

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

**ESTRATÉGIAS HORMONAIIS DE
INDUÇÃO/SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO EM
NOVILHAS DE CORTE ENTRE 12 E 14
MESES DE IDADE**

TESE DE DOUTORADO

José Francisco Manta Bragança

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

**ESTRATÉGIAS HORMONAIS DE
INDUÇÃO/SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO EM NOVILHAS DE
CORTE ENTRE 12 E 14 MESES DE IDADE**

por

José Francisco Manta Bragança

Tese apresentada ao Curso de Doutorado 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 **Doutor 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 Tese de Doutorado

**ESTRATÉGIAS HORMONAIS DE INDUÇÃO/SINCRONIZAÇÃO DE
ESTRO EM NOVILHAS DE CORTE ENTRE 12 E 14 MESES DE IDADE**

elaborada por
José Francisco Manta Bragança

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Paulo Bayard Dias Gonçalves, Dr (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Jairo Pereira Neves, Dr (UNB)

Alceu Mezzalira, Dr (UDESC)

Marlon Nadal Maciel, Dr (UFSM)

Marcelo Soares, Dr (UFSM)

Santa Maria, 12 de março de 2007.

**Esse trabalho é dedicado
à minha esposa, Sônia, e
minhas filhas, Sofia,
Juana e Manuela**

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Sônia, pelo seu carinho, amor, amizade e pelo seu exemplo de força e perseverança em superar as dificuldades da vida.

Às minhas filhas, pela grata oportunidade de ser pai.

Aos meus irmãos e demais familiares, pelo apoio e carinho nos vários períodos de minha vida.

Ao meu orientador, Dr Paulo Bayard Dias Gonçalves, pela orientação e, antes de tudo, pela amizade, paciência e sinceridade em mostrar-me os meus erros e acertos.

Ao Dr. João Francisco Coelho de Oliveira, pelas sugestões prestadas ao trabalho, sua amizade sincera e atenção dedicada.

Ao meu primeiro orientador, Dr. Jairo Pereira Neves, pelo estímulo na minha profissão e sua eterna amizade.

Aos alunos de graduação e pós-graduação do laboratório BioRep, pelo carinho e amizade que sempre demonstraram.

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

Aos funcionários da Coordenação do referido programa, na pessoa do Sr. Vanderlan, sempre prestativo nos meus assuntos estudantis.

Aos funcionários da Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais, na pessoa do Sr Luiz Marchiotti, pela atenção dispensada durante o curso.

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

Aos funcionários da Granja Quatro Irmãos e Estância São Francisco, pela cedência dos animais para a realização dos estudos experimentais.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

ESTRATÉGIAS HORMONAIIS DE INDUÇÃO/SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO EM NOVILHAS DE CORTE ENTRE 12 E 14 MESES DE IDADE

AUTOR: JOSÉ FRANCISCO MANTA BRAGANÇA
ORIENTADOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 12 de março de 2007

O objetivo do presente estudo, foi o de desenvolver e avaliar dois protocolos de sincronização e ou indução de estro em novilhas de corte com 12 a 14 meses de idade, que possibilite o emprego da inseminação em tempo fixo (IATF) após um curto controle de estro (48h). O primeiro trabalho experimental consistiu na avaliação da necessidade de eCG no sistema BioRep quando utilizado em novilhas. Para tanto, foram empregadas 64 novilhas (*Bos taurus x Bos indicus*) divididas ao acaso em dois grupos: eCG (tratamento- n =32) e s/eCG (controle -n=32). Em uma segunda etapa o grupo tratamento foi implantado em um número maior de fêmeas (n=92), avaliando a consistência dos resultados obtidos no pré-experimento. No dia 0, as novilhas do grupo tratamento receberam um pessário vaginal com 250mg de MAP por sete dias, e uma injeção intra-muscular (IM) de 2,5mg de BE. No sexto dia, foram aplicados 250UI IM de eCG e 104µg Cloprostenol sódico na sub-mucosa vulvar (smv). Após a retirada do MAP, as novilhas tiveram seu estro controlado por um período de 48h, sendo inseminadas 12h após a manifestação do mesmo. As novilhas que não manifestaram o estro no período de controle, receberam 100µg IM de GnRH e, após 16 a 24h, foram inseminadas por IATF. As novilhas do grupo controle receberam o mesmo tratamento anterior, sem a aplicação do eCG. Os índices de concepção e prenhez nos grupos tratamento (55,2% e 46,2%), mostraram-se similares e ao serem agrupados foram significativamente superiores aos do grupo controle (23,07% e 25,0%) respectivamente ($P<0,05$). Conclui-se que o emprego de eCG, associado ao MAP, permite melhorar os índices de prenhez em novilhas de 12 a 14 meses de idade. Por sua vez, o segundo experimento teve por objetivo avaliar o emprego de progestágeno em um sistema de indução/sincronização de estro, utilizando eCG-GnRH-MAP-PG-GnRH (eMGPG) para novilhas de corte de 12 a 14 meses. Novilhas *Bos taurus*, predominante Red Angus, foram divididas aleatoriamente em dois grupos: eMGPG (n=85) e eGPG (n=85). As novilhas do grupo eMGPG receberam 400UI de eCG (IM; dia -3) com a finalidade de provocar um aumento de crescimento folicular, tornando-os mais responsivos ao GnRH. Após 72h, os animais receberam uma injeção de GnRH (100µg; IM; dia 0) e um pessário vaginal contendo 250mg de acetato de medroxi-progesterona (MAP) por sete dias. Na retirada do MAP (dia 7), foi aplicada uma dose de 5mg de Dinoprost, via submucosa vulvar. Nas 48h seguintes à retirada dos pessários, foi realizado o controle da manifestação de estro e inseminação artificial (IA). As novilhas que não manifestaram estro nesse período, receberam uma dose de 100µg de GnRH por via IM e IATF nas 16 a 24h seguintes. As fêmeas do grupo eGPG receberam o protocolo similar ao anterior porém, sem o MAP. A percentagem de estro dos grupos eMGPG e eGPG após a aplicação da prostaglandina foram de 23,5% (20/85) e 22,3% (19/85) respectivamente ($p>0,05$). Igualmente, os índices de concepção e prenhez nos grupos eMGPG (65,0%; 13/20 e 37,6%; 32/85) e eGPG (68,4%; 13/19 e 28,2%; 24/85) não diferiram estatisticamente. Com intuito de avaliar a resposta de folículos de diferentes tamanhos após administração de eCG, novilhas de 12-14 meses foram aleatoriamente distribuídas para receber 400UI de eCG (IM) na presença de folículos de 5,0, 8,5 e >10,0mm, durante o diestro. Os diâmetros médios dos folículos no dia 3 da dinâmica foram, de 13mm, de 10mm e de 8mm nos grupos de folículos grandes, de folículos médios e de folículos pequenos respectivamente. Conclui-se que a aplicação prévia de eCG para aumentar o índice de folículos responsivos ao GnRH não substitui uma fonte de gestágeno na sincronização/indução de estro em novilhas de corte com 12 a 14 meses de idade. Pode-se concluir também que algumas fêmeas, apesar da aplicação prévia de eCG, dependendo do momento do crescimento folicular em que se encontram, não atingem um diâmetro folicular compatível com resposta ao GnRH.

Palavras-chaves: estro, inseminação artificial, ovulação, eCG, GnRH, novilhas.

ABSTRACT

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

HORMONAL STRATEGIES FOR ESTRUS INDUCTION/SYNCHRONIZATION IN 12-14 MONTHS OLD BEEF HEIFERS

AUTOR: JOSÉ FRANCISCO MANTA BRAGANÇA
ORIENTADOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 12 de março de 2007

The aim of this study was to develop and evaluate two protocols for estrus synchronization and/or induction in 12-14 months old beef heifers, which would allow the use of timed artificial insemination (TAI) after a short period of estrus detection (48h). The first experiment consisted of evaluating whether eCG was a necessary component in the BioRep system to be used in heifers. To address this question 64 heifers (*Bos taurus x Bos indicus*) were randomly divided into 2 groups: eCG (treatment – n=32) and no eCG (controle – n=32). A second experiment was performed with the objective of increasing the number of animals in the eCG group to evaluate the consistency of the results obtained in the first experiment (n=92). On day 0 animals from group treatment received a vaginal pessary containing 250mg of medroxyprogesterone acetate (MPA) for 7 days, along with an intramuscular (IM) injection containing 2.5mg of estradiol benzoate (EB). On day 6 animals were treated with 250IU of eCG (IM) and 1mg of cloprostenol sodium in the vulvar submucosa (VSM). After MPA withdrawal heifers were checked for estrus manifestation for 48h and were inseminated 12 hours after estrus detection. Heifers which did not manifest estrus during the 48h observation received 1mg of GnRH (IM) and were inseminated 16 to 24h later by TAI. Heifers in the control group received a similar treatment except for the eCG injection which was not used. Because results from treatment group on first and second experiments were not different, pooled conception (55.2%) and pregnancy (46.2%) rates were compared to control rates (23.07% and 25.0% respectively) showing a significant improvement of those rates. We conclude that the use of eCG associated with MPA improves pregnancy rates of 12-14 months old beef heifers. Our second objective was to evaluate the use of progestogens in a system of estrus induction/synchronization using eCG-GnRH-MPA-PG-GnRH (eMGPG) in 12-14 months old beef heifers. *Bos taurus* heifers, mostly Red Angus, were randomly divided into 2 groups: eMGPG (n=85) and eGPG (n=85). Heifers on group eMGPG received 400IU of eCG (IM; day -3) with the objective of inducing an increase in follicular growth, leading to higher responsiveness of follicles to GnRH. Seventy-two hours after eCG injection animals were given GnRH (1mg; IM; day 0) and a vaginal pessary containing 250mg of MPA for 7 days. At MPA withdrawal (day 7) 5mg of Dinoprost was injected into the VSM. Forty-eight hours after pessary withdrawal estrus detection followed by AI was performed. Heifers which did not manifest estrus received 1mg of GnRH (IM) and were inseminated 16 to 24h later by TAI. Females from group eGPG received a protocol similar to group eMGPG, except for MPA which was not used. Percentage of estrus manifestation on groups eMGPG and eGPG after prostaglandin injection were 23.5% (20/85) and 22.3% (19/85) respectively (p>0.05). Similarly, conception and pregnancy rates on groups eMGPG (65.0%; 13/20 and 37.6%; 32/85%) and eGPG (68.4%; 13/19 and 28.2%; 24/85) were not statistically different. To evaluate the response of follicles with different sizes after eCG administration, 12-14 months old heifers were randomly divided into groups of animals containing follicles of 5.0 (small), 8.5 (medium) and >10.0mm (large) to receive 400IU of eCG (IM) during diestrus. Follicular diameters on day 3 of the control of follicular growth by ultrasound were 13mm, 10mm and 8mm on groups of large, medium and small follicles, respectively. We conclude that the use of eCG prior to the regular hormonal protocol, with the objective of increasing the follicular responsiveness to GnRH does not replace a source of progestagen during the synchronization/induction of estrus in 12-14 months old beef heifers. Furthermore, some females despite the prior administration of eCG depending upon their stage of follicular development do not reach a diameter compatible with GnRH responsiveness.

Key words: estrus, artificial insemination, ovulation, eCG, GnRH, heifers.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1: Esquema das aplicações hormonais empregadas nas novilhas de 12 a 14 meses de idade dos grupos tratamento (eCG-confirmação). As novilhas do grupo controle apenas não receberam a aplicação de eCG no dia 6.....67

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1: Índices de concepção e prenhez de novilhas de 12 a 24 meses de idade submetidas à indução de estro e ovulação com e sem eCG.....	69
--	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- FIGURA 1: Representação esquemática das aplicações hormonais nas novilhas de 12 a 14 meses de idade do grupo eMGPG. As novilhas no grupo eGPG apenas não receberam o pessário vaginal de MAP entre os dias 0 e 7.81
- FIGURA 2: Percentagem de novilhas de 12 a 14 meses de idade manifestando estro em relação à aplicação da prostaglandina nos grupos eGPG e eMGPG.....84
- FIGURA 3: Crescimento dos folículos com diâmetro de 5mm a partir da aplicação ou não de eCG em novilhas de corte com 12 a 14 meses de idade.....86
- FIGURA 4: Crescimento folicular após a aplicação de eCG nos grupos de folículos pequenos (5mm), médios (8,5mm) e grandes (>10mm) em novilhas de 12 a 14 meses de idade.....87

LISTA DE ABREVIATURAS

3 β HSD: enzima 3 beta hidroxí esteróide deshidrogenase
BE: benzoato de estradiol
CIDR-B: dispositivo de liberação lenta de progesterona para uso bovino
cm: centímetro
D: densidade
DHPA: dihidroxiprogesterona acetofenonida
eCG: gondaotrofina coriônica eqüina
FSH: hormônio foliculo estimulante
FSH-P: hormônio foliculo estimulante suíno
GnRH: hormônio liberador de gonadotrofinas
h: hora
hCG: gonadotrofina coriônica humana
IA: inseminação artificial
IATF: inseminação em tempo fixo
IGF: fator de crescimento semelhante a insulina
IGFBPs: proteínas ligadoras do fator de crescimento semelhante a insulina
IM: intramuscular
LH: hormônio luteinizante
MAP: acetato de medroxi-progesterona
mg: miligrama
MGA: acetato de melengestrol
ml: mililitro
mm: milímetro
ng: nanograma
P450 17 α : enzima citocromo P450 17 alfa hidroxilase
P450 arom: enzima P450 aromatase
P450 scc: enzima citocromo P450 clivadora de cadeia
PG: prostaglandina

PRID: dispositivo de liberação rápida de progesterona

RE β : receptor de estradiol subunidade beta

RP: receptor de progesterona

RNAm: ácido ribonucléico mensageiro

Smv: submucosa vulvar

StAR: proteína reguladora esteróidogênica

UI: unidade internacional

μ g: micrograma

μ m: micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Eficiência Reprodutiva	18
2.2 Puberdade	19
2.2.1 Feedback negativo do estradiol 17 β no início da puberdade	21
2.2.2 Fase lúea de curta duração.....	24
2.3 Desenvolvimento e Dinâmica Folicular	26
2.3.1 Desenvolvimento Folicular na espécie Bovina.....	26
2.3.2 Dinâmica Folicular na espécie Bovina.....	28
2.4 Sincronização e Indução de estro	34
2.4.1 A progesterona e ou progestágenos no controle do ciclo estral	35
2.4.1.1 Combinações de progesterona e/ou progestágenos com estradiol	38
2.4.1.2 Sistemas de aplicação intravaginal de progesterona e/ou progestágenos	41
2.4.2 A prostaglandina e seus análogos no controle do ciclo estral	45
2.4.3 O GnRH e seus análogos no controle do ciclo estral	50
2.4.4 A gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) na sincronização de estro	57
3. CAPÍTULO 1: Avaliação do emprego do eCG em um programa hormonal de sincronização de estro e ovulação em novilhas de corte com 12 a 14 meses de idade.....	62
4. CAPÍTULO 2: Programa de sincronização/ indução de estro e ovulação para novilhas de corte com 12 a 14 meses de idade	77
5. DISCUSSÃO	96
6. CONCLUSÃO	103
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura de corte, no Brasil, é caracterizada por uma baixa eficiência produtiva e reprodutiva, sendo a primeira altamente influenciada pela reprodução. A idade em que inicia a puberdade é determinante da eficiência da vida reprodutiva de fêmeas bovinas (SCHILLO et al., 1992). Além desse fator, a baixa taxa de natalidade, a elevada idade à primeira cria, o percentual reduzido de ventres produtivos no rebanho e a elevada idade ao abate são os principais fatores responsáveis pela baixa eficiência do setor pecuário (GOTTSCHALL, 1999).

Sendo assim, o aumento da produtividade da pecuária de corte no Estado do Rio Grande do Sul e no Brasil, tem sido colocado como uma alternativa de melhoria do resultado econômico das empresas dedicadas à atividade. Esse processo passa pela melhoria dos indicadores de reprodução e produção do rebanho, congregando mudanças no nível tecnológico incorporado aos sistemas de produção, principalmente no manejo alimentar, sanitário e melhoramento genético reprodutivo (BERETTA et al., 2001). Em rebanhos de cria, as novilhas e as vacas primíparas, representam aproximadamente 40% do total de ventres produtivos, de modo que especial atenção deve ser dada a estas categorias, caso seja desejado um incremento nos indicadores de eficiência produtiva (GOTTSCHALL, 1999). O manejo correto da novilha (nutricional, sanitário) é essencial para maximizar a resposta produtiva e o desempenho reprodutivo do rebanho (HOLMES, 1989; SPIRE, 1997).

De acordo com GONÇALVES (2003), a antecipação da idade ao primeiro parto e a obtenção de menores intervalos entre partos são pontos fundamentais na produtividade da pecuária. As matrizes com seu primeiro terneiro ao pé e submetidas ao segundo entoure, constituem o ponto crítico da atividade de cria, pois tanto o baixo índice de matrizes prenhes ao final da estação, como um maior intervalo entre partos, refletem a baixa eficiência da atividade.

