parte de mecanismos paralelos, sinérgicos ou até mesmo independentes do IGF (BERISHA et al., 2002, 2004; BURATINI et al., 2005).

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 encontrados em células de folículos antrais (BURATINI et al., 2005).

Os FGF-1, 2 e 7 são produzidos principalmente nas CT (PARROTT & SKINNER, 1998; BERISHA et al., 2004), e atuam nas CG através de seus receptores, onde já foi demonstrado que o FGF-7 é capaz de reduzir a produção de estrógeno nestas últimas. 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).

Ainda não é completamente elucidada a relação entre os tipos e a especificidade dos FGFr. No entanto, acredita-se que grande parte das ações intrafoliculares dos FGF sejam mediadas pelo FGFr-2b, 3c e 4, sendo estes expressos predominantemente nas CG, CT e CG/CT, respectivamente. O FGFr-3c é responsivo ao FSH, mas não ao IGF-I (BURATINI et al., 2005). Estes achados sugerem que estes FGF exercem um papel potencializador das ações desta gonadotrofina sobre o desenvolvimento folicular, com ações concomitantes e talvez independentes do sistema IGF.

Outro peptídeo que parece influenciar a foliculogênese é a angiotensina II (Ang-II). Ela pertence ao sistema renina-angiotensina. Neste, o angiotensinogênio é utilizado como substrato, sofrendo 2 clivagens sucessivas, a primeira pela renina e a segunda pela enzima conversora de angiotensina, originando respectivamente a Ang I e II. Além de ser sítio de ação, aparentemente o ovário é capaz de produzir Ang-II localmente, pois o líquido folicular apresenta concentrações distintas do plasma sanguíneo (GLORIOSO et al., 1986). Ainda, são notadas variações das suas concentrações intrafoliculares durante as fases do ciclo estral (YOSHIMURA et al., 1994; ACOSTA et al., 2000).

Os receptores para Ang-II são divididos em subtipos 1 e 2, os quais em bovinos estão distribuídos nas CT e CG de folículos antrais (BRUNSWIG-SPICKENHEIER & MUKHOPADHYAY, 1992; ACOSTA et al., 1999; SCHAUSER et al., 2001). Porém, devido a seu padrão de expressão em folículos em crescimento e atresicos, é provável que a maioria das ações da Ang-II no processo de foliculogênese final sejam mediadas pelo receptor do tipo

2 (SCHAUSER et al., 2001; PORTELA et al., 2006). Durante o crescimento, os folículos apresentam quantidades crescentes destes receptores nas CG, enquanto os receptores do tipo 1 aparentemente não variam (PORTELA et al., 2006).

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., 2006). O crescimento de folículos antrais parece ser influenciado por este peptídeo, porém o mecanismo de ação ainda precisa ser elucidado. A ang-II poderia induzir o crescimento folicular indiretamente, atuando como fator angiogênico e promovendo um maior aporte de fatores que estimulem o crescimento folicular. No entanto, independentemente desta primeira função, a ANG-II ainda pode atuar diretamente no crescimento do folículo dominante, potencializando as ações das gonadotrofinas e fatores de crescimento, permitindo que o folículo ultrapasse o período de restrição de gonadotrofinas (PORTELA et al., 2006). 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, a exata importância e o mecanismo de ação da angiotensina na foliculogênese ainda necessita ser esclarecida.

2.3. Indução/sincronização de estros em bovinos

Para incrementar os índices reprodutivos dos rebanhos bovinos é necessário que as vacas emprenhem em intervalos de 365 dias. Por isso, os métodos de indução de estro têm sido pesquisados, tornando-se ferramentas importantes no manejo reprodutivo destes rebanhos. Dentre estes métodos, destacam-se as associações hormonais e os desmames, os quais podem ser utilizados de forma separada ou concomitante a fim de possibilitar que as vacas emprenhem durante o pós-parto (LUCY et al., 2001; LOGUÉRCIO et al., 2006a).

Em vacas de corte amamentando em pós-parto, a utilização de progestágenos como parte dos programas hormonais para indução de estro é indispensável, quando se deseja alcançar elevadas taxas de prenhez (LUCY et al., 2001). Além destes esteróides atuarem sobre a dinâmica folicular (MACKEY et al., 2000; SAVIO et al., 1993; STEGNER et al., 2004; COLAZO et al., 2006), eles têm a capacidade de diminuir a incidência de ciclos curtos após a primeira ovulação pós-parto e favorecer o restabelecimento da ciclicidade (RUTTER et al., 1985; FIKE et al., 1997).

Aparentemente, os ciclos curtos são induzidos pela liberação precoce de prostaglandina $F_2\alpha$ (PGF $_2\alpha$) no endométrio, induzindo assim a luteólise prematura do corpo lúteo (ZOLLERS et al., 1991; BUFORD et al., 1996; MANN & LAMMING, 2000). O mecanismo que controla esta liberação de PGF $_2\alpha$ não é totalmente entendido. No entanto, acredita-se que as baixas concentrações de progesterona e estradiol que antecedem a primeira ovulação do pós-parto, induzam insuficientes receptores de progesterona no útero para a ocorrência de um ciclo estral normal (ZOLLERS et al., 1993; MANN & LAMMING, 2000).

A administração de progestágenos exógenos é capaz de modular a expressão de receptores para esteróides no endométrio (ZOLLERS et al., 1993; LOGUÉRCIO et al., 2006b) e no hipotálamo (PETERSEN et al., 1995; ANDERSON & DAY, 1996). O aumento de receptores no endométrio impede a liberação precoce de PGF $_2\alpha$ aparentemente por retardar a ação da ocitocina (LEUNG et al., 2000). A ação direta dos progestágenos sobre os núcleos hipotalâmicos reduzindo os receptores de estradiol, permite que a frequência de liberação de GnRH/LH aumente (PETERSEN et al., 1995; ANDERSON & DAY, 1996; TURZILLO et al., 1998; LOOPER et al., 2003). Isto estimula o crescimento folicular final e o aumento da esteroidogênese intrafolicular aos níveis que possibilitem a indução do pico pré-ovulatório de LH. Sendo assim, os progestágenos capazes de minimizar o bloqueio neuro-endócrino do pós-parto, favorecendo a ocorrência de ovulações que resultem na formação e manutenção de corpos lúteos por períodos adequados (RUTTER et al., 1985; ZOLLERS et al., 1993; FIKE et al., 1997; MANN & LAMMING, 2000).

O efeito dos progestágenos sobre o crescimento folicular varia de acordo com o momento, a dose e a frequência de administração. Estes esteróides não parecem exercer efeitos significativos sobre o padrão de liberação do FSH (GINTHER et al., 2001; NETT et al., 2002). Se aplicados de maneira a induzir concentrações plasmáticas supraluteais, eles são capazes de diminuir a frequência de liberação do LH (GINTHER et al., 2001). Desta forma, os progestágenos quando utilizados isoladamente, somente são capazes de induzir a regressão de folículos em estágios avançados de crescimento, ou seja, após a dominância estar estabelecida (GINTHER et al., 2001).

Os dispositivos para liberação lenta de progestágenos disponíveis comercialmente, induzem concentrações plasmáticas subluteais destes hormônios (SAVIO et al., 1993). Por isso, quando a utilização destes não coincide com a presença de um corpo lúteo funcional, como é o caso das vacas em anestro, eles estimulam a liberação de LH. No entanto, se estas doses subluteais permanecem por um longo período, possibilitarão a formação de folículos persistentes, acarretando em prejuízos a fertilidade (AHMAD et al., 1995; KINDER et al., 1996). Para evitar estes problemas de persistência folicular, é necessário que o tratamento

com progestágenos não seja muito prolongado, preferencialmente entre 5 e 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 estros mais utilizado em bovinos de corte.

A administração de estradiol causa a supressão do crescimento dos folículos antrais e emergência de uma nova onda folicular em tempo relativamente previsível (BÓ et al., 1993). Esta supressão do crescimento folicular é mais eficaz quando o uso de estradiol for concomitante ao de progestágenos (BÓ et al., 1994). A regressão dos folículos FSH-dependentes é causada por ação do estradiol e a dos LH-dependentes pela interação estrógeno/progesterona (MARTINEZ et al., 2005). Utilizando-se BE, espera-se que uma nova onda folicular se inicie 4,3 dias após sua aplicação (BÓ et al., 2000; MARTINEZ et al., 2002a). O BE é capaz de causar a perda da função estrogênica do folículo dominante entre 12 e 36 horas após sua administração (BURKE et al., 2001; 2003; 2005).

O estradiol pode ser aplicado concomitantemente à injeção de 50 a 100mg de progesterona e a inserção dos dispositivos vaginais impregnados com progestágenos (BÓ et al., 1995; CASSIA & BÓ, 1998). A associação de progesterona injetável no início do tratamento tem o intuito de prevenir a liberação de LH nos animais que não possuem CL, concentrando ainda mais a emergência da nova onda (MAPLETOFT et al., 2002).

Dentre as vacas que são tratadas com progestágenos e estradiol, algumas não apresentam atresia e regressão dos folículos ovarianos (BÓ et al., 1995; DUFFY et al., 2004, MARTINEZ et al., 2005). Estas falhas na resposta a esta associação hormonal podem ser dependentes do estágio do ciclo estral. Kastelic et al. (2004), sugeriram que as baixas concentrações de progesterona endógena no momento do tratamento poderiam influenciar na resposta. Segundo Cavestany et al. (2003), o MAP utilizado em pessários vaginais, pode não ser suficiente para simular os níveis de progesterona capazes de prevenir a ovulação durante o tratamento. Além disso, a associação de BE e MAP pode não induzir a emergência sincrônica de uma nova onda folicular (SILVEIRA et al., 2003) podendo prejudicar os resultados de prenhez.

Os pessários vaginais impregnados com MAP se tornaram uma ferramenta alternativa e mais barata, se comparada a outras fontes de progestágenos (MORAES & JAUME, 1997). No entanto, da mesma forma que outros progestágenos, quando associados exclusivamente ao estradiol em vacas no pós-parto, o MAP produz resultados inconsistentes, que variam conforme as condições nutricionais e ambientais a que os animais estão submetidos. Além de uma emergência de onda folicular sincronizada, é necessário que ao final do tratamento se obtenha um folículo capaz de induzir e/ou ovular após o pico pré-ovulatório endógeno de LH.

Em vacas *Bos taurus*, os folículos somente desenvolvem tal capacidade após atingir diâmetro de 12mm e isto está relacionado à presença de receptores de LH na CG (SARTORI et al., 2001). Com este objetivo, a administração da gonadotrofina coriônica equina (eCG) e o desmame podem ser realizados para incrementar a taxa de crescimento e ovulação do folículo dominante.