Com a primeira parição aos quatro anos de idade, o nível de desfrute do rebanho fica em torno de 10%. Esse índice é quase duplicado se a primeira parição ocorrer aos 3 anos de idade e atingirá 40% com o primeiro parto, ocorrendo aos 24 meses. Isto mostra que a antecipação da idade ao primeiro parto proporciona incrementos no desfrute e nas receitas obtidas com a pecuária (FRIES; ALBUQUERQUE, 1999). As fêmeas que entram em

reprodução com um ano de idade desmamam 0,7 terneiros a mais em sua vida reprodutiva do que as que são colocadas em reprodução a partir dos dois anos de idade (MORRIS, 1980). Portanto, fêmeas que parem aos dois anos de idade tem uma maior eficiência biológica e uma maior lucratividade ao produzirem mais quilogramas de terneiros durante a sua vida (ROCHA; LOBATO, 2002). As demais vantagens de se acasalar novilhas mais jovens, estão relacionados os seguintes elementos: um menor intervalo para se obter retorno do investimento, aumento da vida produtiva da fêmea, aumento do número de terneiros por ano, menor demanda de pastos para fêmeas de reposição, que passam a ser manejadas junto ao rebanho de reprodução, além de diminuir a participação de animais improdutivos ou em recria na composição do rebanho (SHORT et. al., 1994; ROCHA; LOBATO, 2002). Assim, a precocidade sexual e um maior percentual de novilhas e vacas parindo e concebendo nos primeiros dias das respectivas estações devem ser metas para rebanhos de gado de cria (LESMEISTER, et. al., 1973; GAINES, 1994; HILL, 1996).

Nesse sentido, a indução e /ou sincronização de estro como biotécnica reprodutiva, surge como uma ferramenta de manejo auxiliar, para o aumento da eficiência produtiva e econômica da atividade pecuária (ODDE, 1990). Através da sincronização, o período de inseminação artificial (IA) pode ser reduzido de 21 dias para o mínimo de algumas horas, no caso da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), dependendo do método escolhido (DEUTSCHER, 1991; BÓ et al., 2004; BRAGANÇA et al., 2004). Quando aplicada na primeira estação reprodutiva possibilita incrementar o índice de repetição de cria nas primíparas, principalmente por concentrar as parições no início da temporada. Programas de sincronização de estro em novilhas oferecem uma série de benefícios, destacando-se entre as principais: previsão do momento do estro e IA, a redução de custos de mão de obra, redução do período de parição com conseqüente uniformidade de produtos e um menor tempo de observação dos partos e a maior praticidade na execução de programas de IA (GREGORY; ROCHA, 2004).

Sendo assim, os principais grupos de substâncias hormonais, empregadas no controle do ciclo estral de bovinos são os gestágenos e as prostaglandinas. Associações hormonais são também utilizadas, entre elas, gestágenos com estrógenos; gestágeno, estrógeno e prostaglandina; gestágeno, estrógeno, prostaglandina e GnRH ou hCG; GnRH e prostaglandina e GnRH e hCG (PURSLEY et al., 1995; MORAES, et al, 2001; THATCHER et al., 2001). No sul do Brasil, Uruguai e Argentina, pessários impregnados com gestágenos ou progesterona têm sido desenvolvidos para sincronização de estro em bovinos (CAVESTANY, 1996; MORAES; JAUME, 1997). Os índices de prenhez obtidos em vacas e

novilhas com pessários vaginais impregnados com acetato de medroxi-progesterona (MAP) variam de 40% a 65%, associando a inseminação artificial (IA) com controle de estro e inseminação artificial em tempo fixo (IATF); (MORAES; JAUME, 1997; PORTELA Jr et al., 2001; BRAGANÇA et al., 2004).

Por outro lado, eCG tem sido utilizada para aumentar a fertilidade em fêmeas tratadas com gestágenos pela sua atividade tanto de hormônio foliculo estimulante (FSH) como luteinizante (LH). Esta combinação oferece vantagens, pois ambos efeitos são necessários no desenvolvimento folicular (SORENSEN, 1982). Quando utilizado em baixas doses (300 a 500 UI) para estimular o crescimento folicular na retirada do gestágeno em programas de indução de estro, tem mostrado resultados variáveis (MIALOT et al., 2003; BARUSELLI et al., 2004).

Já protocolos de sincronização de estro que utilizam o GnRH, a iniciar uma nova onda de crescimento folicular e /ou promover a ovulação de um foliculo dominante no momento da IA, têm sido desenvolvidos para gado de corte e de leite (GEARY; WHITTIER, 1998; PERRY et al., 2002; PURSLEY et al., 1998). Quando administrado em estádios aleatórios do ciclo estral, o GnRH determina a ovulação do foliculo dominante com >9mm ou a sua atresia, e induz a emergência de uma nova onda de crescimento folicular dentro de 2 a 3 dias em vacas, e 1.5 dias em novilhas após o tratamento (MACMILLAN; THATCHER, 1991; PURSLEY et al., 1995).

No entanto, associações hormonais que utilizam GnRH e prostaglandina (*Ovsynch*, *Select-synch*), quando empregadas em animais que estão ciclando, resultam em percentagem de prenhez superior do que em fêmeas em anestro e novilhas. Estudos revelam que 85% de vacas respondem a primeira injeção de GnRH e unicamente 54% das novilhas (PURSLEY et al., 1995; MARTINEZ et al., 1999). Além disso, 19% de novilhas retornam ao estro antes da aplicação de prostaglandina, o que torna o emprego da IATF impossível (WILTBANK et al., 1997). Resultados confirmam que o emprego do GnRH nem sempre resulta em ovulação do foliculo presente e, conseqüentemente, na emergência de uma nova onda de crescimento folicular. Este fato se traduz em índices de prenhez para novilhas que não superam os 20% (PURSLEY et al., 1995).

Dessa forma, o objetivo destes estudos foi propor e avaliar alternativas hormonais que possibilitem a indução e ou sincronização de estro em novilhas entre 12 a 14 meses de idade. Nesse sentido, o primeiro estudo consistiu na avaliação do efeito do eCG em um protocolo hormonal que associa acetato de medroxi-progesterona (MAP) ao benzoato de estradiol na emergência de uma nova onda folicular, e permite a IA após curto período de

controle de estro e IATF. O segundo estudo tratou de desenvolver um protocolo, baseado em eCG, para aumentar o índice de folículos responsivos ao GnRH e, usar o corpo lúteo como fonte natural de gestágeno, na sincronização e/ou indução de estro, permitindo também o emprego da IA com controle de estro e IATF.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EFICIÊNCIA REPRODUTIVA EM FÊMEAS BOVINAS

O Brasil é um país com grande potencial para a produção de carne bovina. No entanto, apresenta baixa eficiência produtiva e reprodutiva. Assim, KING (1983) define eficiência reprodutiva como o número de crias produzidas durante o período de vida da fêmea no rebanho, sugerindo que o intervalo do nascimento ao primeiro parto (idade à primeira cria) e, também, entre partos são os principais componentes que afetam a performance reprodutiva da fêmea. Ainda, a baixa taxa de natalidade, o percentual de ventres produtivos no rebanho e a elevada idade ao abate são outros principais fatores responsáveis por essa baixa eficiência (GOTTSCHALL, 1999).

Nesse sentido, GONÇALVES (2003) afirma que os índices de produção são decorrentes da pouca importância dada ao manejo das matrizes, as quais, muitas vezes são colocadas em segundo plano, esquecendo-se da importância da tríade do manejo (sanitário, reprodutivo e nutricional), uma vez que a mesma é responsável pela melhora desses índices produtivos. Os rebanhos de cria, novilhas e vacas primíparas representam, aproximadamente, 40% do total de ventres produtivos, e especial atenção deve ser dedicada a estas categorias. Desta maneira, o desenvolvimento de fêmeas de reposição é uma fase crítica em sistemas de produção de pecuária de corte, em que a idade média ao primeiro parto, no Brasil, está acima de 40 meses de idade, em consequência de uma alimentação e manejo inadequados (SEMMELMANN et al., 2001).

Olhando do ponto de vista econômico, quando o sistema produtivo baseia-se na primeira parição, aos quatro anos de idade, o nível de desfrute do rebanho fica em torno de 10%. Esse índice pode ser quase duplicado, se a primeira parição ocorrer aos 3 anos de idade e atingirá 40% com o primeiro parto, aos 24 meses de idade, e abate dos machos entre 12 e 13 meses. Fica claro que a decisão/ oportunidade de utilização de fêmeas sexualmente mais precoces terá reflexo direto na eficiência, rentabilidade e competitividade da pecuária bovina nacional (FRIES; ALBUQUERQUE, 1999). Novilhas que venham a parir aos dois anos de idade apresentam um maior tempo de vida reprodutiva e, em decorrência, mais terneiros produzidos em relação à fêmeas que parem por primeira vez aos três anos (PATTERSON et al., 1992).

Em relação a este ponto, SHORT et al. (1994), apresentam as principais vantagens e desvantagens de acasalar as novilhas precocemente. Como vantagens foram relacionadas: 1) menor intervalo para se obter um retorno do investimento; 2) menor demanda de pastos para fêmeas de reposição, que passam a ser manejadas junto com o rebanho de produção; 3) e, também, o aumento da vida reprodutiva com maior número de terneiros nascidos por ano. Por outro lado, entre as desvantagens os autores citam: 1) aumento dos custos (manejo e alimentação) para que a novilha possa entrar em reprodução mais cedo; 2) aumento da perda de terneiros em decorrência de partos distócicos e outros problemas relacionados, incluindo custos, investimentos em manejo para lidar com os problemas de parto; 3) as vacas de 2 anos de idade teriam uma menor taxa de retorno a reprodução no ano seguinte, quando comparadas a vacas mais velhas; 4) as fêmeas de 2 anos produziriam um menor número de terneiros que seriam desmamados com menor peso. Esta última desvantagem é ainda mais séria quando se quer entourar fêmeas entre 14 e 15 meses e, sabe-se que o peso/condição corporal quando a terneira é desmamada responde por 2/3 a 3/4 do peso/condição corporal necessários para a concepção.

Analisando os fatos anteriormente enumerados, bastante evidente se torna a importância da diminuição da idade de cobertura e antecipação da idade ao primeiro parto, buscando incrementar os índices de produção e eficiência reprodutiva do rebanho. Desta maneira, o objetivo principal de um sistema de recria de reposição é desenvolver novilhas que tenham alcançado a puberdade e ciclem regularmente, antes do início da primeira estação de acasalamento.

2.2 PUBERDADE EM FÊMEAS BOVINAS

O início da puberdade é definida como o primeiro comportamento estral acompanhado pelo desenvolvimento de um corpo lúteo que é mantido pelo período característico da espécie (KINDER et al., 1987). Em outras palavras, o início da puberdade relaciona-se ao primeiro estro da novilha, seguido por uma fase lútea fisiológica. Na fêmea bovina, esta fase envolve a transição de um período de inatividade ovariana para outro, no qual as ovulações regulares ocorrem (MORAN et al., 1989).

No começo da puberdade, uma onda de GnRH promove a liberação de uma onda de LH da hipófise anterior, a qual estimula a ovulação de um folículo pré-ovulatório. Assim, o eixo reprodutivo hipotálamico-hipofisário-gonadal atua como um sistema regulador da

reprodução, sendo o hipotálamo o componente final para regular o início da puberdade em novilhas (NAKADA et al., 2002). Por sua vez, o estradiol-17 β e a inibina, regulam direta e indiretamente a secreção de GnRH e gonadotrofinas nas novilhas pré-púberes (DAY et al., 1987; DODSON et al., 1988). Desta forma, o mais consistente evento endócrino observado antes da puberdade, assim como no anestro pós-parto, é a baixa frequência dos picos de LH (DAY et al., 1987).

A funcionalidade do eixo reprodutivo inicia durante o período embrionário. Os neurônios hipotalâmicos secretores começam a aparecer por volta do 32º dia do período embrionário, e a hipófise começa a secretar gonadotrofinas a partir da 10ª semana deste período. A necessidade da integridade do eixo reprodutivo é importante no período intrauterino, para completar a diferenciação sexual e a descida testicular nos machos (HUTSON et al., 1997). As concentrações de FSH em soro de fetos do sexo feminino bovino aumentaram nos dias 120 e 150 de gestação, e a aparição de folículos primordiais, primários, secundários e antrais iniciais, aconteceram nos dias 74, 91, 120 e 150, respectivamente (TANAKA et al., 2001).

Após o nascimento, o desenvolvimento do sistema reprodutivo da novilha acontece em duas etapas: há um aumento no crescimento de todo o trato reprodutivo entre 3 e 4 meses de idade, seguido de uma fase em que o crescimento diminui e antecede uma nova fase de aceleração antes da primeira ovulação (DESJARDINS; HAFS, 1969). Quando os índices de crescimento relativo (ganho de peso por dia/ peso ao nascer x 100) foram examinados, os ovários cresceram três vezes mais rápido do que o corpo por inteiro até a puberdade. Outros parâmetros da genitália interna, tais como, peso da cérvix, útero, vagina, e altura do epitélio luminal, tiveram seu crescimento no mesmo ritmo do corpo até os seis meses de idade e a partir desta etapa até a puberdade em um ritmo maior (MORAN et al., 1989).

Estas diferenças no crescimento e desenvolvimento são conseqüências de variações na concentração de gonadotrofinas, que aceleram a proliferação folicular e a produção de estrógeno determinando a diferença na velocidade de crescimento dos tecidos (HONARAMOOZ et al., 2004). O que restringe a atividade reprodutiva no período pós-natal parece ser a diminuição da secreção de GnRH impedindo a completa função gonadal, de modo que os mecanismos responsáveis por esta inibição de secreção podem ter origem central ou periférica. O controle da reprodução por meio do sistema nervoso central em novilhas é exercido principalmente pelas gonadotrofinas (FSH e LH; MORAN et al., 1989). As concentrações dessas gonadotrofinas estão em níveis elevados em fêmeas pré-púberes quando

comparadas às fêmeas que já alcançaram a puberdade, indicando que a hipófise é capaz de sintetizar e armazenar FSH e LH antes da puberdade (KINDER et al., 1987).

NAKADA et al. (2000) delinearum um ensaio experimental com o objetivo de avaliar as mudanças, nos níveis plasmáticos dos hormônios reprodutivos em novilhas, desde o nascimento até a puberdade. Variações semanais nos referidos hormônios mostraram a existência de três períodos breves entre o nascimento e a puberdade, com interessantes variações. O primeiro período, na primeira semana de nascimento, mostrou relações recíprocas entre os hormônios esteróides e as gonadotrofinas. No momento do nascimento, as concentrações dos esteróides foram maiores do que em qualquer outra fase, diminuindo posteriormente. O segundo período acontece aproximadamente na quarta semana de idade, quando surge um aumento nas concentrações dos hormônios, LH, estradiol-17 β , testosterona e inibina imunoreativa. E, um terceiro período, que compreende as últimas cinco semanas anteriores à primeira ovulação, em que um aumento nos níveis do estradiol-17 β é seguido pelo aumento nos níveis de LH. Os resultados deste ensaio sugerem que as mudanças hormonais regulares, iniciadas dez dias após o nascimento, até as quatro semanas de vida e nas últimas semanas prévias à primeira ovulação, são importantes ao desenvolvimento das funções reprodutivas.

2.2.1 Feedback negativo do Estradiol 17 β no início da puberdade em bovinos

Estudos experimentais revelaram que novilhas, a partir de 1 até os 3 meses de idade, já apresentam um sistema hipotalâmico-hipofisiário-gonadal funcionalmente maduro (BARNES et al., 1980; NAKADA et al., 2002). Isto permite que tenham a capacidade de desencadear os eventos endócrinos que induzem o estro. Entretanto, uma alta sensibilidade ao efeito de feedback negativo ao estradiol não permite a ocorrência de manifestação estral (SCHILLO, 2003). O estradiol é um importante regulador do eixo hipotalâmico-hipofisiário-gonadal e o fator responsável pela indução de uma onda pré-ovulatória de LH, ao aumentar a sensibilidade da hipófise anterior ao GnRH, promovendo a sua liberação na corrente circulatória (NETT et al., 2002). Portanto, baixas concentrações de estradiol exercem um efeito de feedback negativo na liberação tônica de LH (SCHILLO et al., 1992).

Os esteróides gonadais alteram a habilidade da hipófise anterior de sintetizar e ou secretar as gonadotrofinas. De maneira geral, um efeito curto (menos do que 24h) do estradiol é estimulatório para a síntese e secreção de LH. O efeito de estímulo decorre, tanto por um

aumento na síntese de LH como por uma sensibilidade aumentada ao GnRH resultando na síntese de receptores para este hormônio liberador de gonadotrofinas. Ao contrário, o efeito da progesterona é inibitório à síntese e secreção do LH. Relacionado aos efeitos dos esteróides na síntese e secreção de gonadotrofinas estes podem ser mediados via interação direta de um receptor do hormônio esteróide com o elemento de resposta no gene da gonadotrofina, como parece ocorrer no efeito do estradiol com a sub-unidade β do LH e, indiretamente via o hormônio esteróide alterando a produção de outra proteína a qual, em consequência afeta a gonadotrofina. Isto parece ser o que acontece com o estradiol inibindo a expressão do gene β da ativina que leva assim, à diminuição da síntese de FSH. Além destas vias, o fato de alterar a produção de hormônios em outros órgãos que influenciam a atividade dos ganadotropos tipo, a progesterona suprimindo a secreção de GnRH do hipotálamo, como consequência levando a uma expressão de receptores para o mesmo (NETT et al., 2002)

O feedback negativo, exercido pelo estradiol, mantém um modo de secreção de gonadotrofina de baixa frequência. No entanto, com a proximidade da ocorrência da puberdade, o efeito de feedback negativo na secreção de LH diminui e, como consequência, promove um aumento drástico na secreção e frequência de pulso de LH nas últimas semanas anteriores à puberdade (SCHILLO et al., 1982; DAY et al., 1984; DAY et al., 1987. RODRIGUES et al., 2002). Este aumento de frequência de pulsos é pré-requisito para o início da puberdade em novilhas, tornando-se evidente nos cinquenta dias prévios ao início da mesma e é acompanhado pela diminuição da amplitude de pulso de LH (DAY et al., 1987).

As frequências de pulso de LH variaram de um a quatro pulsos a cada 24 h do dia -130 aos - 46 anteriores à puberdade, chegando a um pulso por hora, dias antes do início da mesma. Este aumento pré-puberal na frequência de pulsos de LH, é essencial a estimular um aumento na produção de estradiol até níveis que possibilitem a indução da primeira onda pré-ovulatória de gonadotrofinas por feedback positivo (DAY et al., 1986).

Estudos experimentais revelaram que o estradiol aumenta o número de receptores de GnRH, resultando no aumento da sensibilidade da hipófise ao mesmo. LOOPER et al. (2003) verificaram que o número de receptores de GnRH na hipófise, aumentou em vacas tratadas com dispositivos intravaginais contendo estradiol ($P < 0.05$). Entretanto, este número não mudou em animais tratados com progesterona. Estes resultados suportam a evidência que o tratamento de vacas em anestro, com estradiol similar aos níveis verificados durante uma fase lútea do ciclo estral, pode aumentar o número de receptores de GnRH necessários para o reinício da ciclicidade, como também desempenhar um papel importante antes da onda pré-ovulatória de gonadotrofina, anterior ao início da puberdade.

O estradiol, por outro lado, influencia a atividade de sistemas de neuropeptídeos e neurotransmissores no cérebro, que afetam a secreção de GnRH (SMITH; JENNES, 2001). PETERSEN et al., (2003) demonstraram a ação do estradiol em neurônios de GnRH diretamente por seus receptores (RE β) ou, indiretamente, atuando em neurônios sensíveis ao estradiol, situados na região periventricular anteroventral. É sugerido que o estradiol reprime a expressão do gene do GnRH, porém esta repressão é transitória e superada de forma indireta, por sinais dependentes de estradiol liberados pelos neurônios da região anteriormente citada. Também, estudos anteriores mostraram o papel desempenhado pelos neuropeptídeos opióides na transmissão dos efeitos do estradiol durante a maturação sexual na novilha, regulando a secreção das gonadotrofinas (WOLFE et al., 1991). Neurotransmissores e neuropeptídeos, tais como Ácido aminobutírico γ , Neuropeptídeo Y, Neurotensina, β Endorfina, polipeptídeo Vasoativo intestinal e catecolaminas apresentam um papel estimulatório ou inibitório na regulação do funcionamento neuronal do GnRH, por ligar-se e ativar receptores específicos de membrana que estão expressos nos neurônios de GnRH.

Com a proximidade da primeira ovulação, desenvolve-se um efeito inibitório agudo dos opióides endógenos. A supressão dessa inibição mostra que ela é acompanhada de um efeito estimulatório dos neurônios sobre a secreção de GnRH. A diminuição progressiva do efeito inibitório dos opióides ajusta o período em que ocorrerá a primeira ovulação. O efeito supressor dos opióides parece acontecer, em parte, através da inibição do sistema neuronal dopaminérgico, ou pela inibição generalizada dos neurônios secretores de GnRH a outros estímulos excitatórios (HONARAMOOZ et al., 2000).

SMITH; JENNES (2001) revelaram que o estradiol direciona a secreção de GnRH, por acoplar sinais neuronais circadianos da região supraiasmática aos neurotransmissores e neuropeptídeos que regulam a secreção de GnRH. Por sua vez, em trabalhos realizados anteriormente, DAY et al (1987) demonstraram que a distribuição de neurônios de GnRH no hipotálamo, durante o desenvolvimento embrionário, estava determinado bem antes do nascimento na maioria das espécies. No entanto, suas funções de morfologia e poder de biossíntese ainda mostravam-se imaturas. Ainda, o conteúdo hipotalâmico e o número de receptores para o GnRH não muda durante a maturação sexual das novilhas. Desta forma, a regulação do início da puberdade em fêmeas pré-púberes é dependente da maturação dos neurônios de GnRH e não da falta de receptores para esse fator liberador na hipófise anterior.

DAY et al. (1987) mostraram, também, que a diminuição do feedback realizado pelo estradiol, na secreção do LH, durante o período pré-puberal em novilhas, pode resultar de uma diminuição na concentração de locais de ligação para o mesmo no hipotálamo e hipófise

anterior. Os resultados revelaram uma diminuição na densidade de receptores para o estradiol na região do hipotálamo anterior, médio basal e hipófise anterior, nas proximidades do surgimento da puberdade. Entretanto, os receptores para o GnRH, na hipófise anterior, não apresentaram mudanças nesse momento. É sugerido que a diminuição nos locais de ligação para o estradiol, 50 dias antes de iniciar a puberdade, leve a supressão do feedback negativo sobre a secreção de LH, provocando o aumento de liberação pulsátil do mesmo. Sendo assim, a frequência da liberação pulsátil de LH torna-se o melhor indicador do momento da puberdade e, o aumento de frequência de pulso estimula o crescimento folicular e a síntese de esteróides no ovário.

Também, o aumento pré-puberal no LH pode resultar de um decréscimo na habilidade do estradiol em inibir a secreção de GnRH do hipotálamo e de uma diminuição no feedback negativo, causado por ele diretamente na hipófise, uma vez que a responsividade hipofisiária ao GnRH aumenta no período pré-puberal. Com isto, quando é suprimido o efeito de feedback negativo do estradiol na secreção do LH, os folículos aumentam a produção de estradiol, o que causa a primeira onda pré ovulatória de LH (ovulação) e o surgimento da puberdade.

Dessa forma, o mecanismo de contenção da atividade gonadal das fêmeas bovinas pré-púberes envolve um período inicial pós-natal, em que o mecanismo gonadostático ainda não está bem desenvolvido e o bloqueio acontece precariamente por uma inibição central. Após o quinto mês, a gônada secreta estradiol, inibindo a secreção de GnRH, evento que diminui progressivamente com a maturação sexual. Paralelamente, o Sistema Nervoso Central se torna mais responsivo a neuro-hormônios estimuladores, como a norepinefrina. Para conter essa onda de estímulos, o sistema opioidérgico assume o bloqueio até que ocorra a primeira ovulação (WOLFE et al., 1991).

2.2.2 Fase lútea de curta duração

A maioria das novilhas que apresentam um estro puberal, ao seu primeiro comportamento estral observado, também têm uma elevação transitória dos níveis plasmáticos das concentrações de progesterona antes desse primeiro estro. Esta elevação foi maior em novilhas mostrando estro puberal, em relação àquelas que não o mostraram (KINDER et al., 1987). Nesse sentido, GONZALEZ – PADILLA (1975) detectaram dois incrementos das concentrações de progesterona no período pré-puberal, precedendo a puberdade em novilhas. Estes aumentos da progesterona devem desempenhar um papel importante nas mudanças

endócrinas, levando ao estabelecimento de secreções de gonadotrofinas e hormônios gonadais que são característicos da fêmea adulta.

Quando as novilhas foram ovariectomizadas durante o período de aumento dos níveis de progesterona, estes diminuíram a concentrações basais pré-púberes. Isto provou, de que a origem da progesterona era ovariana. Por outro lado, os exames microscópicos dos ovários revelaram a presença de um tecido luteal embebido dentro do ovário, o qual não pode ser observado quando avaliado em sua superfície (BERARDINELLI et al., 1979). Este evento acontece, também, em cordeiras pré-púberes em sua ovulação inicial, em ovelhas em anestro estacional, em vacas no pós-parto e em primatas pré-púberes. Ainda, a indução da ovulação pelo emprego de GnRH em ovelhas no anestro e em vacas no período de pós-parto leva ao aparecimento de um corpo lúteo de vida curta (HUNTER, MG., 1991).

Da mesma maneira, a ovulação pode preceder algumas, mas não todas, às elevações nos níveis de progesterona. Portanto, em alguns casos, a primeira ovulação é sucedida pela formação de um corpo lúteo de vida curta e, em outras, a própria ovulação falha em ocorrer. Essas tentativas de ovulação, seguidas pela ocorrência de ovulações silenciosas, é o que acontece muitas vezes ao redor do momento do início da puberdade em novilhas (MORAN et al., 1989). Neste sentido, QUIRKE et al. (1985) verificaram um número médio de 1,6 ovulações antes da ocorrência do primeiro comportamento estral em cordeiras de diferentes raças. Isto reflete que essas cordeiras ovularam mais do que uma vez, antes de exibirem seu primeiro comportamento estral.

Tratando-se de vacas de corte no período pós-parto, como citado anteriormente, uma curta fase lútea ocorre seguindo à primeira ovulação. Esta curta exposição a progesterona é pensada ser necessária para reprogramar o eixo reprodutivo e retomar, assim, uma ciclicidade estral normal. Em continuação a essa primeira exposição a progesterona pós-parto, os receptores para oxitocina foram down-regulados e uma fase lútea de duração normal foi estabelecida (ZOLLERS et al., 1993).

Os animais cobertos ao início dessa fase de ciclo curto conceberam, e seus embriões foram transportados ao útero (BREUEL et al., 1993). Entretanto, eles não se tornam prenhes, uma vez que o corpo lúteo formado regrediu antes que o reconhecimento materno da prenhez tenha ocorrido. Além disso, reduzir ou eliminar os ciclos curtos estrais expondo as vacas em anestro a progesterona, também aumentou a proporção delas que formaram um corpo lúteo normal em continuação ao tratamento (FIKE et al., 1997) e, nessas vacas pós-parto, como em novilhas peri-puberais, o gestágeno induziu a ovulação (YAVAS; WALTON, 2000; HALL et al., 1997).

Recentemente, SILVEIRA et al. (2005) procuraram elucidar a ação dos gestágenos, especificamente o acetato de medroxi-progesterona (MAP) e o benzoato de estradiol (BE) no mecanismo de regressão prematura do primeiro corpo lúteo pós-parto. Nesse sentido, o efeito da pré-exposição da ação do MAP e do BE na expressão dos receptores de estrógeno (sub-unidades alfa e beta) junto ao receptor de progesterona no endométrio e corpo lúteo foram avaliados após, a primeira ovulação pós-parto.

Essa pré-exposição, no primeiro ciclo estral pós-parto, resultou em uma maior expressão endometrial do receptor de progesterona nos grupos que receberam MAP em relação ao grupo sem MAP. Além disso, mostrou um bloqueio da expressão dos receptores beta de estrógeno no tecido endometrial. Em relação ao corpo lúteo, os animais sem MAP apresentaram uma maior expressão desses receptores o que indicou regressão luteal. Por outro lado, os animais que receberam MAP, a altura do epitélio glandular endometrial e o número total de células luteais grandes foram maiores do que no grupo controle, sem MAP. A *upregulation* nos receptores de progesterona (RP) endometriais provocada pela associação de MAP e BE, deixa evidente a inibição da cascata luteolítica, após a primeira ovulação pós-parto. Ainda, o importante bloqueio nos RE β do endométrio, causado pela pré-exposição aos gestágenos, demonstra fase de diestro, comprovando o mecanismo de proteção à luteólise prematura do primeiro CL pós-parto. Este quadro é sugerido acontecer também, na novilha ao início da puberdade.

O uso de gestágenos para induzir a puberdade em novilhas pré-púberes foi relatado em vários estudos experimentais (GONZALEZ-PADILLA et al., 1975; ANDERSON et al., 1996). A remoção do implante com gestágeno induz a puberdade em uma alta percentagem de fêmeas, porém a fertilidade ao primeiro estro aumenta com a idade da novilha (KINDER et al., 1987). Portanto, o pré-tratamento com gestágenos antes da indução da ovulação pode iniciar a ciclicidade estral e eliminar, ou ao menos reduzir, a ocorrência de ciclos estrais curtos.

2.3 DESENVOLVIMENTO E DINÂMICA FOLICULAR

2.3.1 Desenvolvimento folicular na espécie Bovina

O crescimento folicular começa na vida fetal antes do parto. No ovário fetal bovino, a região cortical e a medular podem ser identificadas entre os 40 aos 70 dias pós-concepção, e a

oogônia entra em meiose entre os dias 75 a 80, continuando até ao redor dos 150 dias de gestação (ERICKSON, 1966). Em determinada etapa, o oócito passa a ser rodeado por uma simples camada de células da granulosa, de forma achatada (células da pré-granulosa), e torna-se enclausurado em uma membrana basal, a formar os folículos *primordiais* (VAN VOORHIS, 1999). Estes folículos são verificados diretamente na córtex ovariana, sobre a superfície do epitélio e rodeando o ovário por inteiro (VAN WEZEL; RODGERS, 1996), compondo um pool que apresenta ao redor de 133.000 folículos no ovário da fêmea, até a idade de 4 a 6 anos. Após este momento, inicia-se uma redução lenta, através de atresia e/ou ovulação, chegando a fêmea, ao redor dos 20 anos de idade, ao estoque de quase zero (ERICKSON, 1966).

A membrana basal, que circunda as células da pré-granulosa nesses folículos, separa os compartimentos das células da teca e granulosa durante o desenvolvimento folicular. Essa membrana consiste principalmente de Colágeno tipo IV, laminina e fibronectina (BAGAVANDOSS et al., 1983), sofrendo um extensivo remodelamento durante o processo de crescimento. Na espécie bovina os folículos primordiais aumentam ao redor de 3.17×10^5 na sua superfície de área, tornando-se o folículo pré-ovulatório (VAN WEZEL; RODGERS, 1996), e a origem celular da membrana basal pode vir a ser do compartimento da teca ou granulosa (BAGAVANDOSS et al., 1983; LAVRANOS et al., 1994; ZHAO; LUCK, 1995).

O processo de recrutamento inicia com a formação dos folículos ditos *primários*, nos quais, as células que o rodeiam tornam-se cubóides em seu formato e proliferam (células da granulosa). A partir do momento que estas células se multiplicam, e um número maior de camadas celulares rodeiam o oócito, o folículo passa a denominar-se *secundário*. Então, cavidades intracelulares desenvolvem-se e tornam-se cheias de fluido folicular. Essas cavidades, ao reunirem-se, formam o antro folicular, constituindo, a partir desse momento, os folículos ditos, *terciários*. Estes folículos durante seu crescimento poderão vir a tornar-se, dominantes ou, entrar em atresia.

Os fatores que ativam os folículos primordiais a entrarem em um grupo de folículos em crescimento ainda não estão totalmente elucidados. Entretanto, o cultivo de seções corticais de ovários fetais bovinos, diminuiu a proporção de folículos primordiais e aumentou a proporção de folículos primários (WANDJI et al., 1996). Assim, a remoção de um inibidor ovariano local ou o acesso aumentado a nutrientes pode levar a que os folículos primordiais iniciem seu crescimento. Uma vez que esses folículos entram em desenvolvimento eles poderão vir a sofrer o evento da atresia ou culminando com a ovulação. Até hoje, pouco se tem revelado sobre a regulação do crescimento de folículos pré-antrais. No entanto, o

hormônio folículo estimulante (FSH), fatores de crescimento, esteróides ovarianos e o oócito são sugeridos como indutores ou reguladores desse evento (ADVIS et al., 1989; WANDJI et al., 1992; KUMAR et al., 1997).

O crescimento de folículos ao redor de 2mm é independente de gonadotrofinas, já que, BRAW-TAL; YOSSEFI (1997), observaram o crescimento de folículos primordiais *in vitro* na ausência delas em meio livre de soro. No entanto, existem evidências de que receptores para o FSH seriam ativos funcionalmente, durante o desenvolvimento pré-antral. Em ovários bovinos, fetais e adultos, a expressão desses receptores foi detectada em folículos, apresentando uma ou duas camadas de células da granulosa (XU et al., 1995; PERRY et al., 2000), e a ligação do FSH foi observada em células da granulosa de folículos primários (WANDJI et al., 1992).

Seções corticais ovarianas de ratas em cultivo, quando adicionado FSH e hCG, mostraram um aumento no número de folículos com mais do que seis camadas de células da granulosa e com a presença das células da teca, sugerindo que o receptor para o FSH em folículos pré-antrais foi capaz de iniciar os mecanismos de sinal de tradução (PARROT; SKINER, 1999). Entretanto, o desenvolvimento folicular foi arrestado no estágio de folículo primário em animais knockout para FSH sem anormalidades residindo em oócitos, células da teca e granulosa (KUMAR et al., 1997). O crescimento e diferenciação posterior de um folículo primordial em um folículo ovulatório leva ao redor de 60 dias (LUSSIER et al., 1987). Por outro lado, os folículos antrais, com diâmetro igual ou maior do que 2mm, são responsivos à gonadotrofinas demonstrado pela ocorrência de ondas de crescimento folicular (WEBB et al., 1999).