A 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. A resposta superovulatória está, normalmente, relacionada com a dose utilizada, pois doses baixas (500UI) levam à formação de poucos folículos (1 a 3) e doses altas a muitos co-dominantes, causando superovulação (MURPHY & MARTINUK, 1991). Em programas de indução de estros, a aplicação da eCG, concomitantemente ao final do período de exposição aos progestágenos, somente 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., 2006a). Provavelmente, este maior tamanho resultará em incremento nas taxas de ovulação, permitindo que melhores índices de prenhez sejam alcançados.

As técnicas de desmame visam minimizar os efeitos inibitórios da amamentação sobre a liberação de GnRH/LH no pós-parto (STAGG et al., 1998, GEARY et al., 2001). Para isso, diversos métodos de desmame foram desenvolvidos, consistindo em sistemas que preconizam desde a separação temporária, parcial ou total, dos terneiros de suas mães, até o desmame definitivo. Estas técnicas podem ser utilizadas concomitantes a processos de indução de estro, permitindo uma potencialização no restabelecimento da ciclicidade em vacas no pós-parto. Além de atuar minimizando os efeitos negativos da amamentação, o desmame facilita o manejo de detecção de estro e IA.

Os desmames temporários podem ser realizados com auxílio de dispositivos nasais (tabletas nasais) que impedem o terneiro de mamar. Apesar deste método ser muito utilizado, as tabletas parecem atuar exclusivamente como “poupadores de energia”, uma vez que as vacas diminuem a sua produção de leite durante o período em que o terneiro está impedido de mamar. No entanto, por permitir acesso à região inguinal da vaca e também por permitir os estímulos visuais e olfatórios, não são capazes de superar o bloqueio neuro-endócrino que inibi a ciclicidade. Browning Jr. et al. (1994) demonstraram que permitindo que o terneiro mame apenas uma vez ao dia, reduz-se o intervalo entre partos sem afetar o ganho de peso do

lactente. No entanto, a utilização deste manejo parece ser pouco aplicável, uma vez que todo rebanho precisaria ser reunido diariamente em um centro de manejo, onde mães e filhos seriam reunidos por meia-hora, e após este período teriam de ser separados novamente. Já os sistemas de desmame temporários que fazem separação total do terneiro por um período de 48 a 120h, são capazes de permitir um incremento na pulsatilidade de GnRH/LH, diminuindo o intervalo entre partos (STAGG et al., 1998, GEARY et al., 2001). Porém, quando estes manejos são utilizados isoladamente produzem resultados inconsistentes. A separação permanente realizada aos 60 dias pós-parto (desmame precoce), normalmente, produz bons resultados de prenhez no fim da estação de monta (LOGUÉRCIO et al., 2006b), mas está na dependência direta de fatores ambientais, principalmente da oferta alimentar. Outra restrição é o custo da implantação, o qual pode ser elevado de acordo com as oscilações dos preços de insumos que serão utilizados para suplementar a alimentação destes animais (PASCOAL & RESTLE, 2000).

Nos últimos anos vem se buscado minimizar ou até mesmo eliminar a necessidade de detecção de estros. Especialmente em vacas no pós-parto, as falhas na observação de cios, aliadas a necessidade de racionalização do manejo com os animais e também do uso da mão-de-obra disponível, parecem ser as principais justificativas para isso (revisado em BARUSELLI et al. 2004). Porém, é importante que esta redução de manejo não acarrete em diminuições na taxa de prenhez final do rebanho.

Para a realização da IATF, é necessário conhecer o momento esperado em que a ovulação ocorrerá. Com este intuito, a utilização de indutores da ovulação ao término do período de exposição aos progestágenos tem sido amplamente estudada (FIKE et al., 1997; STEVENSON et al., 2000; FERNANDES et al., 2001; GEARY et al., 2001; BARUSELLI et al., 2002; MARTINEZ et al., 2002 a,b; SILVEIRA et al., 2003; BARUSELLI et al., 2004; BASTOS et al., 2004; KASIMANICKAM et al., 2006). Atualmente o BE e os agonistas do GnRH são os mais utilizados, propiciando resultados de prenhez variados.

Vacas de corte em pós-parto são tratadas com BE no intuito de induzir estro e ovulação. O tratamento com este estrógeno promove a liberação de um pico de LH, dentro de um intervalo de 16 às 30h (LAMMOGLIA et al., 1998). Apesar desta variação, as taxas de prenhez ficam em torno de 50%, quando utilizada exclusivamente a IATF (LAMMOGLIA et al., 1998; BURKE et al., 2001; MARTINEZ et al., 2002a; COLAZO et al., 2004). No entanto, as taxas de prenhez podem ser reduzidas de acordo com a quantidade de vacas em anestro dentro do rebanho e também com o tamanho do folículo dominante no momento da aplicação do BE (BARUSELLI et al., 2004). Ainda, a utilização de estrógenos induz a demonstração de sinais de estro na maioria das vacas, porém algumas destas não apresentam ovulação

(BURKE et al., 2001).

A administração de GnRH induz um pico de LH que se inicia logo após sua aplicação (em torno de 15 minutos; LUCY & STEVENSON, 1986). Os sistemas com GnRH são amplamente utilizados em vacas de leite (PURSLEY et al., 1995; XU et al., 2000). No entanto, os resultados em vacas de corte em pós-parto são variados e normalmente atingem baixas taxas de concepção quando utilizados em programas de IATF (STEVENSON et al., 2000; FERNANDES et al., 2001; BARUSELLI et al., 2002). Apesar desta menor variabilidade no momento da indução do pico de LH em relação ao BE, estas baixas taxas de concepção também são principalmente devido ao tamanho inadequado do folículo dominante no momento da administração (BURKE et al., 2001).

3. CAPÍTULO 1

TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

**ARE PROGESTINS ASSOCIATED TO ESTRADIOL
CAPABLE TO INDUCE FOLLICULAR ATRESIA IN
GONADOTROPHINS LOW DEPENDENT FOLLICLES?**

**Lucas Carvalho Siqueira, Rogério Ferreira, Luiz Felipe Borges, João
Francisco Oliveira, Paulo Bayard Gonçalves**

Theriogenology, 2007

**ARE PROGESTINS ASSOCIATED TO ESTRADIOL CAPABLE TO INDUCE
FOLLICULAR ATRESIA IN GONADOTROPHINS LOW DEPENDENT
FOLLICLES?**

Lucas Carvalho Siqueira¹, Rogério Ferreira¹, Luiz Felipe Borges¹, João Francisco
Oliveira¹, Paulo Bayard Gonçalves¹

¹Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction - BioRep, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

Correspondence to: Paulo Bayard Gonçalves

Address: Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction - BioRep, Federal University of Santa Maria, Department of Large Animal Clinical, Santa Maria, RS, Brazil.
97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

Phone number: 55-55-3220-8484

Fax number: 55-55-3220-8484

E-mail address: bayard@biorep.ufsm.br

Abstract

This experiment was conducted to evaluate the follicular dynamics of cows with low endogenous progesterone, treated with three different progestin protocols associated to estradiol benzoate (EB), before expected deviation moment (5 to 7 mm), around deviation (8 to 10 mm) or post-deviation (>10 mm). Thirty six suckled cows 60 to 90 days postpartum in a body condition score of 3 (1- extremely thin; 5- obese) received two injections of cloprostenol (12/12 h; im). Forty-eight hours after first cloprostenol injection, all follicles >5 mm were ablated and transrectal ultrasound scanning (8 MHz linear-array transducer) was performed every 24 h until day 7 (Day 0 = treatment). When the largest follicle reached a designated diameter of 5 to 7, 8 to 10 or >10 mm, animals were randomly allocated to receive 2 mg of EB (im) associated to vaginal devices containing 250 mg of medroxi-progesterone acetate (MPA) with or without 100 mg of progesterone (P4; im) or vaginal devices containing P₄ according to a 3 by 3 factorial. The treatments induced follicular regression in all cows. There was no treatment and follicular diameter group interaction on maximum size, timing to reach maximum follicular size, follicular regression, new wave emergence or time in plateau stage. Cows receiving MPA or P₄ vaginal devices presented similar follicular dynamics. In conclusion, irrespective of follicular size at treatment, postpartum cows bearing emerged growing follicles presented similar responses on follicular wave dynamics when treated with EB and different progestin protocols.

Key words: *cow, follicular dynamic, progestin, estradiol.*

1. Introduction

Progestins associated with an estradiol injection at the beginning of estrous synchronization programs are widely used in beef cattle. The intent of this association is to induce atresia of all emerged follicles present on the ovaries at this point and induce a new synchronic follicle wave emergence during treatment period. When this treatment was first tested with this purpose, closely to the 90's, knowledge supported the exclusively dependency of follicle growth on FSH and LH levels, marking it perfect, since would inhibit both hormones. BÓ et al. [1] demonstrated the success of such association, inducing a new wave emergence at different moments of estrous cycle. After this many similar experiments and field results confirmed on different animal categories.

In the last few years, many advances have been made on the understanding of follicle wave dynamics, establishing the importance of an autocrine/paracrine control at the deviation process [2,3], specially the insulin-like growth factor (IGF) system, providing evidence that in a low gonadotrophin environment, only the future dominant follicle is able to sustain its growth, whereas subordinates undergo atresia [4-6]. In the granulosa cells, apparently the acquisition of LH receptors occurs latter on follicle growth [4] or at least for its functional protein [7], suggesting that LH role at deviation is just through theca cells. Protocols associating progestins and estradiol cause a dose-dependent transient suppression on FSH and LH [8,9], but this suppression is not stronger than the one seen at the deviation moment [10,11], when still there are enough gonadotrophins for maintaining the steroidogenic process activated in the dominant follicle.

It seems reasonable to suppose that a lack of response to this treatment causes the regression of those "IGF dependent follicles". Indeed, many researchers had described some failures on inducing dominant follicle atresia with this association [1,9,12] and the explanation could be related to low levels of endogenous progesterone (P_4) [13]. Therefore,

the present experiment was conducted to evaluate the follicular dynamics of cows with low endogenous P₄, treated with three different progestin protocols associated to estradiol benzoate, at 3 different moments of follicular growth, before expected deviation (5 to 7 mm), around deviation (8 to 10 mm) or post-deviation (>10 mm).

2. Materials and methods

2.1. Animals and experimental groups

Thirty six suckled *Bos taurus* beef cows 60 to 90 days post-partum with a body condition score of 3 (ranging from 1- extremely thin, to 5- obese), received two injections of cloprostenol (125 µg into vulvar submucosa; Schering-Plough Animal Health, Brazil) 12 h apart. Forty-eight hours after the first cloprostenol injection, all follicles >5 mm were ablated using a transvaginal ultrasound-guided approach [14] (Pie-medical 200, 7.5 MHz sector array transducer). Thereafter, when the largest follicle reached a designated diameter of 5 to 7, 8 to 10 or >10 mm (follicular size groups), defined as day zero for each cow, animals were randomly allocated into one of three treatment groups as specified below, denominated MPA, MPA + P₄ or P₄ in a 3 by 3 factorial (3 follicular size and 3 treatment groups; 4 cows per group).

MPA: vaginal device containing 250 mg of medroxi-progesterone acetate (MPA; described by Bastos et al. [15]) + 2 mg im of estradiol benzoate (EB; in oil).

MPA + P₄: vaginal device containing 250 mg of MPA + 2 mg im of EB + 100 mg im of P₄ (in oil).

P₄: vaginal device containing 1 g of P₄ (Syntex S.A., Argentina) + 2 mg im of EB.

2.2 Ultrasound scanning and definitions

After ablation, transrectal ultrasound scanning (8 MHz linear-array transducer) was performed every 24 h until day 7 following up follicle dynamics, where all follicles were mapped to facilitate tracking of individual follicles over consecutive days. Maximum size was

defined as been the maximum diameter reached by the larger follicle after treatment; days to maximum size as the period (days) from treatment until maximum size was attained; stage of plateau as the period (days) after maximum size when this follicle did not change its diameter; follicular regression as a progressive decrease in diameter of the largest follicle; regression day as the first day on which follicular regression was noticed; and follicular wave emergence as been the day when at least one growing follicle reached a diameter of ≥ 5 mm [16].

2.3 Statistical analysis

The follicular regression induction rate was compared in both treatment and follicular size groups using a non-parametric analysis throughout the categorical data analysis procedures (PROC CATMOD; SAS Version 9.1 for Windows; SAS Institute, Cary, NC, USA). Timing to reach maximum follicular size, follicular atresia induction, new wave emergence and time in plateau stage are presented as mean \pm s.e.m (standard error of the mean). Differences in dependent variables were accessed using GLM procedure, within independent variables treatment, follicular size and treatment by follicular size interaction and the means were compared by least squares means. The group effects of treatment and follicular size on follicular growth dynamics were analyzed by the MIXED procedure of SAS with a repeated statement. Main effects of group, follicular size and day and their interaction were determined and differences between continuous data such as follicular diameter on a specific day were compared between independent variables by estimate statement.

3. Results

The treatments induced follicular regression in all treated cows (n = 34) and the emergence of a new wave was not observed in two cows in the MPA group during

experimental period. There was no treatment or follicular diameter group interaction on maximum size, timing to reach maximum follicular size, follicular regression, new wave emergence or time in plateau stage; therefore, the data are demonstrated just considering main effects (Table 1). The follicular size was similar ($P>0.05$) and decreased during the evaluation period in all treatment groups ($P < 0.0001$), with no interaction between day and treatment ($P>0.05$). Therefore, data are represented according to follicular size groups, independent of treatment effect (Figure 1). In the P4 group, two cows did not reach the predetermined follicular sizes (8 to 10 and >10 mm). These animals were not treated and were excluded from the statistical analysis.

4. Discussion

In the present study, the treatment of cows with low endogenous progesterone with estradiol benzoate associated with three progestin protocols at three different moments of follicular wave, before expected deviation (5 to 7 mm), around deviation (8 to 10 mm) or post deviation (>10 mm) and resulted in follicular regression in all treated animals. The atresia of follicles at pre- or post-deviation moment was expected through the suppression of FSH and LH induced by the progestin plus estradiol treatment, since those hormones are essential for follicular development [10,11]. Nevertheless, the low gonadotrophin environment imposed by the treatments should neither be a barrier for a future dominant follicle maintains its steroidogenesis activated nor for its growth during deviation. At such time, free IGF-I follicular fluid is abundant on the larger follicle [17], which has a role of facilitating estradiol production [18]. However, the follicular regression observed in this experiment could be due to a stronger inhibition of FSH release, caused by the cumulative suppressive effect of the estradiol administration to the already FSH baseline levels, expected to be found at this moment, impairing conversion of androgens to estrogens. Ginther et al. [19] demonstrated

that the future dominant follicle requires FSH at the beginning of deviation and that multiple estradiol administrations at this moment delay follicle growth. The estradiol/progestin suppressive effect on LH secretion could be a determinant factor for follicular regression at this moment, but this would imply an action through the theca cell receptors, since there is no evidence of functional LH receptors on granulosa cells until latter on follicle growth [4,7]. Contrarily to this hypothesis, heifers at the expected deviation moment treated with consecutive injections of progesterone underwent the normal deviation process [10], suggesting just a latter involvement of LH on folliculogenesis.

From emergence to ovulation, the factors responsible in maintaining follicular growth change according to the follicular phase (emergence, deviation and final growth), being regulated by separated mechanisms [20]. Therefore, follicular atresia and new wave emergence after administration of the treatments used on this experiment would be expected to occur at different moments, but the only differences observed were that follicles treated with diameter >10 mm reached their maximum size earlier than follicles between 5 and 10 mm, but on the other hand, these stayed longer on the plateau phase and presented no differences on timing to follicular regression or new wave emergence (Table 1).

Estradiol benzoate/progestin treatments are expected to decrease plasma FSH concentration by 12 h, reaching a nadir at 24 h, whereas plasma LH should be at nadir around 72 h, returning to pre-treatment concentration only after vaginal device removal (considering 7 days of progestin treatment) [9]. In this experiment, after expected plasma FSH nadir, follicles between 5 and 10 mm continued to increase in diameter by 24 h, whereas follicles larger than 10 mm stopped just after treatment and only begun regression 80 h latter (3.3 days), less than 24 h after expected plasma LH nadir. This is indicative that just emerged follicles could sustain its development longer despite low plasma FSH, the major gonadotrophin involved at this time rather than larger follicles on restricted LH environment. In spite of statistical similarity between the 5 to 7 and 8 to 10 treatment size groups, follicles

from the 8 to 10 group presented intermediate growth pattern concerning timing to maximum size and plateau period when compared with the other two groups, possible reflecting the change on follicular gonadotrophic dependency from FSH to LH that encompass the deviation process.

Vaginal devices containing MPA have been successfully utilized as part of programs for estrus induction and/or synchronization in cattle, contributing for the attainment of acceptable pregnancies rates on field experiments [15,21] with low costs. By our knowledge, this is the first comparative study using an association of EB injection with vaginal devices containing MPA or P₄, conducted to evaluate its effects on follicular dynamics of cows with low endogenous P₄. Another treatment group was included using EB, MPA vaginal devices and an injection of P₄ to evaluate the cumulative effect of a synthetic progestin associated with progesterone on follicle dynamics. A group receiving EB, P₄ vaginal device associated to P₄ administration were not used since there are no differences on gonadotrophin secretion of ovariectomized cows receiving different doses of P₄ plus estradiol and P₄ vaginal device [22].

Our results from Table 1 demonstrated that even with no differences on maximum size and the timing to reach this size after treatments, the “treated follicles” on MAP+P₄ group stayed longer without showing any size reduction (plateau) and consequently presented later follicular regression when compared with the other two groups. Interestingly, MAP group presented a new wave emergence earlier than MAP+P₄, whereas P₄ was similar to both. This was not expected and difficult to reconcile, but suggests some possibilities regarding the concomitantly administration of MAP, P₄ and EB. Firstly, such association could induce a later suppression of factors responsible for the maintenance of follicular growth (FSH, LH and maybe others still unproven to be influenced by a progestin plus estradiol treatment), being supported by the regression day data (Table 1). Second, an additive effect of progestins to the EB suppression of FSH surge could delay follicle wave emergence, but this alternative seems to be unlikely since progesterone appears not to be able to change FSH secretion

patterns [20]. Last, a direct effect of P₄ injection delaying follicular regression and/or new wave emergence can not be completely ruled out, but this hypothesis still needs to be investigated.

5. Conclusion

The similar follicle growth pattern between cows treated with MPA and P₄ are firstly reported here providing an elucidative knowledge to be added to the already generated data relative to the use of MPA vaginal devices. The treatments associating progestin and estradiol on postpartum beef cows bearing emerged growing follicles induced similar responses on follicular wave dynamics, independent of follicular size. The experiment shows that if this treatment is administrated when follicles are between 8 to 10mm, they will under go to atresia and in the authors hypothesis is due an incapability of the IGF system sustain steroidogenesis under the basal levels of gonadotrophins induced by the association of progestins and estradiol.

6. Acknowledgements

The authors wish to thank CNPq for the financial support and Granja Quatro Irmãos Ltda. for the animal facilities.

7. References

- [1] Bó GA, Adams GP, Caccia M, Martinez M, Pierson RA, Mapletoft RJ. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestagen and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science* 1995;39:193-204.
- [2] Fortune JE, Rivera GM, Yang MY. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science* 2004;82:109–126.
- [3] Knight PG, Glister C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 2006;132:191–206.
- [4] Evans ACO, Fortune JE. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology* 1997;138:2963-2971.
- [5] Spicer LJ, Echternkamp SE. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with emphasis on domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology* 1995;12:223–245.
- [6] Beg M, Ginther OJ. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction* 2006;132:365–377.
- [7] Robert C, Gagne D, Lussier JG, Bousquet D, Barnes FL, Sirard MA. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. *Reproduction* 2003;125:437-446.
- [8] O'Rourke M, Diskin MG, Sreenan LM, Roche JF. The effect of dose and route of oestradiol benzoate administration on plasma concentrations of oestradiol and FSH. *Animal Reproduction Science* 2000;59:1-12.

- [9] Martinez MF, Kastelic JP, Bó GA, Caccia M, Mapletoft RJ. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. *Animal Reproduction Science* 2005;86:37-52.
- [10] Ginther OJ, Bergfelt DR, Beg MA, Kot K. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. *Biology of Reproduction* 2001;64:197-205.
- [11] Ginther OJ, Bergfelt DR, Beg MA, Kot K. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. *Reproduction* 2002;124:475–482.
- [12] Duffy P, Crowe MA, Austin EJ, Mihm M, Boland MP, Roche JF. 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* 2004;61:725-734.
- [13] Kastelic JP, Colazo MG, Small JA, Ward DR, Mapletoft RJ. Ovarian follicular dynamics in cows treated with a cidr, estradiol and progesterone late in the estrous cycle. *Reproduction, Fertility and Development* 2004;16:129-130.
- [14] Bergfelt DR, Lightfoot KC, Adams GP. Ovarian dynamics following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in cyclic heifers. *Theriogenology* 1994;41:161
- [15] Bastos GM, Brenner RH, Willke FW, Neves JP, Oliveira JFC, Bragança JFM, et al. Hormonal induction of ovulation and artificial insemination in suckled beef cows under nutritional stress. *Theriogenology* 2004;62:847-853.
- [16] Ginther OJ, Kastelic JP, Knopf L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Animal Reproduction Science* 1989;20:187-200.
- [17] Beg MA, Bergfelt DR, Kot K, Ginther OJ. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. *Biology of Reproduction* 2002;66:120-126.
- [18] Adashi EY. The IGF family and folliculogenesis. *Journal of Reproductive Immunology* 1998;39:13-19.