2.3.2 Dinâmica Folicular na espécie Bovina

O acompanhamento diário das estruturas ovarianas, através do emprego da ultrasonografia, revelou que os bovinos apresentam ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral. Este modelo é repetido em quase todas as etapas de vida da fêmea. Além do ciclo estral, acontece também, durante os períodos de gestação, do pós-parto e da pré-puberdade, ao redor de duas semanas de vida (PIERSON; GINTHER, 1984; 1988). Em fêmeas gestantes as ondas foliculares se tornam menos pronunciadas durante os últimos cinco meses de gestação, sendo os diâmetros dos folículos dominantes e subordinados menores (GIBBONS et al., 1999).

Este processo de continuado crescimento e regressão dos folículos antrais, que leva ao desenvolvimento de um folículo pré-ovulatório, é conhecido como dinâmica folicular. Uma fêmea bovina apresenta, geralmente, entre duas a três ondas de crescimento folicular e, raramente, de uma a quatro ondas foliculares (SÁVIO et al., 1988; GINTHER et al., 1989). O folículo pré-ovulatório é derivado da última onda, sendo o folículo dominante capaz de ovular se a luteólise ocorrer naturalmente ou de forma induzida (FORTUNE, 1994). Ciclos estrais com três ondas foliculares têm maior duração do que aqueles com duas ondas. Isso porque o retardamento do estro, devido à falha da ovulação do segundo folículo dominante, faz com que o terceiro folículo da terceira onda requeira um período adicional para completar seu desenvolvimento antes da ovulação. Em ciclos com três ondas de crescimento folicular as ondas emergem em média nos dias 2, 9 e 16 e, nos ciclos com duas ondas, nos dias 2 e 11 (LUCY et al., 1992; FORTUNE, 1994; FORTUNE et al., 2001).

Em média, 95% dos ciclos estrais mostram de duas a três ondas de crescimento folicular. Apesar de todos os fatores que afetam o desenvolvimento folicular não estarem totalmente elucidados, pode-se afirmar que a fertilidade não é afetada pelo número de ondas. No entanto, fatores de origem nutricionais, ambientais (estresse calórico), ligados à raça, à idade, ao anestro lactacional, podem vir a modificar o padrão de crescimento folicular. A fêmea amamentando apresenta, também, ondas de crescimento folicular. Porém, o folículo dominante resultante dessas é incapaz de ovular pela inibição exercida pela mamada na liberação da onda pré-ovulatória de LH. O balanço energético negativo presente no período de pós-parto, tanto em vacas de corte como de leite, leva à uma inibição da liberação de LH, o que retarda o retorno ao estro (LUCY et al., 1992). A partir de sete dias pós-parto, já se encontram presentes no ovário folículos com diâmetro em torno de 8mm ou mais. O número desses folículos aumenta com o aumento do período pós-parto em fêmeas acíclicas e amamentando (SPICER; ECHTERNKAMP, 1986).

A dinâmica folicular em animais pré-púberes e, prestes a alcançar a puberdade, relembra aquela da fêmea no pós-parto. Também, na pré-puberdade, existe a ocorrência de ondas de crescimento folicular (EVANS et al., 1994a, 1994b; ADAMS et al., 1994) nas quais o diâmetro dos folículos dominantes e subordinados foi verificado que aumenta com o avanço da idade, sendo maior entre 2 a 8 e 24 a 40 semanas. O intervalo inter-ovulatório (que é o período entre duas ovulações seqüenciais) após a primeira ovulação foi curto (7.7 dias), contendo apenas uma onda folicular com um corpo lúteo resultante dessa primeira ovulação, tendo um diâmetro menor, e uma vida curta também menor, em relação ao corpo lúteo subsequente (EVANS et al., 1994a; ADAMS, 1998). Por outro lado, o segundo intervalo

inter-ovulatório (20,3 dias) foi similar na sua duração ao intervalo inter-ovulatório subsequente (EVANS et al., 1994a). Todos os mecanismos que controlam a dinâmica folicular em novilhas sexualmente maduras estão presentes já em novilhas pré-púberes com 36 semanas de idade (ADAMS, 1999).

A maioria dos estádios de desenvolvimento folicular têm sido caracterizados e algumas definições relacionadas ao evento são aceitas. Inicialmente, a fase de *recrutamento*, na qual um grupo de folículos em torno de 3mm de diâmetro são estimulados por um aumento transitório do FSH. A inibição tanto de FSH como do hormônio luteinizante (LH), suprime o crescimento folicular ao redor dos 2 a 4mm. Entretanto, quando níveis fisiológicos de FSH foram aplicados por 48h o crescimento de folículos com 5 a 8mm foi estimulado (GONG et al., 1996). A máxima concentração de FSH ocorreu quando o futuro folículo dominante atingiu uma média de 4mm de diâmetro, após o qual essas concentrações declinaram, alcançando níveis basais ao momento da fase de *seleção* (GINTHER et al., 1996; 2000).

Trabalhos experimentais avaliaram as mudanças na expressão de receptores para FSH e enzimas esteróidogênicas, em torno do momento do recrutamento folicular. A expressão de RNAm para receptores de FSH aumentaram nos estádios iniciais (3 a 5mm) do recrutamento, (12 a 48h após o início da onda), permanecendo constante durante o período de 96h (BAO et al., 1997). Por outro lado, a expressão de enzimas esteróidogênicas tipo: citocromo P 450 clivagem de cadeia (P450 scc), citocromo P 450 17 α - hidroxilase (P 450 17 α), 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β HSD) e citocromo P450 aromatase (P450 arom) também foram caracterizadas durante essa fase (BAO; GARVERICK, 1998).

A expressão de P450 scc e P450 arom, foram detectadas nas células da granulosa de um grupo de folículos (> 4mm) nas 12 h do início da onda de crescimento folicular (BAO et al., 1997) e, após as 12h, essa expressão se mantém nos mesmos folículos que crescem dos 6 aos 9mm de diâmetro (BAO; GARVERICK, 1998). Já a expressão do RNAm da enzima P 450 17 α foi detectada na camada de células da teca dos folículos recrutados com diâmetro menor do que 5mm, aumentando esta expressão durante os momentos iniciais do recrutamento, de 12 a 24 h, após o início da onda (BAO et al., 1997).

Procurando determinar os mecanismos que estão associados com o recrutamento folicular GONG et al. (1996) desenvolveram um modelo bovino de agonista do GnRH, no qual com o emprego deste os animais são tornados hipogonadotrópicos e o crescimento folicular é arrestado no diâmetro de mais ou menos 4mm. A reposição do FSH, neste modelo, permitiu a ocorrência do recrutamento e o desenvolvimento folicular até aproximadamente

8mm. GARVERICK et al. (2002) utilizando este mesmo modelo de agonista de GnRH, verificou a indução pelo FSH da expressão das enzimas P 450 scc e P450 arom nas células da granulosa e a expressão aumentada da mesma P 450 scc, nas células da teca durante o recrutamento do desenvolvimento folicular. Além destas, também o RNAm da proteína reguladora esteróidogênica aguda (StAR) foi verificada nas células da teca de folículos saudáveis, com diâmetro de 4mm. Esta proteína reguladora facilita o transporte de colesterol da membrana externa mitocondrial em direção à membrana interna e é considerada como um passo limitante na esteróidogênese (BAO et al., 1998).

Ao final da fase de crescimento comum, inicia-se a chamada fase de divergência ou seleção. A mesma é caracterizada pelo crescimento continuado do maior folículo, denominado de folículo dominante, e uma redução do crescimento dos folículos menores do grupo, os quais tornam-se os subordinados. O diâmetro médio do folículo dominante, no momento da seleção, é de 8,5mm (KULICK et al., 2001). Os folículos subordinados atingem diâmetro menor que os folículos dominantes, independentemente do número de ondas foliculares. O diâmetro máximo dos folículos subordinados varia de 6,2 a 7,1mm (BORGES et al., 2001). Estes começam a regredir aparentemente no momento em que o folículo destinado a ovular torna-se dominante (PIERSON; GINTHER, 1988).

A diferença no diâmetro entre folículos, referida como seleção ou divergência folicular, é consequência de uma taxa de crescimento aumentada do folículo dominante em relação aos seus subordinados. Algumas características distinguem os folículos dominantes dos recrutados. Dentre elas está uma maior concentração de estradiol no líquido folicular do folículo dominante. Além disso, *in vitro*, suas células da granulosa secretam mais estradiol. A secreção de estradiol, e talvez andrógenos, está associada à fase final do aumento nas concentrações de FSH e a manutenção de seus níveis basais. A expressão do RNAm, para o receptor de FSH nas células da granulosa e para o LH nas células da teca, são maiores nos folículos dominantes do que nos recrutados.

Nas células da granulosa, os níveis de RNAm para a enzima P450_{arom} encontram-se elevados entre os dias 0 e 2 do início da onda. No entanto, níveis de RNAm para a enzima P450 17 α hidroxilase (converte progestinas em andrógenos) nas células da teca, estão elevados entre os dias 2 e 4, junto às concentrações altas de estradiol do folículo selecionado no dia 4. Os níveis de RNAm para a enzima P450_{scc}, nas células da granulosa, também estão aumentadas no mesmo folículo em relação aos folículos recrutados nos dias 0 e 2. Por outro lado, os níveis de RNAm, para a proteína StAR, não é detectada nas células da granulosa.

Porém, são nas células da teca, no dia 2 da onda, no folículo selecionado (FORTUNE et al., 2001).

A proteína StAR, como citado anteriormente, está envolvida na regulação do transporte do colesterol, através da membrana mitocondrial, para ser convertido em pregnenolona. Altos níveis de colesterol, dentro das mitocôndrias das células da teca, são requeridos para sintetizar andrógenos, os quais são metabolizados pelas células da granulosa em estradiol 17β . É sugerido que a redução da produção de andrógenos pelas células da teca está associada à atresia folicular (BAO; GARVERICK, 1998). Pelo citado, o folículo dominante apresenta maiores níveis de RNAm para enzimas responsáveis pela síntese de andrógenos e progestágenos e para receptores de gonadotrofinas, do que os folículos recrutados (FORTUNE et al., 2001).

EVANS; FORTUNE (1997) procuraram associar as diferenças, no modelo de expressão do RNAm, para os receptores de LH e FSH ao processo de seleção do folículo dominante na espécie bovina. Desta forma, folículos dominantes e subordinados foram coletados em torno do momento da seleção folicular (dia 2 a 3 da onda), com a finalidade, dentre outras, de medir a expressão de RNAm para os receptores de gonadotrofinas e produção de estradiol. Os resultados demonstraram uma maior expressão de RNAm para o receptor de FSH nas células da granulosa do folículo dominante, coletado em torno do dia 3 da onda, comparado aos demais (subordinados). No entanto, no dia 2 da onda folicular, a expressão entre os folículos não difere. Em relação à expressão para o receptor de LH, nas células da granulosa, não há diferenças entre as classes de folículos e os dias avaliados. Por outro lado, níveis detectáveis surgiram nas células da teca. Apesar de não serem diferentes entre os folículos dominantes e subordinados, no dia 2 da onda folicular, os folículos subordinados têm uma menor expressão do RNAm para receptor de LH no dia 3. A secreção de estradiol, nos folículos dominantes, é maior do que nos subordinados, pelo dia 2 da onda folicular.

O processo de seleção folicular ocorre em ausência de níveis de RNAm para receptores de LH detectáveis nas células da granulosa. Também, ocorre na ausência de diferenças entre as classes de folículos avaliadas, quanto aos níveis de RNAm para receptor de FSH nas células da granulosa e receptor de LH nas células da teca. Isso sugere que a regulação da expressão para receptores de gonadotrofinas não é parte do processo de seleção do folículo dominante.

GINTHER et al. (2001), após a redução experimental do LH, seguindo o momento esperado da seleção folicular (8,5 - 9mm), obteve uma redução do diâmetro do maior folículo,

concentrações reduzidas no fluido folicular de estradiol e IGF livre. As concentrações de LH, quando reduzidas, antes do momento esperado da seleção não afetou o diâmetro dos dois maiores folículos ou as concentrações de fatores no fluido folicular do maior folículo. Os resultados obtidos indicam que o LH manifesta seu papel no crescimento e função do maior folículo, após o começo da seleção folicular. Por outro lado, altos níveis de IGF livre encontrados no fluido folicular do maior folículo, acenam para a importância desse peptídeo na foliculogênese.

Nesse sentido, a atuação do sistema IGF, no desenvolvimento folicular, é dado por estimular a proliferação das células da granulosa e, juntamente as gonadotrofinas, promover a diferenciação das células do folículo. O sistema IGF é composto dos dois ligantes (IGF I e II), dois receptores (tipo I e II), e seis proteínas ligadoras de IGF, as IGFBPs (1, 2, 3, 4, 5 e 6). As ações do IGF são mediadas principalmente através dos receptores tipo I e moduladas pelas IGFBPs, as quais inibem a diferenciação e crescimento folicular induzido pelas gonadotrofinas. Desta forma, mudanças nos níveis das IGFBPs levam a mudanças na biodisponibilidade de IGF, regulando a ação das gonadotrofinas nas células do folículo (FORTUNE et al., 2001).

RIVERA et al. (2001), procurando demonstrar a influência das mudanças nos níveis das IGFBPs no processo de seleção folicular, detiveram-se no possível papel da IGFBP-4 no referido processo. É importante salientar que a IGFBP-4 é a proteína de ligação que inibe a ação do IGF em uma variedade de tecidos, os folículos subordinados têm altos níveis de IGFBP-4 em relação ao dominante e a esteroidogênese é inibida pelas células ovarianas *in vitro*. Os efeitos inibitórios sobre o IGF podem ser antagonizados por ação de proteases específicas para IGFBP-4.

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

Portanto, o crescimento do folículo, antes da fase de seleção, requer para o seu desenvolvimento a presença do FSH. Após a referida fase, pulsos de LH são requeridos. Então, as concentrações de FSH são progressivamente diminuídas, até alcançarem seus níveis basais, no momento da seleção folicular, no qual o continuado crescimento do folículo e a produção folicular de estradiol, necessitam pulsos de LH. O folículo dominante continua seu desenvolvimento até que a quantidade de estradiol seja suficiente para a indução da onda ovulatória de LH e para que ocorra a ovulação do folículo (WILTBANK et al., 2002).

2.4 SINCRONIZAÇÃO E INDUÇÃO DE ESTRO NOS BOVINOS

A sincronização, e/ou indução de estros, é a biotécnica reprodutiva que permite manipular o ciclo estral, com a utilização de substâncias hormonais. As ondas foliculares podem ser também controladas por meios físicos. A cauterização de um folículo dominante ou a sua supressão com fluído folicular bovino, livre de esteróides, é seguido por uma liberação de FSH e a emergência de uma nova onda (MAPLETOFT et al., 2000). Da mesma forma, a aspiração folicular guiada pelo ultrassom, técnica esta utilizada em programas de FIV para obtenção de oócitos, resultam na emergência sincronizada de uma nova onda folicular 1,5 dias após (BÓ et al., 1995).

Em termos práticos, é importante diferenciar sincronização de indução de estros. A sincronização consiste em encurtar ou prolongar o ciclo estral através da utilização de hormônios ou associações hormonais que induzam a luteólise ou prolonguem a vida do corpo lúteo. Ao contrário, a indução de estros consiste em induzir o estro em fêmeas que estejam em anestro por meio, também, do emprego de hormônios ou práticas de manejo. Assim, são processos distintos e aplicáveis a diferentes categorias de animais (MORAES et al., 2001).

A história desta biotécnica, junto ao emprego da inseminação artificial na espécie bovina, é o testemunho de como as descobertas na ciência básica podem ser aplicadas ao avanço das técnicas utilizadas para o manejo reprodutivo nestes animais de produção (BEAL, 2002). O primeiro sucesso na sincronização de estros foi relatado em 1948 (CHRISTIAN; CASIDA, 1948) e, a partir desta data, a pesquisa tem focado no desenvolvimento de programas e produtos de sincronização. Inúmeras revisões sobre o assunto refletem o nível de interesse que o tema “sincronização e ou indução de estros” desperta (ODDE, 1990; LARSON; BALL, 1992; SEGUIN, 1997; WILTBANK, 1997; ROCHE et al., 1997).

Historicamente, o controle do ciclo estral em bovinos tem sido baseado em dois princípios. O primeiro incluiu programas caracterizados pelo controle da fase lútea, quer dizer, sem o conhecimento preciso da dinâmica folicular e controlando a duração de vida do corpo lúteo (HANSEL; CONVEY, 1983). O segundo, e mais recente método, envolve a manipulação tanto da dinâmica folicular como luteal (MAPLETOFT et al., 2000)

O controle do corpo lúteo, que resulta em estro e ovulação, é facilitado pelo emprego de progesterona e ou progestágenos (substâncias estas similares a progesterona) por um determinado período de tempo. Durante o tratamento com o esteróide a ocorrência de estro e ovulação acontece dentro de 2 a 8 dias após a retirada da fonte de progestágeno. A segunda maneira de realizar o controle do corpo lúteo envolve a administração de um agente luteolítico, o qual encurta a vida do mesmo e o surgimento de estro e ovulação em um período de 48 a 120 h após a aplicação.