- [19] Ginther OJ. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Animal Reproduction Science* 2000;60:61-79.
- [20] Ginther OJ, Beg MA, Donadeu FX, Bergfelt DR. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Animal Reproduction Science* 2003;78:239-257.
- [21] Cavestany D, Cibils J, Freire A, Sastre A, Stevenson JS. Use of medroxyprogesterone acetate (MAP) in lactating Holstein cows within an Ovsynch protocol: follicular growth and hormonal pattern. *Theriogenology* 2003;59:1787-1798.
- [22] Martinez MF, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effects of estradiol and progesterone on plasma steroid and gonadotropin concentration in cidr-treated ovariectomized cows. *Theriogenology* 2003;59:224.

Table 1

After treatment, maximum diameter (mm±s.e.m) of larger follicle and timing (days±s.e.m) to reach maximum follicular size, to begin follicular regression, new wave emergence and days at plateau of cows with low (<1ng ml⁻¹) or high (>1ng ml⁻¹) endogenous P₄, at pre-deviation (5-7mm), deviation (8-10mm) or post-deviation (>10mm) expected moment, receiving estradiol benzoate associated to one of the following progestin treatments, P₄ vaginal device, MPA vaginal device or MPA vaginal device plus P₄ IM injection.

Main effect	Max. Size	Days to max	Plateau	Reg. Day	New wave
Treatment					
MAP	9.2±0.25 ^a	1.5±0.29 ^a	1.9±0.45 ^a	3.4±0.26 ^a	4.1±0.23 ^a
P ₄	9.4±0.27 ^a	1.8±0.39 ^a	1.8±0.29 ^a	3.6±0.43 ^a	4.9±0.35 ^{ab}
MAP+P ₄	9.2±0.25 ^a	1.3±0.35 ^a	3.3±0.35 ^b	4.5±0.23 ^b	5.3±0.33 ^b
Size					
5-7	7.5±0.25 ^x	2.3±0.30 ^x	1.7±0.26 ^x	3.9±0.36 ^x	4.8±0.35 ^x
8-10	9.3±0.26 ^x	1.6±0.28 ^x	2.2±0.33 ^x	3.7±0.24 ^x	4.7±0.37 ^x
>10	11.0±0.26 ^x	0.6±0.24 ^y	3.3±0.52 ^y	3.9±0.39 ^x	5.0±0.33 ^x
Endogen progesterone					
Low	9.4±0.31 ^p	1.6±0.21 ^p	2.5±0.26 ^p	4.1±0.18 ^p	4.9±0.22 ^p
High	8.6±0.65 ^p	1.1±0.46 ^p	1.9±0.59 ^p	3.0±0.49 ^q	4.6±0.43 ^p

a,b Different letters in same column indicated statistical difference within treatment groups (P<0.05)

x,y Different letters in same column indicated statistical difference within follicular size groups (P<0.05)

p,q Different letters in same column indicated statistical difference between cows with low (<1ng ml⁻¹) or high (>1ng ml⁻¹) P₄ concentration at treatment moment (P<0.05)

Max. size: maximum diameter reached by the larger follicle after treatment

Days to max: the period from treatment to maximum size

Plateau: days after maximum size when this follicle does not change its diameter

Reg. day: first day of progressive decrease in diameter of the larger follicle

New wave: day when at least one growing follicle reached diameter ≥5mm

P₄: natural progesterone

MPA: medroxi-progesterone acetate

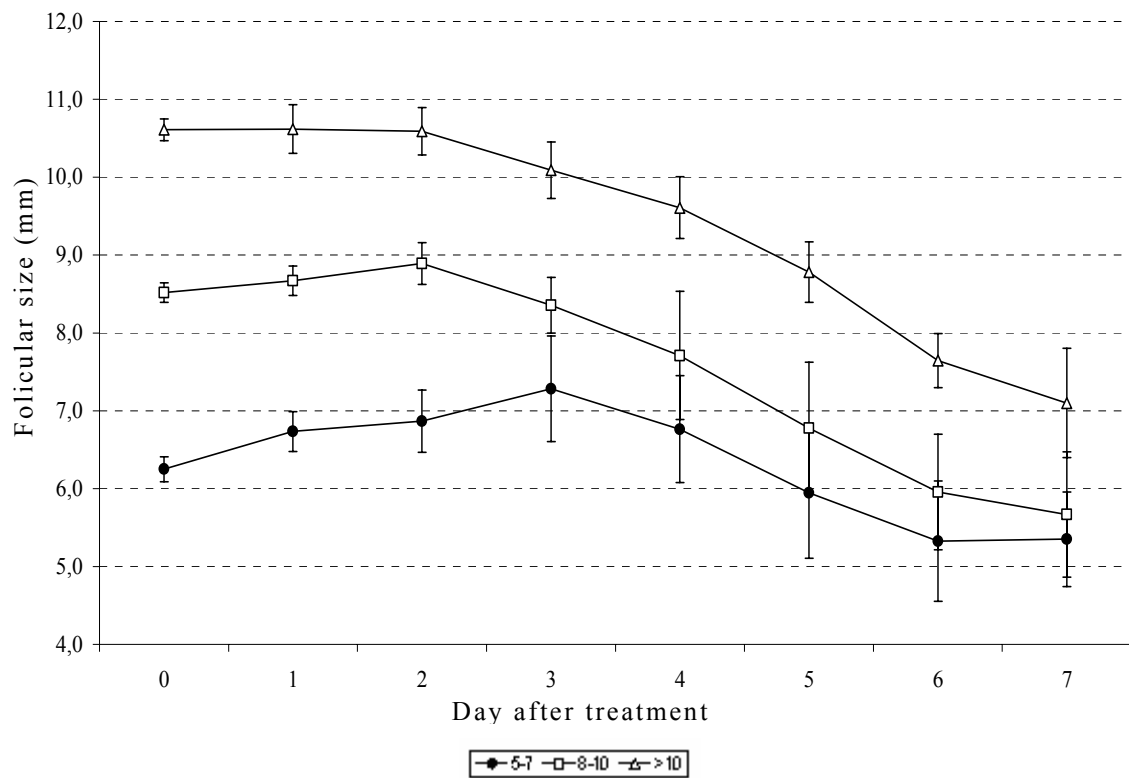


Fig. 1. Follicular dynamics of cows treated at 5-7mm, 8-10mm or >10mm expected moment receiving estradiol benzoate associated to progestin treatments. The follicular dynamics were not different among the three treatments when the initial follicular size effect was removed from the statistical analysis.

4. CAPÍTULO 2

TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

SISTEMAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM DOIS DIAS OU EM TEMPO FIXO PARA VACAS AMAMENTANDO

**Lucas Carvalho Siqueira, João Francisco Coelho de Oliveira, Rosane da
Silveira Loguércio, Henrique Kurtz Lof, Paulo Bayard Dias Gonçalves.**

Ciência Rural, 2007

**SISTEMAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM DOIS DIAS OU EM TEMPO
FIXO PARA VACAS AMAMENTANDO**

**ARTIFICIAL INSEMINATION SYSTEMS WITHIN TWO DAYS OR AT FIXED
TIME FOR SUCKLED COWS**

Lucas Carvalho Siqueira^I, João Francisco Coelho de Oliveira^{II}, Rosane da Silveira
Loguécio^I, Henrique Kurtz Lof^{III}, Paulo Bayard Dias Gonçalves^{IV}.

RESUMO

O objetivo do presente experimento foi comparar dois protocolos de indução de estro para vacas no período pós-parto, utilizando hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e inseminação artificial (IA) em dois dias ou benzoato de estradiol (BE) e inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Foram utilizadas 250 vacas amamentado (50-70 dias pós-parto), *Bos taurus*, predominante Red Angus, em condição corporal 3 (sendo 1-extremamente magra e 5-extremamente gorda). Esses animais receberam um pessário vaginal, contendo 250mg de acetato de medroxi-progesterona (MAP) e uma injeção intramuscular (IM) de 5mg de BE no dia 0 (início do tratamento). O pessário vaginal permaneceu por sete dias. No dia 6, foram aplicadas 400UI de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) por via IM e 5mg de Dinoprost na submucosa vulvar, realizando nesse momento o início do desmame por 96h. Após a retirada dos pessários (dia 7), as vacas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos. No grupo BioRep (n=150), as fêmeas foram observadas duas vezes por dia para detecção de estro por

^I Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) Santa Maria – RS, Brasil.

^{II} Departamento de Grandes Animais. UFSM, Santa Maria – RS, Brasil.

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

^{IV} Departamento de Grandes Animais, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: bayard@biorep.ufsm.br. Autor para correspondência.

48h e inseminadas 12h após sua manifestação. Os animais que não manifestaram estro nesse período receberam uma injeção IM de 100µg de GnRH, sendo inseminadas em tempo fixo (IATF), nas 16 a 18h seguintes. No grupo BE (n=100), as vacas receberam uma injeção de 1mg de BE IM no dia 8 (24h após a retirada do MAP) e foram inseminadas em tempo fixo no dia 9 (54h após a retirada do MAP). O diagnóstico de gestação foi realizado por exame ultrassonográfico 40 dias após IA. A análise estatística foi realizada pelo teste Qui-Quadrado. A percentagem de prenhez no grupo BioRep (54,7%) foi maior ($p<0,01$) do que no grupo BE (33,3%). A fim de obter taxas de prenhez superiores, os protocolos de indução de estro de eleição para o período pós-parto em vacas de corte *Bos taurus*, poderão empregar observação de estro por dois dias e utilização de GnRH para a indução da ovulação ao contrário de BE associado à IATF.

Palavras-chave: pós-parto; IATF; indução de estro; GnRH; estradiol.

ABSTRACT

This experiment was designed to compare two estrus induction protocols for cows in postpartum period, using either GnRH and two-day artificial insemination (AI) or estradiol benzoate (EB) and fixed-time artificial insemination (TAI). A total of 250 suckled beef cows (50-70 days post partum), *Bos taurus*, with a body condition score of 3 (Extremely thin cows were assigned a score of 1 and extremely fat cows, a score of 5) received a vaginal device containing 250mg of medroxyprogesterone acetate (MPA) and an injection of 5mg of EB intramuscularly (IM) on day 0. The vaginal device was removed on day 7. On day 6, cows were injected with 400IU eCG (IM) and 5mg Dinoprost (into vulvar submucosa) and calves were removed for 96 hours (h). After removing the vaginal devices (day 7), cows were divided in two groups. In the BioRep group (n=150), estrus detection was carried out twice a day during 48h and the animals were inseminated 12h after detection. Cows which were not

detected in estrus received 100µg of GnRH im and were inseminated 16 to 18h later. In EB group, cows were injected im with 1mg of EB on day 8 (24h after removing MPA) and were inseminated on day 9 without estrus detection (54h after removing MPA). The diagnosis of pregnancy was performed 40 days after AI by ultrasonography. The data were analyzed by the Chi-square test. The pregnancy rate was higher ($p<0.01$) in the BioRep group (54.7%) than in the EB group (33.3%). In order to attain higher pregnancy rates, the estrus induction protocols for post partum *Bos taurus* beef cows should use two-day AI and GnRH to induce ovulation instead of EB with TAI.