Pelo referido anteriormente, as principais substâncias empregadas na sincronização de estros são a prostaglandina e seus análogos (ácidos graxos com propriedades tipo hormonal) e a progesterona e os progestágenos (hormônios esteróides). Buscando melhorar a eficiência dos programas de sincronização baseados no emprego de progesterona e ou prostaglandina (PGF 2 α), o crescimento folicular e a regressão do corpo lúteo são sincronizados pela utilização de estrógenos, GnRH e seus agonistas, quer dizer, esteróides e hormônios polipeptídeos, respectivamente (MACMILLAN; THATCHER, 1991; PURSLEY et al., 1995). Além destas substâncias, alguns programas incluem preparações de gonadotrofinas placentárias tipo, gonadotrofina coriônica equina (eCG) (MACIEL et al., 2001; BASTOS et al., 2003; BRAGANÇA et al., 2004; SILVEIRA et al., 2005) uma glicoproteína com atividade rica de FSH, e a gonadotrofina coriônica humana (hCG), glicoproteína com atividade de LH (BARROS; NOGUEIRA, 2001).

2.4.1 A Progesterona e/ou progestágenos no controle do ciclo estral em fêmeas bovinas

A história da progesterona data do ano de 1903, quando um jovem ginecologista de nome Ludwig Fraenkel verificou que, a remoção de um corpo lúteo do ovário de uma coelha a poucos dias da cobertura, evitava a gestação. Esta foi a primeira evidência de que o ovário, além de liberar o oócito, contribuía com o corpo lúteo para a manutenção da gestação. O nome progesterona foi dado por Willard Allen (HEAP; FLINT, 1979), no entanto, o

isolamento e síntese dessa substância classificada quimicamente como esteróide foi, pela primeira vez, relatado em 1929 (CORNER; ALLEN, 1929).

A mesma é produzida pelo corpo lúteo e se apresenta no sangue de forma livre e ligada à proteínas, com componentes de desaparecimento rápida (2 a 3 minutos), média (10 a 28 minutos), e lenta (54 minutos; IMORI, 1967; WATSON, 1986). Além de manter a gestação, prepara o cérebro para que os estrógenos provoquem o comportamento estral e, diminui, também, a frequência de liberação de GnRH. Para a obtenção de uma função lútea normal, seguindo a maturação e ovulação folicular logo após, a aplicação de gonadotrofinas e GnRH, é necessário um pré-tratamento com progesterona, buscando um adequado desenvolvimento de receptores para o LH no folículo pré- ovulatório (HUNTER et al., 1986; INSKEEP et al., 1988). Ao ser empregada para induzir e sincronizar o estro suas principais ações são as de retardar qualquer maturação folicular que pudesse ter iniciado durante o tratamento e, também, assegurar o comportamento estral e uma função lútea normal, associadas com a maturação folicular e ovulação nos dias seguintes ao seu emprego (ODDE, 1990).

CHRISTIAN; CASIDA (1948) foram os primeiros a confirmar o sucesso da aplicação de progesterona na sincronização de estro na espécie bovina. Para isso, novilhas eram tratadas com injeções diárias de 25 ou 50mg de progesterona, pelo período de 14 dias, iniciando no dia 14 do ciclo estral. Embora o estro e a ovulação fossem suprimidos nas fêmeas tratadas com 50mg do esteróide, estas apresentavam estro nos 5 a 6 dias após a suspensão do tratamento. Por outro lado, as novilhas que receberam a dose de 25mg de progesterona, também tiveram seu estro suprimido. No entanto, apenas 50% delas tiveram sua ovulação evitada (CHRISTIAN; CASIDA, 1948).

Trabalhos experimentais posteriores verificaram que a progesterona, quando utilizada por períodos maiores do que o tempo de duração do corpo lúteo, (> 14 dias) resultavam em um estro sincronizado. Porém, com baixa fertilidade (TRIMBERGER; HANSEL, 1955; WILTBANK et al., 1965). O tratamento de novilhas ciclando ou mesmo vacas com baixos níveis de progesterona resultou na formação de folículos persistentes até a retirada do pessário vaginal (SIROIS; FORTUNE, 1990; FORTUNE et al., 2001). Este esteróide, quando aplicado junto à presença de um corpo lúteo, suprime o crescimento do folículo dominante em uma maneira dose dependente (ADAMS et al., 1992). Entretanto, as doses de progesterona empregadas ao controle de estro no bovino apresentam um menor efeito supressivo na secreção de LH do que o mostrado pelo corpo lúteo do ciclo. Os folículos persistentes são caracterizados por um período de dominância aumentado e uma maior produção de estradiol (SIROIS; FORTUNE, 1990), surgindo por uma aumentada pulsatilidade de LH, que ocorre

logo após a regressão do corpo lúteo. Porém, a ovulação fica reprimida pelos baixos níveis de progesterona empregados na sincronização.

Nesse sentido, MIHM et al. (1999), estudando o efeito da persistência do folículo dominante na maturação do oócito, demonstrou que quase todos os oócitos recuperados de folículos, que tiveram sua dominância aumentada por sobre um período de 12 dias, iniciaram sua maturação final antes do surgimento da onda endógena de LH, fato contrário ao acontecido em oócitos de folículos dominantes por 4 dias. A maturação final do oócito ocorreu de forma sincronizada no núcleo e citoplasma. No entanto, a maturação folicular e do oócito foi diferenciada, mostrando pequena expansão das células do cúmulus, apesar da ruptura da vesícula germinal e da possibilidade dos folículos não demonstrarem mudanças na esteroidogênese e inibina "A", indicativos da luteinização.

Os folículos, ainda persistentes, demonstraram alterações intrafoliculares na esteroidogênese e inibina "A", as quais podem preceder o início de atresia. Além disso, 50% dos oócitos recuperados de folículos persistentes mostraram grandes vacúolos, indicando possíveis mudanças degenerativas dentro do ooplasma. A quebra da vesícula germinal foi acompanhada pelo processo final da retração das células do cúmulus e uma reorganização das organelas intracelulares, característica da retomada da meiose no folículo dominante, após a onda de gonadotrofina. Portanto, a maturação final do oócito à metáfase I é iniciada, na maioria dos folículos dominantes com um período de dominância superior a nove dias, antes da onda de gonadotrofina. Todavia, a habilidade ovulatória é mantida e pode levar à ovulação de um oócito envelhecido, o que se traduz em taxas de prenhez subseqüentes reduzidas.

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

Além disso, a administração pré-puberal de progesterona permite adiantar a puberdade em novilhas. SHORT et al., (1976), por meio de estudo experimental relata que a eficiência dos tratamentos hormonais, em induzir e sincronizar o estro, é maior em novilhas pré-púberes de 13 a 15 meses de idade do que naquelas muito jovens, com menos de 9 meses.

ANDERSON et al. (1996), por outro lado, em trabalho experimental, investigaram o mecanismo pelo qual a administração de progesterona exógena adianta a puberdade em novilhas de corte. Os resultados obtidos nesse experimento permitiram concluir que o

emprego desse hormônio adiantou a puberdade por elevar a secreção de LH após a retirada do mesmo. Além disso, a progesterona acelera o decréscimo do efeito de feedback negativo peripuberal, promovido pelo estradiol na secreção de LH. Resultados alcançados por RASBY et al., (1998) chegaram a mesma conclusão. A eficácia dos progestágenos de induzirem a puberdade é influenciada por alguns fatores, entre os quais se destacam a idade, a raça, o peso corporal e o grau de desenvolvimento folicular da fêmea prévio ao início do tratamento (ANDERSON et al., 1996).

A sincronização com progestágenos baseia-se no princípio de que essas substâncias exógenas podem manter uma concentração sanguínea subluteal de progestágeno, durante o período necessário à permitir a regressão do corpo lúteo. Em ausência de um corpo lúteo, a retirada da fonte de progestágeno resultará em um estro sincronizado (MACMILLAN; PETERSON, 1993). Os progestágenos atuam simulando a presença de um corpo lúteo funcional, provocam uma retro-alimentação negativa sobre a secreção de gonadotrofinas levando 5 a 6 dias após sua suspensão a manifestação de estro, a qual é continuada por ciclos estrais normais (PORRAS; GALLINA, 1992). Essas substâncias sintéticas apresentam uma vida média maior do que a progesterona e tornam-se ativos pela via oral tipo, o acetato de Melengestrol (MGA) (WIRGTH; MALMO, 1992), por via subcutânea, como implantes e, intramuscular como el Norgestomet (17α acetoxi – 11β metil **19** - preg – 4 – ene, 20 – Dione) (MACMILLAN; PETERSON, 1993). No bovino a resposta à sincronização de estro com progestágenos pode ser modificada pela duração do tratamento, o seu estado de ciclicidade da fêmea tratada, seu estado nutricional, sua composição corporal, sua idade, sua raça e a época do ano (PORRAS; GALINA, 1992).

2.4.1.1 Combinações de progesterona e/ ou progestágenos com estradiol no controle do ciclo estral dos bovinos

As baixas taxas de concepção obtidas após o emprego de progestágenos, na forma oral, procurando sincronizar estro nos anos 60, promoveram uma revisão de conceitos por parte dos pesquisadores. Novos fatos renovaram o interesse das equipes de pesquisa no desenvolvimento de esquemas de sincronização, envolvendo progestágenos exógenos. A ação potencializadora do estrógeno junto à progesterona, aliado ao surgimento também da prostaglandina e, posteriormente, de seus análogos como potentes agentes luteolíticos,

condicionou a formação de métodos de sincronização de estros que combinam um curto período de exposição à progestágenos (< 14 dias) com drogas luteolíticas (BEAL, 1996). Esses tratamentos procuram sincronizar o crescimento folicular, de maneira que todos os animais apresentassem um folículo em crescimento e com capacidade de ovular no momento da administração da prostaglandina ou da remoção da fonte de progesterona (BÓ, 2000).

WILTBANK (1961) mediu os efeitos de várias formas e níveis de estrógenos, sozinhos ou em combinações com gonadotrofinas no ciclo estral de novilhas de corte. Seus resultados mostraram que aplicações únicas, variando de 50, 25, 20, 10 e 5mg de valerato de estradiol; de 100, 50 e 25mg de estrona e de 25mg de um produto estrogénico natural, (este produto era 95% estrona e 10^6 UI/g) causavam a regressão inicial de um corpo lúteo em mais de 50% das fêmeas tratadas. Essa regressão aconteceu em torno de 7 dias após a aplicação. Quanto ao uso do valerato de estradiol, os resultados variaram de acordo com o estágio do ciclo estral no momento de sua aplicação. A administração de 5mg desse produto no oitavo dia do ciclo estral causou regressão do corpo lúteo antes do 17º dia do ciclo. As doses de 3 mg e 1mg foram ineficientes. Além disso, o autor conclui que fêmeas que recebem estrógenos ao final do ciclo tendem a apresentar ovários císticos.

WILTBANK; KASSON (1968) procuraram avaliar a eficiência de um método de sincronização de estro, associando estrógeno a um progestágeno oral. Dessa forma, os animais foram alimentados por 9 dias com o DHPA (16- α -17 dihidroxiprogesteronona acetofenonida) nas doses de 75mg e 400 mg/dia/cabeça e uma aplicação de valerato de estradiol na dose de 5mg ao segundo dia de alimentação. O estro foi sincronizado em 95% das 66 novilhas tratadas com 400mg da DHPA e 54% dessas conceberam no estro sincronizado. Entretanto, 52% de 33 novilhas controle conceberam ao primeiro serviço. A redução da dose do progestágeno para 75mg mostrou, da mesma forma, ser eficiente em sincronizar o estro. Ainda, 77% dos animais tratados manifestaram estro em um período de 3 dias, enquanto 72% do grupo controle o manifestaram dentro de 21 dias.

Posteriormente, LEMON (1975) analisou a ação do uso de estrógenos, sozinhos ou em associação com progestágenos, na formação e regressão do corpo lúteo da fêmea cíclica. Para isto, ele comparou o desempenho do benzoato de estradiol junto ao do valerato de estradiol. O efeito luteolítico ocorreu em quase todas as fêmeas que receberam a aplicação de benzoato de estradiol nos dias 9, 12, e 15 do ciclo estral. A regressão luteal aconteceu, em média, três dias antes do que o observado fisiologicamente. Resultados similares foram obtidos nos animais que receberam valerato de estradiol no dia 9, e em menor extensão nos dias 6, 12 e 15. Estes permitiram-lhe sugerir que o benzoato de estradiol é um agente luteolítico mais eficiente

sobre um período maior do ciclo do que o valerato de estradiol. A consequência dos efeitos da aplicação de estrógenos é que a duração de vida do corpo lúteo é alterada, comparada a de um ciclo fisiológico.

BÓ et al. (1993) avaliaram os efeitos do valerato de estradiol no crescimento e regressão dos folículos, em uma onda folicular e na emergência da próxima onda. Com o emprego de ultrassom, as fêmeas que mostravam um corpo lúteo tiveram seu estro sincronizado através de uma aplicação de 500µg de Cloprostenol via muscular. O dia da ovulação foi considerado dia 0. Assim, as fêmeas foram divididas em grupos a receber valerato de estradiol na dose de 5mg nos dias 1, 3 e 6, o que representa o início, metade ou final da fase de crescimento folicular, respectivamente. Os dias 1 e 3 correspondem ao período anterior ou posterior do processo da seleção folicular. O valerato de estradiol suprimiu o crescimento do folículo dominante presente. Os diâmetros desse folículo, em novilhas tratadas nos dias 1 e 3 foram menores do que os do grupo controle. O tratamento no dia 6 não alterou o início da regressão folicular e retardou a emergência da próxima onda. Assim, o efeito supressivo do valerato de estradiol depende do estágio folicular no momento da aplicação.

Em experimento posterior, BÓ et al. (1995) afirmam que o estradiol 17β dado em combinação com um progestágeno, suprime o desenvolvimento de um folículo dominante e resulta na emergência sincronizada de uma nova onda de crescimento folicular 4,3 dias após o tratamento. Desta forma, hormônios esteróides começaram a ser utilizados procurando alterar o crescimento folicular. A progesterona exógena mostrou suprimir o crescimento do folículo de uma maneira dose-dependente, enquanto o estradiol induz o folículo à atresia, dependendo da fase. Segundo BÓ et al. (2000), 1mg IM como 5mg de estradiol 17 β é eficaz em suprimir o crescimento folicular. O efeito supressivo desse esteróide no folículo ovariano em fêmeas tratadas com progestágeno, é exercida indiretamente através de uma rota sistêmica do que diretamente no ovário.

Recentemente, O' ROURKE et al. (2000), por meio de trabalho experimental, demonstraram que a dose e rota de aplicação do benzoato de estradiol afeta as concentrações de FSH e estradiol em sangue. Utilizando o benzoato, por via intravaginal (cápsula de gelatina) e intramuscular, observaram que esta última via de aplicação resulta em uma maior concentração de estradiol na corrente sanguínea, causando uma maior redução nos níveis do FSH do que pela via intravaginal. O estradiol, transitoriamente, suprime o FSH em uma maneira dose-dependente. Entretanto, as concentrações de FSH começam a aumentar 1 a 2

dias após o uso do benzoato de estradiol, enquanto o estradiol em declínio ainda está elevado. As concentrações de estradiol alcançadas dependem do derivado de estradiol empregado. O estradiol 17 β é a forma natural mais potente de estradiol. Na sua absorção, o benzoato de estradiol é imediatamente convertido em estradiol 17 β tendo, assim, potência similar ao mesmo. O valerato de estradiol tem uma forma de ação mais longa, metabolizado em um maior período, sendo mais potente que o benzoato de estradiol.

Além dos estrógenos, a atresia do folículo dominante ovariano tem sido induzida pela administração de progesterona, testosterona ou análogos do GnRH. Por outro lado, a luteinização ou ovulação de um folículo dominante é obtida empregando gonadotrofina coriônica humana (hCG) ou análogos do GnRH (CAVALIERI et al., 1997).

2.4.1.2 Sistemas de aplicação intravaginal de progesterona e/ ou progestágenos em bovinos

Além da forma injetável, o fornecimento de progestágenos através do alimento, da água potável, em implantes sub-cutâneos também os sistemas de liberação intravaginal (esponjas e plástico) são preconizados (para revisão: GORDON, 1976; RATHBONE et al., 2001; MORAES et al., 2001). Alguns dispositivos intravaginais utilizados são: o dispositivo interno de liberação de progesterona (PRID, Ceva - Austrália) e o dispositivo de liberação interna controlada de droga (Eazibreed, CIDR-B, Hamilton, Nova Zelândia) (MACMILLAN; PETERSON, 1993). Eles induzem níveis similares de progesterona plasmática e os mantêm pelo período de 7 a 8 dias, níveis estes, em valores semelhantes aos de uma fase lútea (6 a 8 ng/ml), diminuindo ao redor dos 12 a 14 dias a valores em torno dos 2 a 4ng/ml ou menores ainda (ROCHE; IRELAND, 1981; MUNRO; MOORE, 1986; MUNRO, 1987; SIROIS; FORTUNE, 1990; MACMILLAN; PETERSON, 1993).

O PRID é um anel de aço inoxidável, em forma espiralada, envolto por uma camada de borracha de silicone, a qual é impregnada com 1,55g de progesterona natural. Seu diâmetro aproximado é de 4 cm, e seu comprimento de 12 cm. Ele possui uma corda de nylon em uma de suas extremidades, que facilita sua remoção. As taxas de retenção destes implantes mostraram-se satisfatórias, tanto em novilhas como em vacas. Além do mais, estudos demonstraram que as quantidades de progesterona liberadas pelo produto são suficientes para inibir estro e ovulação (para revisão: RATHBONE et al., 1998).

MAUER et al. (1975) mostraram que esses dispositivos intravaginais aumentam os níveis sanguíneos de progesterona de <1ng/ml a 6ng/ml, dentro de 90 minutos após sua

inserção. As concentrações mantidas são suficientes para prevenir o estro por períodos de 21 dias. Ainda, observaram que as fêmeas manifestaram o estro sincronizado 16 a 48h, após a remoção do PRID. Esse foi mantido por 21 dias. MACMILLAN et al. (1991) citam que as médias das concentrações de progesterona plasmática em novilhas ovariectomizadas, nas 24h após a inserção do PRID variaram de 12ng/ml a 6ng/ml. O aumento nessas concentrações podem ser influenciadas pelo pré-tratamento com estrógeno ou progesterona. Porém, parecem ser menores em animais cíclicos tratados com PRID.

ROCHE (1976) empregou o PRID associado a uma injeção de 5mg de benzoato de estradiol e 50mg de progesterona na sua inserção. Este foi mantido por 12 dias. A taxa de retenção em vacas e novilhas foi de 92% e 98%, respectivamente. Entre 93% das novilhas e 90% das vacas manifestaram estro até 6 dias da remoção do PRID, sendo a maior percentagem de fêmeas em estro nas 48h da remoção do mesmo. As taxas de prenhez ficaram em torno de 50%.

CUMMING et al. (1982) em experimento com gado de leite, relatam que a fase do ciclo estral, na qual o PRID é inserido, é um fator importante que influencia o intervalo entre a sua remoção e a ovulação. Sugerem, ainda, a colocação do PRID na metade da fase luteínica do ciclo (13 a 14 dias) ou a associação deste ao benzoato de estradiol sem levar em conta a fase do ciclo estral. Quando apenas o PRID é inserido sem conhecer o momento do ciclo estral, os níveis de progesterona podem variar amplamente na sua remoção, o que causa variações no momento de manifestação estral e ocorrência da ovulação.

SMITH et al. (1984) combinaram o emprego do PRID por curto período de tempo (6 e 7 dias) a uma aplicação de prostaglandina (25µg) no dia anterior ou na remoção do dispositivo. O grupo controle consistiu de fêmeas que tiveram seu estro controlado durante 25 dias do período reprodutivo. As taxas de prenhez não mostraram diferenças significativas entre os grupos, ficando em 82% no grupo PRID-6 + PG-6; 73% no PRID-7 + PG-6 e 72% no grupo controle. O grupo PRID-7 + PG-6 apresentou um intervalo maior ao início do estro (75h), a partir da aplicação do agente luteolítico, e uma melhor sincronia do mesmo, proporcionando um controle sobre o estro e a ovulação.

No Brasil, objetivando avaliar a resposta de fêmeas cruzadas zebú aos tratamentos com implantes intravaginais de progesterona, BARUSELLI et al. (2001), empregaram PRID em vacas com terneiro ao pé por um período de 9 dias, junto a uma cápsula de 10mg de benzoato de estradiol. No momento da retirada do dispositivo, administraram-se 500µg de cloprostenol, um análogo da prostaglandina sintético e mais 500UI de eCG. Todas as fêmeas

foram inseminadas 56h após a retirada dos dispositivos intravaginais. As taxas de prenhez alcançadas ficaram em torno de 48,1%.

No que tange ao dispositivo intravaginal, denominado comercialmente CIDR-B ele consta de um implante em forma de "T", composto de silicone com um molde de nylon impregnado com 1,9g de progesterona. Uma corda de nylon é presa ao dispositivo para facilitar sua retirada da vagina. Sua utilização inclui o emprego de uma cápsula de gelatina contendo 10mg de benzoato de estradiol. As taxas de retenção variaram de 99% em novilhas tratadas, por períodos de 4 a 15 dias e de 98% em vacas de leite tratadas por 4 a 7 dias (MACMILLAN et al., 1991).

MACMILLAN; PETERSON (1993) avaliaram o desempenho do CIDR-B, por 7 dias, junto a uma aplicação de prostaglandina, no momento de sua retirada. Obtiveram 52,6% das fêmeas em estro e inseminadas, nas 48h da retirada do dispositivo e 37,6% nas 72h da remoção. A taxa de prenhez ao primeiro serviço foi de 57,7%. Por outro lado, avaliando o uso do CIDR-B, por 10 dias junto à aplicação de prostaglandina, 2 dias antes da remoção ou na remoção, aumentou de forma significativa a percentagem de animais em estro as 48h da retirada do CIDR-B (82% vs 65%), diminuindo a percentagem das inseminadas às 72h (11% vs 23%).

Os mesmos autores testaram o desempenho do estrógeno como agente luteolítico, na forma de benzoato de estradiol associado ao CIDR-B. Dessa forma, 443 novilhas de 12 a 14 meses de idade tiveram o CIDR-B inseridos por 12 dias junto à aplicação de uma cápsula de gelatina com benzoato de estradiol via intravaginal, na dose de 10mg no dia da inserção, ou essa dose em uma injeção intramuscular (2 ml). O emprego do benzoato de estradiol via vaginal foi da mesma forma eficiente do que a aplicação muscular. As taxas de prenhez foram similares entre os grupos ficando em torno de 60%.

No nosso meio, os resultados de trabalhos de campo, testando o desempenho do CIDR-B na sincronização de cio e ovulação, são variáveis. Sua utilização em fêmeas com cria ao pé resultam em taxas de prenhez que variam de 30 a 65%. As taxas de sincronização de estro variam de 70 a 95% (BARUSELLI et al., 2001; BORGES; GREGORY, 2001; PRAÇA et al., 2001; SANTOS et al., 2001). No entanto, cabe ressaltar que o custo é um fator limitante na expansão da utilização desses dispositivos nos rebanhos, dadas as circunstâncias atuais que vive a pecuária do Estado.

Com vistas nesse problema, no Rio Grande do Sul, MORAES; JAUME (1997) desenvolveram um pessário vaginal para facilitar a administração de progestágenos, de forma eficiente e com baixo custo. O mesmo consiste de um cilindro de esponja de densidade alta

(D: 33) com 4 cm de diâmetro, 10 cm de comprimento e um orifício central de 1,2 cm, tendo em uma de suas extremidades um fio de algodão com 35 cm de comprimento, atado em cruz, para facilitar a retirada do pessário após seu período de atuação. O hormônio escolhido para liberação via mucosa vaginal é o acetato de medroxi-progesterona (MAP), em uma concentração de 250mg por pessário. O dispositivo é denominado de Sincrobovi. Inicialmente, seu período de atuação é de nove dias.

Os experimentos realizados por MORAES; JAUME (1997), procurando verificar indicadores do desempenho do Sincrobovi, mostraram uma amplitude de perda do pessário, variando de 9% a 33%, percentagens de prenhez com observação de estro entre 65% a 75% e sem observação de estro variando de 50% a 65%. Em um dos ensaios em que foi empregado estradiol (1 mg cipionato de estradiol), na colocação do pessário e a inseminação com horário pré-fixado nas 56h após a remoção do mesmo, obtiveram-se uma taxa de prenhez de 48%.

PORTELA, Jr et al. (2001), em trabalho experimental procurou identificar o melhor momento para aplicação de inseminação com horário pré-fixado, após tratamento com progestágeno. Para isso, utilizou MAP na concentração de 250mg (Sincrobovi) por 7 dias junto à aplicação de 5mg de benzoato de estradiol na colocação do pessário. As fêmeas foram divididas em grupos e inseminadas nas 48, 56, 60 e 72h da retirada do pessário. Não foi considerado a percentagem de prenhez e sim o percentual de não retorno, que variou de 54,5% a 59,5% após as inseminações com tempo fixo. Os resultados são indicativos de que o MAP, na forma do Sincrobovi, associado a 5mg de benzoato de estradiol no momento da sua colocação, permite o emprego de inseminação artificial pré-fixada a partir das 56h da sua retirada.

MAHFUZ et al. (2001) compararam, em duas propriedades, as taxas de prenhez e custo por prenhez de dois programas para controle do ciclo estral, com o emprego da inseminação artificial em tempo pré-fixado. Um dos grupos recebeu uma aplicação de 75µg de um análogo de prostaglandina (D-cloprostenol) via submucosa vulvar e a inseminação nas 78 a 82h após sem controle de estro. O segundo, o emprego intravaginal de MAP (Sincrobovi) junto à aplicação intramuscular de 1mg de benzoato de estradiol na colocação do pessário, com a inseminação sendo realizada dentro das 53 a 56h após a retirada do mesmo. O MAP foi mantido por 9 dias. As taxas de prenhez não diferiram entre tratamentos ($P>0,05$). Para o grupo com MAP essas ficaram entre 48,8% e 54,5%. No grupo prostaglandina entre 36,8% e 37,9%. Quanto ao fator custo, o tratamento com MAP foi mais econômico, em aproximadamente 20%, em relação à aplicação única de prostaglandina, realizando uma simulação do emprego dos tratamentos em 100 vacas.

BRAGANÇA et al. (2004) trabalhando com novilhas de apenas 12 a 14 meses, empregaram o MAP intravaginal associado ao benzoato de estradiol para sincronizar a emergência de uma nova folicular. Este programa associou a inseminação artificial logo após um curto período de controle de estro (48 h) e a inseminação em tempo fixo (IATF), seguindo a sincronização da ovulação pelo análogo de GnRH. Os níveis de prenhez obtidos com o tratamento ficaram ao redor de 46%. Pelo referido, o emprego do MAP em forma de esponjas intravaginais (Sincrobovi), permite obter índices de prenhez que variam de 40% a 65%, após inseminações com horário pré-fixado e ainda com custos acessíveis. O desenvolvimento destes sistemas de aplicação de progestágenos tem facilitado o seu emprego nos programas de sincronização de estro. A característica comum de todos estes sistemas é a aplicação de estradiol ao início do tratamento, buscando encurtar a duração de vida do corpo lúteo e terminar a onda folicular existente, induzindo a emergência de um novo folículo (DISKIN et al., 2002).

2.4.2. A Prostaglandina e seus análogos no controle do ciclo estral bovino

A história da prostaglandina começa com dois ginecologistas norte americanos, os quais observaram que a adição do fluido seminal humano promovia a contração uterina. Isso em 1930 (BAIRD, 1972; CHALLIS, 1979). Posteriormente, em 1937, VON EULER verificou que substâncias das vesículas seminais de machos ovinos, estimulavam fortes contrações da musculatura lisa. Assim, ele sugere para essa substância portadora de tal atividade biológica o nome de “prostaglandina” por pensar ser essa, derivada da glândula prostática (CHALLIS, 1979). No ano de 1966, BABCOCK suspeita do efeito luteolítico para esse agente, fato posteriormente verificado em ratos por PHARISS; WYNGARDEN (1969). Somente em 1971, por meio de trabalho realizado por GODING e colaboradores estabelece-se que a prostaglandina de origem uterina é um fator luteolítico em ovinos (BARRET et al., 1971; GODING et al., 1972). Posteriormente, continuando na pesquisa sobre essa substância, várias equipes de trabalho demonstraram que a mesma também é luteolítica na espécie bovina (ROWSON et al., 1972; LAUDERDALE et al., 1972; LIEHR et al., 1972). Sendo assim, após esses achados passa a prostaglandina a ser o agente farmacológico com ampla utilização na sincronização de estro (NEVES et al., 1979; 1980; ODDE, 1990; LARSON; BALL, 1992).

Além de causar a contração da musculatura lisa, ela modifica a pressão sangüínea e é o primeiro produto descoberto derivado do ácido araquidônico. Todas as prostaglandinas são variações de um ácido graxo insaturado, chamado ácido prostanóico. Apresentam em sua

estrutura 20 átomos de carbono, um anel de ciclopentano mais duas cadeias laterais. Todas elas possuem um grupo hidroxila no carbono 15. Seis grupos de prostaglandinas têm sido identificadas: A, B, C, D, E e F. A $\text{PGF}_2 \alpha$ (PGF) é a de maior importância na reprodução animal, sendo uma luteolisa natural em muitas espécies; junto com a PGE são as mais abundantes e mais estudadas (INSKEEP, 1973; GONZÁLEZ, 2002).

A secreção de PGF pelo útero não gestante é responsável pelo término da fase lútea na fêmea bovina, ao causar a regressão do corpo lúteo. Ela é liberada pelo endométrio como resultado da liberação de pulsos de ocitocina da hipófise posterior. Nesse sentido, o estradiol produzido pelo folículo dominante da última onda folicular, estimula a ação da ocitocina por induzir a síntese de seus receptores. Esse processo de regressão luteal, envolve uma via venosa arterial pela qual a prostaglandina alcança o corpo lúteo e induz a luteólise em ovinos (DEL CAMPO; GINTHER, 1973; MAPLETOFT; GINTHER, 1974), em bovinos (GINTHER, 1974) e suínos (DEL CAMPO; GINTHER, 1973). Foi verificado que os pulsos de prostaglandina, coincidem em 96% com os pulsos de ocitocina (BINELLI, 2000).

Estudos recentes, realizados por LEUNG; WATHES (2000), investigaram o efeito do estradiol e o papel do seu receptor, na regulação da expressão endometrial do receptor da ocitocina, no útero bovino. Os resultados obtidos mostram que o estradiol exerce seus efeitos via seus receptores. O estradiol facilita a transcrição do gene do receptor da ocitocina, aumentando-a rapidamente. Porém, uma regulação do receptor endometrial da ocitocina, ainda ocorre na ausência do estradiol.

Também, os efeitos das prostaglandinas nos ruminantes domésticos têm sido relatados logo após experimentos realizados *in vivo* e *in vitro*. Eles incluem uma rápida redução no fluxo sanguíneo luteal, mudanças na fluidez da membrana, atividade alterada das enzimas esteroidogênicas, alteração da conformação da cromatina nuclear, diminuição no número de pequenas células luteais, liberação de ocitocina luteal e diminuição na prostaciclina luteal. Os efeitos das prostaglandinas, no sinal de transdução, incluem um decréscimo nos receptores de gonadotrofinas, o não acoplamento do receptor de LH e adenilciclase, estímulo da atividade fosfolipase C, aumento do inositol trifosfato e cálcio livre intracelular e alteração da atividade da proteína quinase C (MILVAE et al., 1996).

As prostaglandinas são sintetizadas em inúmeras células quando requisitadas, não são armazenadas e têm uma meia vida biológica muito curta (para revisão: MORAES et al., 2001). Variados são os eventos patológicos nos quais acontece uma elevação nos níveis de prostaglandinas, entre eles: febre, traumatismos, queimaduras, asma, pneumonia, diarreia, aborto, endometriose e inflamação. O sêmen é o líquido orgânico em que residem as maiores

quantidades de prostaglandinas, sendo as do grupo E as predominantes. O carneiro e o homem são as espécies que apresentam maior concentração de PG no seu sêmen. Por sua vez, touro, cavalo e cão as têm em menor quantidade. Elas podem ser absorvidas pelo trato genital feminino provocando a contração das paredes, o que favorece o transporte dos espermatozóides (para revisão: GONZÁLEZ, 2002).

Uma vez absorvidas dentro da corrente sanguínea, são rapidamente inativadas por oxidação durante sua passagem através dos pulmões. Após, a administração intramuscular de doses luteolíticas recomendadas, sua concentração plasmática aumenta por 10 minutos, tendo um declínio em 90 minutos. Numerosas são as vias de aplicação, e em doses reduzidas no trato reprodutivo. Cita-se a infusão intrauterina, a injeção na parede do útero, a administração intravaginal e a injeção intraovariana. A maioria dessas vias não são de fácil aplicação, dificultando seu uso em condições de campo (COLAZO et al., 2002).

SUÑE et al. (1985), objetivando tornar economicamente viável a sincronização de estros no Estado do Rio Grande do Sul, testaram a redução da dose de prostaglandina e o número de injeções, associando o emprego da via de aplicação submucosa vulvar a um sistema de inseminação durante dez dias. O análogo sintético de prostaglandina utilizado foi o Dinoprost. As doses empregadas foram de 25µg e 5µg, na via intramuscular e submucosa vulvar, respectivamente. Cerca de 75% das vacas apresentaram estro nos primeiros dez dias de serviço, e maior manifestação de estro dentro das 72h, após a aplicação de 5µg do produto via submucosa vulvar.