Key words: Postpartum; insemination; Estrous induction; GnRH; estradiol.

INTRODUÇÃO

Os protocolos hormonais, aplicados em vacas no pós-parto, possibilitam que a maior parte do rebanho retorne a ciclicidade e emprenhe em um período reduzido de tempo (BARUSELLI et al., 2004). Para isto, os programas de indução e sincronização de estros são ferramentas que precisam apresentar repetibilidade e ser minimamente dependentes do ambiente. Isto possibilitaria que “elevadas” taxas de prenhez (número de vacas prenhes/número de vacas sincronizadas) sejam obtidas em diferentes locais e situações. Quanto menor a necessidade de observação de estro, mais atrativos tornar-se-ão os programas de inseminação artificial (IA). Tem sido proposto que a IA em tempo fixo (IATF) é uma opção de manejo capaz de eliminar a necessidade de detecção de estros, produzindo resultados iguais ou até superiores a IA convencional (detecção de estros e IA a cada 12h; DISKIN et al., 2002; MAPLETOFT et al., 2002).

O controle preciso do momento da ovulação é fundamental para a IATF. Em bovinos, os indutores da ovulação mais utilizados são o benzoato de estradiol (BE) e o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Quando o BE é aplicado 24h após a retirada do

dispositivo com progestágenos, todos os animais devem ser inseminados 30h a partir desta administração (LAMMOGLIA et al., 1998; BURKE et al., 2001; MARTINEZ et al., 2002a; COLAZO et al., 2004; MARTINEZ et al., 2004). O GnRH deve ser aplicado entre 36-48h após a retirada dos dispositivos com progestágenos e a IA deverá ser realizada 12-18 h após o GnRH (TWAGIRAMUNGU et al., 1995; PURSLEY et al., 1995; STEVENSON et al., 2000; MARTINEZ et al., 2002b; AMBROSE et al., 2005; COLAZO et al., 2006). Vacas de corte em pós-parto são tratadas com BE no intuito de induzir estro e ovulação. O tratamento com este estrógeno promove a liberação de um pico de LH, dentro de um intervalo de 16 a 30h (LAMMOGLIA et al., 1998). A administração de GnRH induz um pico de LH que se inicia logo após sua aplicação (em torno de 15 minutos).

Em vacas de corte amamentando, os programas que utilizam exclusivamente a IATF, independentemente do indutor da ovulação utilizado, apresentam taxas de prenhez que oscilam 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., 2002a,b; BARUSELLI et al., 2004; KASIMANICKAM et al., 2006). Estes resultados variam de acordo com a porcentagem de animais acíclicos no rebanho, as condições ambientais e nutricionais em que estes animais estão e também, com a associação hormonal utilizada. Devido a esta grande amplitude dos resultados, os manejos alternativos que possibilitam a IA em vacas de corte no pós-parto têm sido estudados.

Alguns programas para indução de estros permitem que todos os animais sejam inseminadas em um curto período de tempo, associando à IA convencional a IATF, obtendo elevadas taxas de prenhez (BASTOS et al., 2004; LOGUÉRCIO et al., 2006). Utilizando este manejo, mais de 3.000 vacas de corte amamentando, aproximadamente aos 60 dias pós-parto, já foram inseminadas e os resultados médios estão próximos a 70% de prenhez. Aproximadamente, 50% das fêmeas foram detectadas em estro nas 48h após a retirada dos pessários vaginais com progestágenos, e destas entre 70 e 90% emprenharam. As vacas que

não foram detectadas em estro neste período, receberam GnRH e foram submetidas à IATF. Esta inseminação sem observação de sinais de estro apresentou uma taxa de concepção (TC; número de vacas prenhes/número de vacas IA) média de 50%. Sendo assim, este sistema para vacas amamentado propicia que mais de 2/3 das vacas emprenhem em apenas uma IA, necessitando-se apenas 4 manejos de observação de estro.

Tendo em vista esses resultados de prenhez e visando a possibilidade de eliminar a necessidade de detecção de estros, este experimento foi delineado para investigar se a realização exclusiva da IATF, utilizando como indutor da ovulação o BE, poderá proporcionar taxas de prenhez semelhantes a uma associação de IA convencional e IATF com GnRH, em vacas de corte no pós-parto, amamentando em condição corporal 3 (CC; sendo 1-extremamente magra e 5-extremamente gorda).

MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi realizado no mês de janeiro de 2005, em uma propriedade localizada no município de Rio Grande, região sul do Estado do Rio Grande do Sul. Esta região apresenta clima subtropical com temperatura média anual de 17.6°C e índices pluviométricos acumulados para o período de novembro à fevereiro de 450mm (EMBRAPA, 2006). Foram utilizadas 250 vacas *Bos taurus*, predominante Red Angus, amamentado, entre 50 e 70 dias pós-parto, todas apresentando CC 3.

No início do tratamento (dia 0), todas as vacas receberam um pessário vaginal, contendo 250mg de acetato de medroxi-progesterona (MAP) e uma injeção intramuscular (IM) de 5mg de BE. No dia 6, foram aplicadas 400UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) por via IM e 100µg de dinoprost na submucosa vulvar. Também no dia 6, os terneiros foram submetidos a um desmame temporário em mangueira, por 96h. Após a retirada dos

peçários (dia 7), as vacas foram aleatoriamente distribuídas em dois grupos. No grupo BioRep (n=150), as fêmeas foram observadas para detecção de estro duas vezes por dia (manhã/tarde) por 2 dias, sendo submetidas à inseminação artificial 12h após a detecção. No dia 9 (48h depois da retirada do peçário), todas as vacas que não foram diagnosticadas em estro nesse período receberam uma injeção IM de 100µg GnRH e entre 16 e 18h após, foram inseminadas artificialmente em tempo fixo (IATF). No grupo BE (n=100), todas as vacas receberam uma injeção de 1mg de BE IM no dia 8 (24h após a retirada do MAP) e foram inseminadas em tempo fixo no dia 9 (54h após a retirada do MAP) sem a observação prévia de sinais de estro.

O diagnóstico de gestação foi realizado no dia 50 do experimento, por exame ultrassonográfico transretal, utilizando um aparelho pie-medical 450, equipado com sonda de arranjo linear de 5MHz. As taxas de concepção e prenhez foram comparadas pelo teste qui-quadrado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de prenhez (vacas prenhes/ vacas tratadas) obtida no grupo BioRep, no qual se associou um curto período de observação de estros à IATF, foi maior do que no grupo BE, onde utilizou-se exclusivamente a IATF (54,7% x 33,3%, respectivamente; $p < 0,001$). Estes resultados de prenhez após protocolos de indução de estro estão dentro da amplitude de variação encontrada na literatura para vacas em pós-parto (FIKE et al., 1997; STEVENSON et al., 2000; FERNANDES et al., 2001; GEARY et al., 2001; BARUSELLI et al., 2002; MARTINEZ et al., 2002 a,b; BARUSELLI et al., 2004; BASTOS et al., 2004; KASIMANICKAM et al., 2006; LOGUÉRCIO et al., 2006). No entanto, enquanto taxas de prenhez em torno de 50% podem ser consideradas razoáveis, resultados inferiores a isso são

insatisfatórios, pois não justificam os custos de manejo e implementação destes programas hormonais.

No grupo BioRep, até 48h após a retirada do pessário vaginal, 48,7% das vacas foram diagnosticadas em estro e submetidas a IA convencional (12h após detecção), e destas 69,9% conceberam (Tabela 1). Vacas inseminadas, após demonstração de estro, podem apresentar variações de 50 a 90% na TC. Esta variação está normalmente correlacionada com perdas embrionárias precoces, as quais variam entre 20 a 60% até o trigésimo dia após IA (HUMBLOT et al., 2001; SANTOS et al., 2004). Porém, outros fatores podem influenciar a concepção, como por exemplo, a qualidade do sêmen utilizado e a experiência e competência do inseminador. Neste experimento, a TC nas vacas IA após o estro sugere que o processo de IA foi adequadamente realizado.

Ao contrário do que se nota em vacas de leite, os sistemas para IATF que utilizam o GnRH como indutor da ovulação, ainda não estão adequados para serem utilizados em vacas de corte amamentando, pois produzem resultados variados e normalmente com baixas taxas de prenhez (STEVENSON et al., 2000; FERNANDES et al., 2001; BARUSELLI et al., 2002). Neste experimento, dentre as vacas que não foram detectadas em estro no grupo BioRep e foram inseminadas 15-18h após administração de GnRH, 40,6% engravidaram (Tabela 1). Esta taxa de prenhez se isoladamente analisada é relativamente baixa. Porém, dentro deste sistema onde se realiza um curto período de detecção de estros anteriormente ao uso do GnRH, a IATF torna-se uma ferramenta importante. Neste caso, ela reduz a necessidade de manejo para detecção de estros, e ainda é capaz de proporcionar uma prenhez aceitável ao final do tratamento.

Esperava-se que em resposta ao GnRH uma maior TC fosse atingida, por este hormônio induzir a ovulação de forma mais concentrada nos animais (LAMMOGLIA et al., 1998). No entanto, considerando-se somente a IATF não houve diferença entre os grupos (Tabela 1). Provavelmente, estas baixas TC proporcionadas pela IATF estão relacionadas com

a incapacidade do maior folículo iniciar o processo de ovulação. Em bovinos, a ovulação é desencadeada pelo pico pré-ovulatório de LH e em raças européias (*Bos taurus*), os folículos ovarianos adquirem maior capacidade ovulatória a partir dos 12mm de diâmetro (SARTORI et al., 2001). Sendo assim, a assincronia do crescimento folicular e o tamanho reduzido do folículo dominante no momento do pico de LH são os maiores desafios a serem superados a fim de possibilitar elevadas taxas de ovulação e prenhez nos processos de IATF.

É importante salientar que quando se utiliza exclusivamente a IATF, a TC normalmente fica perto do limiar aceitável de 50%. No entanto, quando IATF é associada a um período de 48h de detecção de estro e IA convencional, espera-se que ocorra um aumento acima de 20% de prenhez final em relação aos sistemas que utilizam somente IATF. Neste experimento, provavelmente em decorrências de fatores ambientais e nutricionais, os índices obtidos ficaram aquém do esperado. Durante a realização deste experimento, o RS passava por um período de chuvas escassas, onde a precipitação pluviométrica esperada para o período de novembro de 2004 a fevereiro de 2005 era de aproximadamente 450mm e havia chovido menos 80mm (EMBRAPA, 2006). O estresse nutricional e balanço energético negativo crônico são fatores que afetam negativamente o desempenho reprodutivo dos bovinos e programas de manipulação do ciclo estral aplicados durante estes períodos podem apresentar resultados insatisfatórios (MACIEL et al., 2001; BASTOS et al., 2004). Apesar da redução na TP em relação ao esperado, o grupo BioRep permitiu que mais da metade das vacas tratadas engravidassem, mesmo frente a condições adversas. Já no grupo BE apenas 1/3 das fêmeas conceberam. Este resultado demonstra que a utilização exclusiva da IATF pode propiciar resultados desapontadores, tornando assim o processo pouco confiável. No entanto, se associada a um curto período de detecção de estros, a IATF parece ser uma alternativa viável de manejo reprodutivo para vacas de corte amamentando.