CASTILHO et al. (1997) testaram a resposta do corpo lúteo de vacas Nelore, solteiras, e em período de pós-parto, à aplicação de um análogo da prostaglandina (Cloprostenol), por via intramuscular ou sub-mucosa vulvar. Após, confirmada a presença de corpo lúteo por meio de estudo ultrasonográfico, metade dos animais foram tratados com 500µg pela via intramuscular, e a outra metade recebeu a dose de 250µg via sub-mucosa vulvar. Os resultados indicaram, que o emprego da via vulvar foi eficiente em induzir estro em vacas, com a vantagem de utilizar metade da dose. As percentagens de fêmeas em estro foram de 48% e 45% para o uso da via vulvar e intramuscular respectivamente.

Os análogos sintéticos da prostaglandina, entre eles o Cloprostenol e o Dinoprost, são mais potentes que a sua forma natural. Ainda, sintéticos como o Fenprostaleno e Alfaprostol são utilizados (WIRGTH; MALMO, 1992). Eles funcionam como agentes luteolíticos em vacas que estão ciclando regularmente, determinando a queda dos níveis de progesterona, desenvolvimento folicular e pico de LH dentro de três dias (para revisão: MORAES et al.,

2001) Além dessa sua ação luteolítica e estimuladora do miométrio, são empregadas na indução do parto e do aborto (WIRGTH; MALMO, 1992).

Em trabalho experimental, SALVERSON et al. (2002) compararam a eficiência de duas fontes de prostaglandina na performance reprodutiva de novilhas. Dessa forma, utilizaram os análogos Cloprostenol e Dinoprost trometamina. A resposta ao estro, taxa de concepção e prenhez foram avaliadas, não mostrando diferenças no desempenho dos dois produtos. O pico de estro ocorreu 60h após a aplicação dos tratamentos.

A prostaglandina natural secretada pelo útero não grávido, é responsável pela luteólise. O corpo lúteo se torna sensível à sua ação, em torno do dia 6 a 7 após o estro. Trabalhos demonstraram que a não resposta à prostaglandina, por parte de um corpo lúteo, em sua fase inicial de desenvolvimento, não é devida a falta de receptores para prostaglandina. Da mesma forma, a prostaglandina induz as mesmas mudanças em um corpo lúteo em fase inicial de crescimento, como as estabelecidas em sua fase de maturidade. Por exemplo, existe uma depleção da vitamina C e a inibição de certos genes chaves. Um importante passo estimulado pela prostaglandina na metade do ciclo, porém não no corpo lúteo inicial, é a indução de um gene que regula o passo limitante na produção da prostaglandina (cyclooxygenase). Desta maneira, é especulado que a prostaglandina, cause um feedback positivo no corpo lúteo maturo, que leva a produção intraluteal de prostaglandina a qual participa na luteólise. Este acontecimento parece não estar presente no corpo lúteo em início de desenvolvimento (WILTBANK, 1997).

Uma vez estabelecido que a prostaglandina é luteolítica, programas começaram a ser desenvolvidos com o seu uso, buscando sincronizar o estro na espécie bovina e, assim, melhorar a eficiência reprodutiva. Existem, no entanto, limitações para o seu emprego. Primeiro, a não resposta do corpo lúteo inicial ao tratamento com o hormônio, o que pode ser solucionado aplicando uma segunda dose de prostaglandina, com um intervalo que permita todas as fêmeas apresentarem um corpo lúteo responsivo e funcional. Esse intervalo deve ser de 10 a 14 dias. Segundo, a prostaglandina não induz ao ciclo vacas em anestro. E, terceiro, as fêmeas manifestam estro, em tempos variáveis, logo após o tratamento. Essa variabilidade no período de estro é devida a diferenças entre fêmeas no crescimento folicular, e não devido a diferenças no período de regressão luteal (WILTBANK, 1997).

Já que em um ciclo estral fisiológico, a regressão do corpo lúteo depende da secreção pulsátil de PGF em torno do dia 16 (ZARCO et al., 1988; THATCHER et al., 1989), quando se aplica PGF (natural ou sintética) como agente luteolítico em um grupo de fêmeas entre os dias 6 a 16, promove a regressão luteal e um bom grau de sincronização de estros

(STEVENSON et al., 1984; WATS; FUQUAY, 1985; HERNÁNDEZ et al., 1994), devido a que muitas fêmeas manifestam estro simultaneamente (HURNIK et al., 1975). Essa manifestação de estros ocorre entre as 48 e as 96 h (KING et al., 1982; ZARCO et al., 1985; THATCHER et al., 1989) ou dentro das 144 h após a aplicação da PGF (MACMILLAN; HENDERSON, 1984; FOLMAN, 1990; ROSENBERG et al., 1990; FINDLAY et al., 1992).

O momento exato entre a aplicação de prostaglandina e a manifestação de estro vai depender da população de folículos no ovário. Vacas que não apresentem um folículo dominante entrarão em estro após aquelas com um folículo dominante em fase final de desenvolvimento. Esta é a razão pela qual existem variações no período de manifestação estral, entre os animais logo da administração da droga. Neste sentido, os resultados provenientes da inseminação com horário pré-fixado após a aplicação de prostaglandina, mostram-se baixos não superando os 20 a 40% (para revisão: MORAES et al., 2001).

O intervalo ao estro após a injeção de prostaglandina é afetada pela idade, raça, condição corporal e ou balanço energético e outros fatores fisiológicos. Em relação à idade, a percentagem de resposta em novilhas é de 85 a 95% (HERNÁNDEZ et al., 1994) em vacas de 40 a 60% (ZARCO et al., 1990), podendo ser de 85 a 90% (MACMILLAN; HENDERSON, 1984; FINDLAY et al., 1992). Concentrações em soro de progesterona também alteram o intervalo ao estro, após a aplicação (para revisão: RATHBONE et al., 2001). Apesar do emprego da prostaglandina em animais de raças européias induzir altas taxas de manifestação de estro, 70 a 97%, os resultados obtidos quando se trabalha com raças zebuínas são conflitantes e variáveis, menores do que 50% mesmo na presença de corpo lúteo funcional até taxas que superam os 70% (BARROS et al., 2000).

Estudos realizados em novilhas (KING et al., 1982; WATTS; FUQUAY, 1985), verificaram o tempo transcorrido entre a aplicação do luteolítico e a manifestação do estro, quando aplicado em diferentes fases do diestro. Novilhas que receberam o luteolítico nas fases iniciais tiveram uma manifestação precoce de estro (47,6 h) do que as novilhas injetadas em fases tardias (59,7h; KING et al., 1982). Nas fêmeas, o estro manifestou-se mais cedo quando apresentavam um folículo com diâmetro maior do que 15mm, relacionadas às portadoras de folículos medianos (10mm) e pequenos (5mm ou menos) (ZARCO et al., 1985).

TANABE; HANN (1984) também estudaram o efeito da aplicação da prostaglandina em diferentes estádios do ciclo estral. Para isto, o agente luteolítico (dinoprost) foi injetado via intramuscular na dose de 25 µg, nos dias 7, 11 e 15 do ciclo. O estro foi induzido em 91,3% das fêmeas em um período de 80h após aplicação. Com o avanço do ciclo, aumentou a percentagem de fêmeas manifestando estro, diferença esta não significativa: 86,0% das que

receberam no dia 7, 90,0% para as do dia 11 e 98,0% nas do dia 15. O estro ocorreu dentro de um período de 48h nas fêmeas tratadas no dia 7, estendendo-se sobre 72h para as tratadas nos dias 11 e 15. Nas 72h pós-injeção a indução do estro foi elevada nos animais tratados no dia 7 (100,00%) ou dia 15 (95,9%); no entanto, somente a metade (48,9%) das tratadas no dia 11 tiveram seu estro induzido. A variação na distribuição do início do estro mostrou diferença significativa ($P < 0,001$). O estágio do ciclo ao qual as fêmeas receberam a aplicação do agente luteolítico, não só afetou as variações do início do estro como também o grau de sincronia.

Uma variante do emprego de prostaglandina, na sincronização, utiliza para inseminação as fêmeas que entram em estro já após a primeira aplicação hormonal. Os animais são observados por doze dias logo da primeira dose. As não reagentes recebem uma segunda dose e são inseminadas após o aparecimento de estro, o qual se manifesta entre 48 a 96h. O protocolo com uma aplicação somente de prostaglandina, preconiza a observação de estro por um período de cinco a sete dias e inseminação de todas as fêmeas que estiverem em estro. No quinto ao sétimo dia, é aplicada uma dose de hormônio em todas as vacas que não ciclaram. O sistema preconizado por SUÑE et al (1985), aliando o emprego de 1/5 da dose recomendada de prostaglandina (minidose) via submucosa vulvar a dez dias de observação de estro, resultou em médias de 75% das fêmeas manifestando estro durante o período de serviço. O programa consiste em dez dias de inseminação. Observa-se estro nos primeiros cinco dias, inseminando-se as que manifestarem estro. No quinto dia, a aplicação de uma mini-dose do produto na submucosa vulvar e inseminação por mais cinco dias.

MAHFUZ et al. (2001), empregando metade da dose recomendada (75 μ g), via submucosa vulvar, no quinto dia de um programa de dez dias, e a inseminação artificial sendo realizada, sem observação de estro, entre as 78 e as 82h após o tratamento obtiveram taxas de prenhez entre 36 a 38%. Foram utilizadas novilhas entre 30 e 36 meses de idade.

É importante ressaltar que o emprego da minidose não é preconizado para outro sistema que não o de 10 dias. É um programa para acasalamento de novilhas e vacas ciclando, não sendo empregado em fêmeas em programa de transferência de embriões. Se uma percentagem menor do que 20 a 25% das fêmeas demonstrarem estro nos primeiros cinco dias, o programa deve ser suspenso, pois reflete que grande parte das fêmeas não está ciclando (para revisão: MORAES et al. 2001).

A $PGF_2 \alpha$ pode ser utilizada em combinação com progestágenos, com a finalidade de promover uma melhor sincronização de estro, especialmente se for administrada entre 24 e 48h antes da retirada da fonte de progesterona. Considera-se que o aumento da secreção pulsátil de LH durante o período entre a luteólise induzida pela prostaglandina exógena e a

remoção do progestágeno permita um crescimento mais uniforme do folículo pré-ovulatório entre os animais (BARROS et al., 2000).

2.4.3 O GnRH e seus análogos no controle do ciclo estral em bovinos

Os primeiros trabalhos realizados por HARRIS e colaboradores foram pioneiros no estudo do GnRH nos anos de 1940 e 1950. Eles sugeriram a partir de suas observações que o hipotálamo regulava as secreções da hipófise anterior, por liberar substâncias as quais eram transportadas via vasos porta hipofisiários à hipófise (FRASER, 1979). O hormônio liberador de gonadotrofinas é um decapeptídeo secretado e armazenado no hipotálamo (BOSU, 1982), que apresenta estrutura similar em espécies como, a ovina, canina, suína, e humana (ORY, 1983). Ele é sintetizado a partir de neurônios neurosecretórios, situados na porção média basal do hipotálamo (THATCHER et al., 1993). Os neurônios do GnRH são originários da placa olfativa embrionária. Durante a vida fetal, esses neurônios migram para o cérebro ao longo do nervo terminal. Assim, dessa forma, os neurônios que controlam a reprodução têm origem externa ao sistema nervoso central (CALDANI et al., 1993).

A histidina e o triptofano, segundo e terceiro aminoácidos que compõem sua cadeia, são fundamentais para a ativação do sistema adenil ciclase e a liberação de gonadotrofinas (COY; SCHALLY, 1978; STEWART, 1981). Sua inativação acontece quando a clivagem ocorre entre as posições 6 e 7 por enzimas proteolíticas do cérebro (STEWART, 1981). Entretanto, substituições ocorrendo no terminal carbono da cadeia e na posição 6 aumentam a sua resistência a degradação enzimática e assim, prolongam sua meia vida (FUJINO et al., 1972; ORY, 1983). O RNA do GnRH tem sido verificado na hipófise, placenta, ovário, miométrio, endométrio e próstata (CHEGINI et al., 1996; KANG et al, 2000).

O GnRH é liberado em uma maneira pulsátil dos neurônios em direção a rede de vasos do sistema porta hipotálamico-hipofisário. Por intermédio dessa rede, alcança as células gonadotrofos na hipófise anterior. Nessas células, o GnRH liga-se à receptores específicos de membrana celular promovendo uma série de eventos, os quais incluem microagregação e interiorização do receptor de GnRH, ativação do sinal de transdução de segundo mensageiro, e nova síntese de LH e FSH e liberação de LH. A interiorização dos receptores para o GnRH após se ligar ao GnRH, induz um transitório estado de insensibilidade nas células do gonadotrofos ao GnRH. Em situações normais, novos receptores para o GnRH são sintetizados retornando à superfície das células gonadotrofos, recuperando dessa forma, a sensibilidade ao estímulo subsequente do GnRH (D' OCCHIO et al., 2000).

Este decapeptídeo foi por primeira vez sintetizado em 1970 (MATSUO et al., 1971), surgindo no mercado como uma ferramenta ao tratamento de cistos foliculares no bovino. KITTOK et al. (1973) relataram que repetidas ou uma prolongada exposição ao GnRH pode ser necessário a imitar uma onda pré-ovulatória de LH em vacas, e essas repetidas doses causam a retomada de ciclos estrais fisiológicos em fêmeas portadoras de cistos foliculares. É aceito que o GnRH atua no desenvolvimento folicular ovariano e na função do corpo lúteo de maneira indireta via a liberação induzida de LH e FSH da hipófise. A administração de GnRH eleva essas gonadotrofinas na circulação periférica dentro de 2 a 4h. As gonadotrofinas se ligam a seus receptores específicos nas células luteais e foliculares (TWAGIRAMUNGU et al., 1992; 1995). CHENAULT et al. (1990), tratando novilhas holandesas, com várias doses de acetato de fertirelin (10 a 500 μ g), buserelin e gonadorelina verificaram incrementos nos níveis de LH e FSH, nas 2 a 5 h após a aplicação dos mesmos. STEVENSON et al. (1993) verificaram resultados similares com o emprego do análogo receptal (8 μ g) e RETTMER et al. (1992) com o acetato de fertirelin (200 μ g), nos aumentos dos níveis de LH, nas primeiras horas da aplicação (1 a 5 h).

KAWATE et al. (1991), por meio de estudo experimental, examinaram o número de receptores para o GnRH, na hipófise anterior de bovinos durante o ciclo estral. Os resultados permitiram sugerir que o número de receptores para o GnRH, diminuíram da porção final da fase média lútea, em direção ao início dessa fase. O número inferior de receptores no início da fase luteal pode resultar de um decréscimo durante a onda de gonadotrofina, que ocorre na fase folicular. Por sua vez, o número desses aumenta para o final da fase luteal (dias 11 a 17). Sendo assim, a resposta da liberação de LH à administração de GnRH em vacas é relativamente reduzida no início e metade da fase luteal porém, alta na fase folicular. O aumento do número de receptores para o GnRH, precede a um incremento da sensibilidade ao mesmo requerido para a ocorrência de uma onda de gonadotrofinas.

As alterações promovidas na estrutura química da molécula natural do GnRH, provoca a síntese de seus potentes análogos. Entre eles encontram-se a Buserelina, a Gonadorelina e o acetato de Fertirelina. Os análogos estabilizam a molécula contra ataques enzimáticos, aumentam a ligação à membranas e proteínas plasmáticas, e aumentam a afinidade do agonista para com o receptor do GnRH (THATCHER et al., 1993). Além do mais, apresentam uma vida média longa em circulação. Essas propriedades permitem que os análogos possam ser empregados em doses inferiores as da forma natural (D' OCCHIO et al., 2000).

CHENAULT et al. (1990), avaliando as mudanças nas concentrações plasmáticas, de FSH e LH, seguido de várias doses de análogos de GnRH, entre eles, a busirelina, gonadorelina e o acetato de fertirelina, concluíram que o acetato de fertirelina é 2,5 a 10 vezes mais potente que a gonadorelina; entretanto, a busirelina é aproximadamente 10 a 20 vezes mais potente que o acetato de fertirelina para a liberação de FSH e LH na espécie bovina.

O emprego do GnRH tem efeitos variáveis na função do corpo lúteo, dependendo do momento do ciclo no qual o tratamento é iniciado. O uso do GnRH, próximo ou junto a onda pré-ovulatória de LH, atenuou as concentrações de progesterona em soro durante os primeiros 7 dias do ciclo. De forma similar, a exposição de um corpo lúteo em desenvolvimento (dia 2 do ciclo) à secreção de LH, induzida pelo GnRH, causou um decréscimo nas concentrações de progesterona durante o ciclo. A aplicação de GnRH ao estro, elevou a proporção de células luteais grandes no corpo lúteo ao dia 10 do ciclo. Por outro lado, a função e desenvolvimento folicular podem ser também regulados pelo emprego de GnRH ou de seus análogos durante a fase luteal do ciclo estral (THATCHER et al., 1993).

Em resposta ao GnRH, o maior folículo existente sofre ovulação ou continua sua regressão por atresia, dependendo do seu estágio de desenvolvimento. O GnRH ou análogos induzem à ovulação e formação de um corpo lúteo em fêmeas durante a fase luteal inicial como também, em aquelas sem um corpo lúteo funcional ($P_4 < 1\text{ng/ml}$), no momento do tratamento. A onda de LH induzida pelo GnRH é responsável pela ovulação de um folículo funcionalmente dominante em sua fase de crescimento. Essa ovulação induzida é associada a um decréscimo na concentração de estradiol similar ao acontecido quando da destruição do folículo. Causando a ovulação, a ocorrência de estro espontâneo é inibida. O tratamento com o GnRH altera o diâmetro de um folículo dominante durante a sua fase de crescimento, Porém, não na sua fase de regressão. Assim, o GnRH não muda o destino do folículo já comprometido à atresia. Independentemente do estágio ovariano ao tratamento, uma nova e sincronizada onda de crescimento folicular (5 a 10mm) emerge 2 dias após a aplicação do GnRH (TWAGIRAMUNGU et al., 1995).