CONCLUSÃO

Em vacas de corte no pós-parto, amamentando em condição corporal 3, a utilização exclusiva da IATF com BE não foi capaz de equiparar os resultados obtidos com a associação de um período de detecção de estros previamente à IATF com indução da ovulação pela aplicação de GnRH. Sendo assim, a fim de obter melhores taxas de prenhez, os protocolos de indução de estro de eleição para o período pós-parto poderão empregar a observação de estro por dois dias e a utilização de IATF com GnRH ao contrário do uso de BE associado exclusivamente à IATF.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo suporte financeiro e a Granja Quatro Irmão Ltda. pelo uso dos animais.

REFERÊNCIAS

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

BURKE, C.R. et al. Effects of maturity of the potential ovulatory follicle on induction of oestrus and ovulation in cattle with oestradiol benzoate. **Animal Reproduction Science**, v.66, p.161–174, 2001.

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.

COLAZO, M.G. et al. Effects of plasma progesterone concentrations on LH release and ovulation in beef cattle given GnRH. **Domestic Animal Endocrinology**, no prelo, 2006.

DISKIN, M.G. et al. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.211–228, 2002.

EMBRAPA. Unidade de Apoio, Pesquisa e Desenvolvimento de Instrumentação Agropecuária. Campinas, 2000. Disponível em: <<http://www.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 5 jun. 2006.

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

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.

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.

HUMBLOT, P. et al. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. **Theriogenology**, v.56, p.1417-1433, 2001.

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.

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. et al. Effect of equine chorionic gonadotrophin on follicular dynamics and ovulatory capacity for fixed-time insemination and estrus resynchronization in postpartum beef cows (Trabalho submetido para publicação - Animal Reproduction Science). **Animal Reproduction Science**, 2006.

MACIEL, M.N. et al. Efeito da somatotrofina bovina (bST-r), do implante de progestágeno e do desmame por 72 horas na indução do estro e na taxa de prenhez em vacas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, p.666-670, 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.

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.

PURSLEY, J.R. et al. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂ α and GnRH. **Theriogenology**, v.44, p.915–923, 1995.

SANTOS, J.E.P. et al. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.513–535, 2004.

SARTORI, R. et al. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v.65, p.1403–1409, 2001.

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

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.

Tabela 1 - Percentagens de estro, concepção e prenhez em vacas de corte no pós-parto, submetidas somente a IATF, utilizando como indutor da ovulação o benzoato de estradiol (grupo BE) ou a 48h de observação de estro e inseminação convencional associada à IATF com GnRH (grupo BioRep).

Parâmetros	Grupo	
	BE*	BioRep
Estro (48 horas)¹	-	73/150 (48,7)
Concepção²		
Com Observação de estro (48 horas)	-	51/73 (69,9)
IATF	33/99 (33,3) ^a	31/77 (40,6) ^a
Prenhez³	33/99 (33,3)^a	82/150 (54,7)^b

* no diagnóstico de prenhez uma vaca não foi encontrada, sendo excluída da análise estatística

^{a, b} letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (<0,001)

¹ animais que foram detectados em estro no período de 48h no grupo BioRep

² n° de vacas prenhes ao diagnóstico de gestação/ n° de vacas inseminadas

³ n° de vacas prenhes ao diagnóstico de gestação/ n° de vacas sincronizadas

5. DISCUSSÃO

Em vacas no pós-parto, as falhas da associação de progestágenos e BE em induzir a atresia dos folículos maiores que 5mm de diâmetro ocorrem independentemente da fase do crescimento folicular no momento da administração do tratamento. Este achado contraria a primeira hipótese científica apresentada nesta dissertação, a qual sugeria que folículos que estivessem passando pelo processo de divergência folicular não seriam “sensíveis” ao tratamento, por apresentarem baixa dependência às gonadotrofinas endócrinas (GINTHER et al., 2001; RHODES et al., 2001; GINTHER et al., 2002b; BEG et al., 2002, 2003; HENDRIKSEN et al., 2003). Essa resposta, apesar de ser negativa em relação à pergunta científica do trabalho, é favorável ao uso das associações hormonais utilizadas, pois reforça os argumentos quanto à funcionalidade do tratamento em vacas pós-parto. Onde, pelo menos nesta categoria, as falhas das vacas apresentarem regressão folicular após serem tratadas são devido a variações individuais e/ou administrações hormonais de forma inadequada.

O mecanismo pelo qual esta associação de esteróides causa a atresia dos folículos que estão passando pela fase de divergência folicular ainda necessita ser elucidado. Neste trabalho, não foram analisadas as alterações hormonais endócrinas e intrafoliculares que estas vacas apresentaram durante o experimento. No entanto, Burke et al. (2005) demonstraram que o tratamento com BE em vacas que apresentam um corpo lúteo funcional e folículo dominante causa a atresia deste último e redução dos níveis plasmáticos de gonadotrofinas. Também, ocorrem alterações no ambiente intrafolicular até às 24h após o tratamento, provocando um acúmulo de andrógenos e diminuição da concentração de estrógeno e da expressão de RNA mensageiro da enzima aromatase. Esta enzima converte andrógenos em estrógenos e sua expressão nas CG parece ser regulada pelo FSH (ARMSTRONG et al., 1996; MAZERBOURG et al, 2001; OTSUKA et al., 2005). Se essas modificações forem semelhantes durante o período de divergência folicular, pode-se inferir que a regressão folicular observada em nosso trabalho ocorre devido à redução da capacidade estrogênica do maior folículo, induzida pela diminuição das gonadotrofinas e conseqüentemente da atividade da enzima aromatase.

Pelo conhecimento dos autores, a ação do MAP associado ao BE no crescimento de folículos emergidos em vacas no pós-parto ainda não havia sido adequadamente caracterizada, nem comparada a de outros tratamentos com progesterona. Ficou evidenciado que esses animais apresentam o mesmo comportamento na dinâmica folicular quando tratados com BE associado aos pessários vaginais contendo este progestágeno sintético ou a

progesterona natural. Estes resultados além de validar os achados dos experimentos de campo que utilizam o MAP e BE e avaliam os índices de prenhez (MACIEL et al., 2001a; CAVESTANY et al., 2003; BASTOS et al., 2004; LOGUÉRCIO et al., 2006a), fornecem informações a serem consideradas em protocolos de indução e sincronização de estros. Ainda, os resultados qualificam este dispositivo hormonal para ser avaliado em programas de superovulação e transferência de embriões.

Os resultados médios obtidos por nosso laboratório com o Programa BioRep para inseminação de vacas amamentando têm proporcionado resultados consistentes de prenhez. Até o presente momento, a percentagem de prenhez com uma única inseminação, em mais de 3.000 vacas, está em aproximadamente 65%, variando entre 54,7 e 85%. Os resultados demonstrados na presente dissertação são responsáveis pelos índices mínimos acima citados. Salienta-se que este experimento foi conduzido sob condições climáticas e nutricionais desfavoráveis. No entanto, mesmo sob tais circunstâncias, IA convencional realizada por um período de 48h associada à IATF, utilizando o GnRH como indutor da ovulação, proporcionou taxas de prenhez superiores aquelas obtidas com a utilização exclusiva de IATF com BE.

A realização deste período de detecção de estro que antecede a IATF além de reduzir custos, pois aproximadamente 50% das vacas não necessitam receber o GnRH, permite uma elevada taxa de concepção nestes animais inseminados após a detecção de estro. No entanto, ressalta-se que os achados reportados na presente dissertação foram obtidos utilizando-se, como modelo experimental, vacas multíparas de raças taurinas amamentando. Para a interpretação e transposição dos resultados, sugere-se que as diferenças fisiológicas e de manejo devam ser consideradas, especialmente para raças zebuínas (para revisão: BÓ et al., 2003).

6. CONCLUSÕES

1) Em bovinos, pessários vaginais contendo acetato da medroxi-progesterona ou progesterona natural associados ao benzoato de estradiol induzem a regressão folicular independente do tamanho do folículo, mesmo durante a divergência folicular;

2) A associação de 48h de observação de estros à administração de GnRH e IATF proporciona taxas de prenhez superiores às obtidas utilizando-se BE aliado exclusivamente a IATF.

7. REFERÊNCIAS

ACOSTA, T.J. et al. Evidence for a local endothelin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system in bovine mature follicles in vitro: effects on steroid hormones and prostaglandin secretion. **Biology of Reproduction**, v.61, n.6, p.1419-1425, 1999.

ACOSTA, T.J. et al. Periovulatory changes in the local release of vasoactive peptides, prostaglandin f2alpha, and steroid hormones from bovine mature follicles in vivo. **Biology of Reproduction**, v.63, n.5, p.1253-1261, 2000.

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.

ADASHI, E.Y. The IGF family and folliculogenesis. **Journal of Reproductive Immunology**, v.39, p.13-19, 1998.

AHMAD, N. et al. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cow. **Biology of Reproduction**, v.52, p.1129-1135, 1995.

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

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.

ANDERSON, L.H. et al. Progestin-induced puberty and secretion of luteinizing hormone in heifers. **Biology of Reproduction**, v.54, p.1025-1031, 1996.

ARMSTRONG, D.T. et al. Differential effects of insulin-like growth factor-I and follicle-stimulating hormone on proliferation and differentiation of bovine cumulus cells and granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v.54, p.331-338, 1996.

BADINGA, L. et al. Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 47, p.871-883, 1992.

BAO, B. et al. Expression of messenger RNA encoding 3β -hydroxysteroid dehydrogenase ($\Delta 5$ - $\Delta 4$ isomerase) during recruitment and selection of bovine ovarian follicles: identification of dominant follicles by expression of 3β -HSD mRNA within the granulosa cell layer. **Biology of Reproduction**, v.56, p.1466-1473, 1997a.

BAO, B. et al. Changes in messenger RNA encoding LH receptor, cytochrome P450 side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, v.56, p.1158-1168, 1997b.

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. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.479-486, 2004.

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.

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.

BEG, M.A. et al. Role of oestradiol in growth of follicles and follicle deviation in heifers. **Reproduction**, v.125, p.847-854, 2003.

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

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

BERISHA, B. et al. The expression of angiotensin and endothelin system members in bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. **Endocrine**, v.19, p.305-312, 2002.

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

BJORBAEK, C. et al. Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. **Endocrinology**, v. 139, p.3485–3491, 1998.

BÓ, G.A. et al. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. **Theriogenology**, v.40, p.225–239, 1993.

BÓ, G.A. et al. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v.41, p.1555–1569, 1994.

BÓ, G.A. et al. Local versus systemic effects of exogenous estradiol-17 β on ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen implants. **Animal Reproduction Science**, v.59, p.141–157, 2000.

BÓ, G.A. et al. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestagen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.39, n.3, p.193–204, 1995.

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.

BOELHAUVE, M. et al. Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro produced blastocysts. **Biology of Reproduction**, v.73 p.737–744, 2005.

BROWNING Jr., R. et al. Effects of postpartum nutrition and once-daily suckling on reproductive efficiency and preweaning calf performance in fall-calving brahman (*Bos indicus*) cows. **Journal of Animal Science**, v.72, p.984–989, 1994.

BRUNSWIG-SPICKENHEIER, B. & MUKHOPADHYAY, A.K. Characterization of angiotensin-II receptor subtype on bovine thecal cells and its regulation by luteinizing hormone. **Endocrinology**, v.131, n.3, p.1445–1452, 1992.

BUFORD, W.I. et al. Embryo toxicity of a regressing corpus luteum in beef cows supplemented with progestogen. **Biology of Reproduction**, v.54, p.531–357, 1996.

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.

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.

BURKE, C.R. et al. Effects of maturity of the potential ovulatory follicle on induction of oestrus and ovulation in cattle with oestradiol benzoate. **Animal Reproduction Science**, v.66, p.161–174, 2001.

BURKE, C.R. et al. Estradiol benzoate delays new follicular wave emergence in a dose-dependent manner after ablation of the dominant ovarian follicle in cattle. **Theriogenology**, v.60, p.647–658, 2003.

BURKE, C.R. et al. Histological and steroidogenic changes in dominant ovarian follicles during oestradiol-induced atresia in heifers. **Reproduction**, v.129, p.611–620, 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. et al. 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.

CAVESTANY, D. et al. Use of medroxyprogesterone acetate (MAP) in lactating Holstein cows within an Ovsynch protocol: follicular growth and hormonal pattern. **Theriogenology**, v.59, p.1787-1798, 2003.

CHAPPELL, P.E.; LEVINE, J.E. Stimulation of gonadotropin-releasing hormone surges by estrogen. I. Role of hypothalamic progesterone receptors. **Endocrinology**, v.141, p.1477–1485, 2000.

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.

CLARKSON, J.; HERBISON, A.E. Development of GABA and glutamate signaling at the GnRH neuron in relation to puberty. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.254–255, p.32–38, 2006.

COLAZO, M.G. et al. Effects of plasma progesterone concentrations on LH release and ovulation in beef cattle given GnRH. **Domestic Animal Endocrinology**, no prelo, 2006.

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.

CONNOR et al. Effect of dietary energy, body condition and calf removal on pituitary gonadotropins, gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and hypothalamic opioids in beef cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v.7,p.403-411,1990.

CRAIG, J. et al. Leptin enhances oocyte nuclear and cytoplasmic maturation via the mitogen-activated protein kinase pathway. **Endocrinology**, v.145, p.5355-5363, 2004.

DAY, M.L. et al. Endocrine mechanisms of puberty in heifers: role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. **Biology of Reproduction**, v.37, p.1054–1065, 1987.

de la SOTA, R.L. et al. Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. **Biology of Reproduction**, v.55, p.803–812, 1996.

DISKIN, M.G. et al. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.211–228, 2002.

DUFFY, P. et al. Effect of exogenous LH pulses on the fate of the first dominant follicle in postpartum beef cows nursing calves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.118, p.9–17, 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, n.4, p.725-734, 2004.

EMBRAPA. Unidade de Apoio, Pesquisa e Desenvolvimento de Instrumentação Agropecuária. Campinas, 2000. Disponível em: <<http://www.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 5 jun. 2006.

EVANS, A.C.O.; FORTUNE J.E. Selection of the dominant follicle occurs in the absence of the differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. **Endocrinology**, v.138, p.2963–2971, 1997.

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 on early mechanism of bovine ovulation via AT2 receptor subtype. **39th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction**, Abstract 275, 2006.

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.

FORREST, D.W. et al. Effect of exogenous prolactin on peripheral luteinizing hormone levels in ovariectomized cow. **Biology of Reproduction**, v.22, p.197-201, 1980.

FORTUNE, J.E. Ovarian Follicular Growth and Development in Mammals. **Endocrinology**, v.50, p.225-232, 1994.

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.

FUNSTON, R.N. Insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding proteins in bovine serum and follicular fluid before and after the preovulatory surge of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1390-1396, 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.

GARCIA-WINDER, M. et al. Effect of suckling and ovariectomy on the control of luteinizing hormone secretion during the postpartum period in beef cows. **Biology of Reproduction**, v.31, p.771-778, 1984.

GAZAL, O.S. et al. Gonadotropin-releasing hormone secretion into third-ventricle cerebrospinal fluid of cattle: surge release of luteinizing hormone and its tonic inhibition by suckling and neuropeptide Y. **Biology of Reproduction**, v.59, p.676-678, 1998.

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.

GIBBONS, J.R.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. **Biology of Reproduction**, v.57, p. 1066-1073, 1997.

GINTHER, O.J. et al Associated and independent comparisons between the two largest follicles preceding follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction**, v.68, p.524-529, 2003.

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. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1187-1194, 1996.

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.

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

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.

GLISTER, C. et al. Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v.65, p.1020–1028, 2001.

GLISTER, C. et al. Oocyte-mediated suppression of follicle-stimulating hormone- and insulin-like growth factor-induced secretion of steroids and inhibin-related proteins by bovine granulosa cells in vitro: possible role of transforming growth factor α . **Biology of Reproduction**, v.68, p.758–765, 2003.

GLORIOSO, N. et al. Progesterone in high concentrations in human ovarian follicular fluid. **Science**, v. 233, p.1422-1424, 1986.

GRUMMER, R. R. et al. Estrogen induction of fatty liver in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.1537–1543, 1990.

HARRIS, T.G. et al. Gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid expression changes before the onset of the estradiol-induced luteinizing hormone surge in the ewe. **Endocrinology**, v.139, p.57–64, 1998.

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.

HINSHELWOOD, M.M. et al. Effect of suckling on the hypothalamic-pituitary axis in postpartum beef cows, independent of ovarian secretions. **Biology of Reproduction**, v.32, p.290-300, 1985.

HONARAMOOZ, A. et al. Opioidergic, dopaminergic and adrenergic regulation of LH secretion in prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.119, p.207–215, 2000.

HRABOVŠZKY, E. et al. Detection of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid and 125I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. **Endocrinology**, v.141, p.3506–3509, 2000.

HUMBLOT, P. et al. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. **Theriogenology**, v.56, p.1417-1433, 2001.

I'ANSON, H. et al. Regional differences in the distribution of gonadotropin-releasing hormone cells between rapidly growing and growth-restricted prepubertal female sheep. **Endocrinology**, v.38, p.230–236, 1997.

INGVARTSEN, K. L.; ANDERSEN, J. B. Integration of metabolism and intake regulation: A review focusing on periparturient animals. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1573–1597, 2000.

KANEKO, H. et al. Perturbation of Estradiol-Feedback Control of Luteinizing Hormone Secretion by Immunoneutralization Induces Development of Follicular Cysts in Cattle. **Biology of Reproduction**, v.67, p.1840–1845, 2002.

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. et al. Ovarian follicular dynamics in cows treated with a cidr, estradiol and progesterone late in the estrous cycle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.129-130, 2004.

KEISLER, D.H.; LUCY, M.C. Perception and interpretation of the effects of undernutrition on reproduction. **Journal of Animal Science**, v.74, n.3, p.1–17, 1996.

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.

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

KNIGHT, P.G.; GLISTER, C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v.132, p.191–206, 2006.

KRIEGSFELD, L.J. et al. Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. **PNAS**, v.103, p.2410-2415, 2006.

LAMB, G.C. et al. Twice daily suckling but not milking with calf presence prolongs postpartum anovulation. **Journal of Animal Science**, v.77, p.2207-2218, 1999.

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 F 2α . **Journal of Animal Science**, v.76, p.1662-1670, 1998.

LANE, E.A. et al. Crowe. Alterations in the ability of the bovine pituitary gland to secrete gonadotropins in vitro during the first follicle-stimulating hormone increase of the estrous cycle and in response to exogenous steroids. **Domestic Animal Endocrinology**, v.28, p.190–201, 2005.

LESHIN, L.S. et al. The bovine preoptic area and median eminence: sites of opioid inhibition of luteinizing hormone-releasing hormone secretion. **Journal of Animal Science**, v.69, p.3733-3746, 1991.

LEUNG, S.T.; WATHES, D.C. Oestradiol regulation of oxytocin receptor expression in cyclic bovine endometrium. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.119, p.287-292, 2000.

LOGUÉRCIO, R.S. et al. Effect of equine chorionic gonadotrophin on follicular dynamics and ovulatory capacity for fixed-time insemination and estrus resynchronization in postpartum beef cows (Trabalho submetido para publicação - Animal Reproduction Science). **Animal Reproduction Science**, 2006a.

LOGUÉRCIO, R.S. et al. Effect of gestagens on the expression of steroid receptors on short-life corpus luteum and endometrium in postpartum anestrous cows (trabalho submetido a revista Biology of Reproduction). **Biology of Reproduction**, 2006b.

LOOPER, M.L. et al. Influence of estradiol, progesterone, and nutrition on concentrations of gonadotropins and GnRH receptors, and abundance of mRNA for GnRH receptors and

gonadotropin subunits in pituitary glands of beef cows. **Journal of Animal Science**, v.81, p.269-278, 2003.

LUCY, M.C. et al. Efficacy of an intravaginal progesterone insert and an injection of PGF 2α 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.

LUCY, M.C.; STEVENSON, J.S. Gonadotropin-releasing hormone at estrus: luteinizing hormone, estradiol, and progesterone during the periestrual and postinsemination periods in dairy cattle. **Biology of Reproduction**, v.35, p.300–311, 1986.

LUO, W.; WILTBANK, M.C. Distinct regulation by steroids of messenger RNAs for FSHR and CYP19A1 in bovine granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v 75, p.217–225, 2006.

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, p. 473-478, 2001a.

MACIEL, M.N. et al. Efeito da somatotrofina bovina (bST-r), do implante de progestágeno e do desmame por 72 horas na indução do estro e na taxa de prenhez em vacas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.6, p.666-670, 2001b.

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.

MACKEY, D.R. et al. The effect of progesterone alone or in combination with estradiol on follicular dynamics, gonadotropin profiles, and estrus in beef cows following calf isolation and restricted suckling. **Journal of Animal Science**, v.78, p. 1917–1929, 2000.

MANN, G.E.; LAMMING, G.E. The role of suboptimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during short cycle in cow. **Animal Reproduction Science**, v.64, p.161-180, 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. 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 estradiol and progesterone on plasma steroid and gonadotropin concentration in cidr-treated ovariectomized cows. **Theriogenology**, v.59, p.224, 2003.

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.

MAZERBOURG, S. et al. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) in ovine, bovine, porcine, and equine ovarian follicles: involvement in IGF binding protein-4 proteolytic degradation and mRNA expression during follicular development. **Endocrinology**, v.142, p.5243–5253, 2001.

McNATTY, K.P. et al. Control of early ovarian follicular development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.54, p.3-23. 1999.

MEDAN, M.S. et al. Effects of re-immunization of heifers against inhibin on hormonal profiles and ovulation rate. **Reproduction**, v.128, p.475–482, 2004.

MERCER, J.G. et al. Coexpression of leptin receptor and preproneuropeptide Y mRNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus. **Journal of Neuroendocrinology**, v.8, p.733–735, 1996.

MIHM, M. et al. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. **Biology of Reproduction**, v 63, p.811–819, 2000.

MORAES, J.C.F.; JAUME, C.M. Sincrobovi: um pessário para sincronização de cios em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, p.99-101, 1997.

MOUNZIH, K.; LU, R.; CHEHAB, F.F. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. **Endocrinology**, v.138, p.1190–1193, 1997.

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

MYERS, T. R. et. al. Endogenous opioid suppression of release of luteinizing hormone during suckling in postpartum anestrous beef cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v.63, p.183, 1989.

NETT, T.M. et al. Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.33–42, 2002.

NEVES, J.P. et al. Fatores que afetam a eficiência reprodutiva na vaca. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, p.99-105, 1999.

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

OTSUKA, F. et al. Essential role of the oocyte in estrogen amplification of follicle stimulating hormone signaling in granulosa cells. **Endocrinology**, v.146, p.3362–3367, 2005.

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.

PASCOAL, L.L.; RESTLE, J. Diferentes sistemas de alimentação para desmame aos 60-90 dias – Desempenho e economicidade. In: RESTLE, J. (Ed). **Eficiência na produção de ovinos de corte**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, p.258-276, 2000.

PAULA-LOPES, F.F. et al. Leptin promotes meiotic progression and developmental capacity of bovine oocytes via cumulus cell-independent and –dependent mechanisms. **Biology of Reproduction**, Papers in press, published online ahead of print november , 2006.

PETERSEN, S.L. et al. Effects of estrogen and progesterone on luteinizing hormone-releasing hormone messenger ribonucleic acid levels: considerations of temporal and neuroanatomical variables. **Endocrinology**, v.136, p.3604–3610, 1995.

PORTELA, V.V. et al. A novel role for angiotensin II in the regulation of protease-nexin-1 expression and secretion in bovine follicles. In 2006; 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 PGF 2α and GnRH. **Theriogenology**, v.44, p.915–23, 1995.

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.

RICHARDS, M.W. et al. Nutritional anestrus in beef cows: effects of body condition and ovariectomy on serum luteinizing hormone and insulin-like growth factor-I. **Biology of Reproduction**, v.44, p.961–966, 1991.

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

RIVERA, G.M.; FORTUNE, J.E. Development of codominant follicles in cattle is associated with a follicle-stimulating hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein-4 protease. **Biology of Reproduction**, v.65, p.112–118, 2001.

RIVERA, G.M.; FORTUNE, J.E. Selection of the dominant follicle and IGF binding proteins: evidence that pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) contributes to proteolysis of IGF binding protein-5 in bovine follicular fluid. **Endocrinology**, v.144, p.437–446, 2003a.

RIVERA, G.M.; FORTUNE, J.E. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins -4 and -5 in bovine follicular fluid: implications for ovarian follicular selection and dominance. **Endocrinology**, v.144, n.7:2977–2987, 2003b.

ROBERT, C. et al. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. **Reproduction**, v.125, p.437-446, 2003.

RUTTER, L.M.; CARRUTHERS, T.D.; MANNS, J.G. The postpartum induced corpus luteum: functional differences from that of cycling cows and the effects of progesterone pretreatment. **Biology of Reproduction**, v.33, p.560-568, 1985.

SAS INSTITUTE INC. SAS. Statistical Analysis System. 6.03. 1998. Cary, NC. (GENERIC)
Ref Type: Computer Program

SAHU, A. Leptin decreases food intake induced by melanin-concentrating hormone (MCH), galanin (GAL), and neuropeptide Y in the rat. **Endocrinology**, v.139, p.4739–4742, 1998.

SALFEN, B.E. et al. Effect of short-term calf removal at three stages of a follicular wave on fate of a dominant follicle in postpartum beef cows. **Journal of Animal Science**, v.79, p.2688–2697, 2001.

SANTIAGO, C.A. et al. Pregnancy-associated plasma protein-A and insulin-like growth factor binding protein mRNAs in granulosa cells of dominant and subordinate follicles of preovulatory cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.28, p. 46–63, 2005.

SANTOS, J.E.P. et al. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.513–535, 2004.

SARTORI, R. et al. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v.65, p.1403–1409, 2001.

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.

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.

SETH, A. et al. Galanin-like peptide stimulates the release of gonadotropin-releasing hormone in vitro and may mediate the effect of leptin on the hypothalamo-pituitarygonadal axis. **Endocrinology**, v.145, n.2, p.743–750, 2004.

SHORT, R.E. et al. Factors Affecting Estrogen-Induced LH Release in the Cow. **Biology of Reproduction**, v.21, p.683-689, 1979.

SHUGHRUE, P.J.; LANE, M.V.; MERCHENTHALER, I. Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid in the rat medial preoptic nucleus by estrogenic and antiestrogenic compounds: an in situ hybridization study. **Endocrinology**, v.138, p.5476–5484, 1997.

SILVEIRA, P.A. et al. Evidence for maternal behavior as a requisite link in suckling-mediated anovulation in cows. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1338-1346, 1993.

SILVEIRA, R.S. et al. O benzoato de estradiol associado a progesterona regula a onda folicular em vacas em anestro pós-parto que apresentam folículos de diâmetro inferior a 10 mm? (dados preliminares). **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31. p.594-595, 2003.

SPICER, L.J.; CHAMBERLAIN, C.S. Production of insulin-like growth factor-I by granulosa cells but not thecal cells is hormonally responsive in cattle. **Journal of Animal Science**, v.78, p.2919–2926, 2000.

SPICER, L.J.; CHAMBERLAIN, C.S.; MACIEL S.M. Influence of gonadotropins on insulin- and insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced steroid production by bovine granulosa cells. **Domestic Animal Endocrinology**, v.22, p.237–254, 2002.

SPICER, L.J.; CHAMBERLAIN, C.S.; MORGAN, G.L. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins during pre-ovulatory follicular development in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.21, n.1, p.1–15, 2001.

SPICER, L.J.; ECHTERNKAMP, S.E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with emphasis on domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.12, p.223–

245, 1995.

SPICER, L.J.; FRANCISCO, C.C. Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovarian thecal cell steroidogenesis. **Biology of Reproduction**, v.58, p.207-212, 1998.

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. 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.

STEGNER, J.E. et al Fixed-time artificial insemination of postpartum beef cows at 72 or 80 h after treatment with the MGA select protocol. **Theriogenology**, v.61, p.1299–1305, 2004.

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.C. et al. Estrus, ovulation, luteinizing hormone, and suckling-induced hormones in mastectomized cows with and without unrestricted presence of the calf. **Journal of Animal Science**, v.72, p.690–699, 1994.

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

STEWART, R.E. et al. Effects of insulin like growth factor-I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine thecal cells: Involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone. **Journal of Animal Science**, v.73, p.3719–3731, 1995.

STEWART, R.E. et al. Levels of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins, luteinizing hormone and IGF-I receptors, and steroids in dominant follicles during the first follicular wave in cattle exhibiting regular estrous cycles. **Endocrinology**, v.137, p.2842–2850, 1996.

THOMAS, M.G. et al. Injection of Neuropeptide Y into the third cerebroventricle differentially influences pituitary secretion of luteinizing hormone and growth hormone in ovariectomized cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v.16, p.159–169, 1999.

TITOLO, D. et al. Coordinate Regulation of Neuropeptide Y and Agouti-Related Peptide Gene Expression by Estrogen Depends on the Ratio of Estrogen Receptor (ER) α to ER β in

Clonal Hypothalamic Neurons. **Molecular Endocrinology**, v. 20, p.2080–2092, 2006.

TURZILLO, A.M. et al. Regulation of ovine GnRH receptor gene expression by progesterone and oestradiol. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.113, p.251–256, 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.

VOGE, J.L. et al. Effect of insulin-like growth factors (IGF), FSH, and leptin on IGF-binding-protein mRNA expression in bovine granulosa and theca cells: quantitative detection by real-time PCR. **Peptides**, v.25, p.2195–2203, 2004.

VOGE, J.L. et al. Quantification of insulin-like growth factor binding protein mRNA using real-time PCR in bovine granulosa and theca cells: effect of estradiol, insulin, and gonadotropins. **Domestic Animal Endocrinology**, v.26, p.241–258, 2004a.

WALTERS, D.L. et al. Pituitary and ovarian function in postpartum beef cows II: endocrine changes prior to ovulation in suckled and nonsuckled postpartum cows compared to cycling cows. **Biology of Reproduction**, v.26, p.647–654, 1982.

WALTERS, D.L. et al. Pituitary and ovarian function in postpartum beef cows III: endocrine changes prior to ovulation in suckled and nonsuckled postpartum cows compared to cycling cows. **Biology of Reproduction**, v.26, p.655–662, 1982.

WHISNANT, C. S. et al. Opioid inhibition of luteinizing hormone secretion during the postpartum period in suckled beef cows. **Animal Science**, v.63, p.1445, 1986.

WILLIAMS, G.L. et al. Coincident secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in early postpartum beef cows: effects of suckling and low-level increases of systemic progesterone. **Biology of Reproduction**, v.29, p.362–373, 1983.

WILLIAMS, G.L.; et al. Mammary Somatosensory Pathways Are Not Required for Suckling-Mediated Inhibition of Luteinizing Hormone Secretion and Delay of Ovulation in Cows. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1328–1337, 1993.

WOLFE M.W. et al. Opioid and 17 beta-estradiol regulation of LH and FSH secretion during sexual maturation in heifers. **Domestic Animal Endocrinology**, v.8, p.491-498, 1991.

WRATHALL, J.H.M.; KNIGHT, P.G. Effects of inhibin-related peptides and oestradiol on androstenedione and progesterone secretion by bovine theca cells in vitro. **Journal of Endocrinology**, v.145, p.491–500, 1995.

XU, Z.Z. et al. Progesterone and follicular changes in postpartum noncyclic dairy cows after treatment with progesterone and estradiol or with progesterone, GnRH, PGF_{2α}, and estradiol. **Theriogenology**, v.54, p.273-282, 2000.

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

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.

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

YUAN, W. et al. Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, and IGF binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v.15, p.55–63, 1998.

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

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.

ZOLLERS, W.G.; et al. In vitro secretion of prostaglandins from endometrium of postpartum beef cows expected to have short or normal luteal phases. **Biology of Reproduction**, v.78, p.1909– 1920, 1991.

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