Segundo MARTINEZ et al. (1999) avaliando os efeitos da aplicação de LHp (origem suína) e do GnRH no folículo dominante de uma onda de crescimento folicular, observaram que o GnRH aplicado em fases desconhecidas do ciclo causa luteinização ou ovulação do folículo dominante e sincroniza a emergência de uma nova onda. Porém, sua eficiência parece ser afetada pelo estágio de desenvolvimento folicular no momento do tratamento. Uma nova onda folicular somente foi induzida quando a ovulação ocorreu em resposta ao tratamento. Ainda, o GnRH mostra-se mais eficiente em induzir ovulação em vacas do que em novilhas.

Uma nova onda de crescimento folicular ocorreu 1,3 dias pós-tratamento em animais que ovularam em resposta ao mesmo.

Em decorrência dos efeitos do GnRH e seus análogos na dinâmica folicular, esses passam a ser empregados no desenvolvimento de novos programas de sincronização de estro em combinação com a prostaglandina. Empregados na sincronização da ovulação, possibilitam o emprego da inseminação com horário pré-fixado, sem necessidade de controle de estro.

TWAGIRAMUNGU et al. (1992) determinaram o efeito de um análogo do GnRH (8µg Buserelin), aplicado 6 dias antes de uma injeção de prostaglandina (500µg Cloprostenol) na precisão do estro, taxas de prenhez, concepção e sincronização. Foram utilizadas novilhas e vacas nos 60 dias pós-parto. O grupo controle recebeu somente 2ml de solução salina. As fêmeas tiveram seu estro controlado do dia 0 (início do tratamento) ao dia 10, sendo inseminadas 12h após a manifestação do mesmo. Durante o período de tratamento, o número de vacas em estro, taxas de concepção e prenhez foram idênticas nos dois grupos. Entretanto, entre o dia 0 e 6, a proporção de fêmeas exibindo estro foi inferior no grupo GnRH em relação ao grupo controle: 4,2% vs 34,6%, respectivamente ($P < 0,01$). A taxa de sincronização de estro após o dia 6 foi maior no grupo tratado do que no grupo controle 83,3% vs 50,0% ($P < 0,01$).

Através desses resultados, os pesquisadores sugerem que o pré-tratamento com um análogo do GnRH, seis dias antes de uma injeção de prostaglandina, dispensa a necessidade do controle de estro nos primeiros 6 dias do tratamento, sem alterar as taxas de prenhez e concepção. Este protocolo hormonal foi denominado *Select –synch*, sendo o primeiro protocolo estabelecido utilizando análogos de GnRH. Como relatado anteriormente, necessita da detecção do estro e as taxas de prenhez alcançadas são variáveis (20,8%, LEMASTER et al., 2001; 53%, STEVENSON et al., 2000; 40%, KOJIMA et al., 2000).

Baseados nas percentagens de fêmeas em estro, nas 24 a 72h após a luteólise induzida pela aplicação de prostaglandina, TWAGIRAMUNGU et al. (1995) desenvolveram uma nova estratégia a permitir a inseminação artificial sem controle de estro. Para isso, uma segunda dose de GnRH foi aplicada 54h após a aplicação de prostaglandina, junto ao momento da realização da inseminação, para sincronizar a onda de LH e a ovulação do folículo selecionado. As taxas de prenhez foram similares entre os animais inseminados, sem controle de estro (GnRH) e 12h após a manifestação do mesmo (33/69 vs 47/79, respectivamente; $P > 0,16$). Este protocolo leva o nome de *Cosynch*, sendo uma modificação do anterior

mostrando taxas de prenhez da ordem de 40% a 54% (LAMB et al., 2001; GERY et al., 2001 a, b).

PURSLEY et al. (1995) considerando os resultados obtidos através do emprego do GnRH, associado à prostaglandina pelas mais variadas equipes de pesquisa (THATCHER et al., 1989; MACMILLAN; THATCHER, 1991) propõem um novo programa de sincronização de estro e ovulação, permitindo a inseminação em tempo pré-fixado. Este torna-se conhecido pelo nome, *Ovsynch*, sendo amplamente utilizado em rebanhos de gado de leite, em quais falhas na detecção de estro contribuem para as baixas taxas reprodutivas. O programa consiste de uma primeira aplicação intramuscular de GnRH (100µg), sem levar em conta o estágio do ciclo estral. Esse primeiro GnRH procura induzir a ovulação no folículo existente no momento do tratamento dando início a uma nova onda folicular. Após 7 dias, uma injeção de prostaglandina (35mg) é aplicada com a finalidade de regredir o corpo lúteo presente. Se esse é decorrente da injeção inicial de GnRH, terá tempo para responder ao agente luteolítico. Nas 48h após, uma segunda dose de GnRH (100µg) é empregada com a finalidade de promover a ovulação do folículo dominante. A inseminação artificial é realizada das 16 a 18h após o último tratamento hormonal, sem controle de estro.

O período entre as aplicações de GnRH são suficientes a permitir a emergência de um novo folículo, que esse alcance um tamanho pré-ovulatório e seja sensível à onda induzida de LH. Comparando o desempenho do programa, 90,0% das vacas e 54,0% das novilhas ovulam a partir do primeiro GnRH. Isto mostra uma maior eficácia do programa em vacas do que em novilhas. A diferença na dinâmica folicular entre as duas categorias de gado pode explicar essa diferença. Os animais sincronizados ovulam entre 24 e 32h após a segunda aplicação de GnRH. As taxas de concepção ficam em torno de 50,0% (PURSLEY et al., 1995).

FRICKE et al. (1998) procuraram diminuir os custos do programa *Ovsynch*. Para isto, utilizaram 50% da dose recomendada de GnRH (50µg). As taxas de sincronização (84,9% vs 83,1%) e concepção (41,0% vs 41,1%) não mostraram diferença significativa entre os grupos, dose reduzida e original, respectivamente. A diminuição da dose empregada de GnRH produziu uma redução de custos sem comprometer a eficácia do programa de sincronização. Resultados similares foram encontrados por OLIVEIRA et al. (2001) em vacas zebú, os quais empregaram também metade da dose de GnRH. Além disso, utilizaram a metade da dose de prostaglandina recomendada, via submucosa vulvar. A redução de custos não comprometeu a fertilidade.

O programa *Ovsynch*, no nosso meio, vem sendo utilizado com resultados os mais diversos. BARROS et al. (2000) utilizou o protocolo em vacas lactantes (60 a 90 dias pós-parto) e não lactantes. As taxas de prenhez após a inseminação em tempo fixo foram de 47,7% e 44,9% para as duas categorias, respectivamente. MARTINEZ et al. (2001) trabalhando com vacas com cria ao pé obteve 63,6% de prenhez no grupo *Ovsynch* e 61,9% no grupo controle (inseminação no cio observado). Já RIBEIRO et al. (2001), avaliando o programa em novilhas, obtiveram somente 20,0% de prenhez. PANTOJA et al. (2001), por sua vez, obtiveram 33,3% em vacas sem terneiro ao pé, 30,0% nas amamentando e 40,0% em vacas com presença de corpo lúteo (ciclado). O protocolo *Ovsynch* não é eficiente em animais em anestro. Seu emprego resulta em taxas de prenhez em torno de 15% a 19% (BARUSELLI et al., 2001).

A falha de ovulação, após a aplicação de GnRH, reside em que a capacidade do folículo responder ao mesmo, ou seus análogos depende do estágio de desenvolvimento folicular ao momento da aplicação. A não ocorrência de ovulação, nesse momento, se traduz no aparecimento de estro prematuro e reduzida fertilidade das fêmeas tratadas (MARTINEZ et al., 2002). O diâmetro do folículo dominante é alterado após o GnRH, quando na sua fase de crescimento ou plateau. Porém, não acontece o mesmo quando cursa na sua fase de atresia ou regressão. À medida que o folículo entra em atresia perde receptores para o LH, não permitindo ao mesmo responder ao GnRH. Esse fato explica o porquê é uma reduzida percentagem de fêmeas a atingirem a ovulação.

Resultados experimentais comprovaram que o tratamento com o GnRH não muda o destino do folículo comprometido a atresia e, conseqüentemente, não o recupera da mesma. Na realidade, o GnRH altera a distribuição folicular no ovário por aumentar o número de folículos de tamanho médio e diminuir os folículos maiores por luteinização ou atresia (TWAGIRAMUNGU et al., 1992; 1995). MOREIRA et al. (2000) sugerem que a fase lútea, entre os dias 5 e 10 do ciclo estral, seja o momento ideal para o início de uma programa que tem o GnRH como indutor de uma onda de crescimento folicular. Nessa fase, os folículos apresentam diâmetros de 10 a 13mm com capacidade para ovular. Por outro lado, aplicações de GnRH, em fases tardias do ciclo (dia 15), podem não resultar em ovulação e formação de um corpo lúteo. Também, a aplicação ao início do ciclo (dia 2 ou 3) a ovulação já ocorreu de maneira espontânea, e o folículo dominante existente carece de um diâmetro possível de responder ao GnRH (< 9mm). Além do mais, folículos dominantes menores apresentam um menor número de células da granulosa e um menor número de receptores para LH nessas células. Nesses casos, a ovulação induzida promoverá o desenvolvimento de um corpo lúteo

menor, com menor capacidade de secretar progesterona, influenciando também na fertilidade (MACMILLAN et al., 2003). Da mesma forma, existem fêmeas que mostram estro antes da aplicação da prostaglandina, provavelmente, não ficando prenhes após a inseminação pré-fixada. A incidência desses estros foi de 6% a 9% em vacas que receberam a prostaglandina 6 dias após o primeiro GnRH, e de 12% a 13% nas fêmeas que receberam o agente luteolítico em um intervalo de 7 dias enquanto em novilhas esses índices giraram ao redor de 18% (MARTINEZ et al., 2002).

Nesse sentido, estudos demonstraram que a adição de uma fonte de progesterona exógena (CIDR), em um programa que associa GnRH e prostaglandina (tipo *Ovsynch*), melhorou as taxas de prenhez em novilhas (MARTINEZ et al., 2002), assim como, é preconizado na vaca pós-parto iniciar os tratamentos hormonais com progesterona, buscando estimular o sistema hipotálamo- hipofisiário, associando a outras substâncias hormonais para obter a ovulação: GnRH, gonadotrofinas exógenas e estrógenos (CAVESTANY, 2003). Por tanto, pelo referido, o diâmetro folicular é um dos fatores que afeta a probabilidade que a ovulação ocorra ou não, em resposta ao GnRH.

2.4.4 A GONADOTROFINA CORIÔNICA EQÜINA (eCG) NA SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO DA ESPÉCIE BOVINA

COLE; HART (1930) foram os primeiros a demonstrar a presença de uma substância gonadotrópica no soro de égua prenhe. Trata-se de um hormônio glicoprotéico, secretado pelos cálices endometriais da égua (COLE; GOSS, 1943). Entretanto, ALLEN; MOOR (1972) demonstraram que os cálices endometriais que produzem o eCG são de origem placentária. Assim, deriva o nome gonadotrofina coriônica eqüina (eCG). Esta glicoproteína surge no sangue entre os dias 37 a 40 da gestação, e suas concentrações aumentam rapidamente com picos ao redor dos 55 a 75 dias, declinando posteriormente e tornando-se não detectável entre os dias 120 a 150 (ALLEN, 1969). A característica especial desse hormônio é que apesar de ser uma única substância, apresenta atividade biológica do FSH e do LH. É o eCG que estimula as ovulações secundárias da égua a partir dos 40 dias de gestação, assegurando, por meio disso, o desenvolvimento da mesma (SILVA, 1978).

Pela sua ação foliculo estimulante torna-se o eCG, junto ao FSH, os principais produtos comerciais na superovulação dos animais domésticos. As preparações comerciais são purificadas do soro da égua prenhe e da hipófise do suíno (FSH-P), respectivamente. A base de sua ação é a de ligação e ativação de receptores de FSH nas células da granulosa,

principalmente dos folículos de tamanho médio e pequenos, estimulando o crescimento contínuo desses, provavelmente pelo fato de inibir a apoptose (ARMSTRONG, 1993).

O eCG, ainda, em virtude a sua estrutura, reage muito bem com receptores de LH no bovino, os foliculares e os do corpo lúteo. Assim, sua atividade biológica para as duas gonadotrofinas, o FSH e o próprio LH (STEWART; ALLEN, 1981). Por outro lado, a preparação de FSH-P, consiste em uma combinação de moléculas de FSH e LH em uma proporção que varia em torno de 0.3 a 1.0 (CHUPIN COMBARNOUS; PROCUREUR, 1984). Uma característica desta preparação é seu baixo conteúdo de ácido siálico, ao contrário do que apresenta o eCG. Este baixo conteúdo em ácido siálico confere ao FSH-P uma média vida curta in vivo. Por isso, o seu emprego deve ser em doses repetidas (GAY et al, 1970). Ao contrário, o eCG é um fármaco de meia vida longa, cuja duração pode chegar até 3 dias (MURPHY; MARTINUK, 1991).

DOTT et al. (1979) verificaram a ação do eCG na população folicular de ovelhas. Eles observaram quando do emprego desta glicoproteína, um aumento no número de folículos não atrésicos com diâmetros de > de 3mm e a diminuição no número de folículos não atrésicos entre os 2 a 2.9mm. Ainda, o perfil de esteróide nos folículos estimulados pelo eCG em todos os casos foi dominado totalmente pelo estrógeno. Anteriormente, MCKENZIE; KENNEY (1973), em estudo experimental, tinham verificado as características histológicas dos folículos de novilhas baixo a ação das gonadotrofinas eCG e hCG (gonadotrofina coriônica humana). Seus resultados levaram a afirmar de que ambas substâncias afetam todos os folículos antrais, determinando a ocorrência de ovulação ou atresia dos mesmos. E, ainda, algum grau de luteinização acompanhou os sinais de atresia da maioria dos folículos. Também, esta atresia observada, iniciou na parede folicular, em que mudanças degenerativas foram vistas nas células murais da granulosa. Entretanto, as células do cúmulus mostraram-se normais e mitoticamente ativas. Essas células viáveis do cúmulus são provavelmente a razão pela qual o oócito tem habilidade de manter sua capacidade.

Já MOOR et al. (1984) trabalhando também com a espécie ovina, verificaram que a administração de eCG induziu em 28% de oócitos, modificações no modelo de síntese, as quais são normalmente associadas com maturação. Uma avaliação da esteroidogênese mostrou que, tanto a produção total como a secreção de estrógeno, foram aumentadas nos folículos tratados com essa gonadotrofina. Isto levou-os a sugerir que em animais tratados com eCG o modelo de desenvolvimento e esteroidogênese é perturbado em muitos folículos. Uma ativação prematura do compartimento germinal resulta em oócitos não viáveis e envelhecidos e, também, em um trato reprodutivo impróprio.

Ainda, CHUPIN; SAUMANDE (1979) avaliaram um novo tratamento para o controle do ciclo estral junto a uma baixa dose de eCG. Este tratamento consistiu de um implante de progestágeno (SC21009-Norgestomet) por 9 dias, com uma injeção de 5 mg de valerato de estradiol ao começo do tratamento e 0,5mg de análogo de prostaglandina dois dias antes da remoção do implante. No primeiro ensaio, 500UI de eCG foram injetadas dois dias antes (n = 61 vacas) ou na remoção do implante (n = 62 vacas). Os índices de prenhez foram altos e similares nos dois tratamentos (67,2 e 67,7% respectivamente), com uma percentagem maior de gêmeos no grupo que recebeu o eCG dois dias antes da remoção do progestágeno. O efeito do dia da aplicação de prostaglandina, relativo ao do eCG, demonstrou que a eficiência da aplicação do eCG dependeu na duração da estimulação.

Em um segundo ensaio, o tratamento hormonal anteriormente descrito, foi comparado com o tratamento de eCG e um análogo de prostaglandina em vacas da raça Normanda, amamentando. Em ambos os casos, o eCG (600UI) e o análogo de prostaglandina foram aplicados juntos. Observaram-se maiores taxas de ovulação (medidas por palpação retal), no caso da aplicação em conjunto destas substâncias, nos dois dias anteriores da remoção do progestágeno.

Por outro lado, MONNIAUX et al. (1984) estudaram a ação do eCG na população folicular de novilhas ciclando com idade de 18 meses. As mudanças observadas no número de folículos, após o emprego do eCG, sugeriram que a ação dessa glicoproteína difere entre folículos de diferentes tamanhos, em particular, entre folículos pré-antrais e os grandes folículos antrais. O eCG aumentou o número de folículos pré-antrais (<180 µm), aumentando a taxa de crescimento desses folículos. É possível, também, que o eCG tenha estimulado o crescimento de grandes folículos antrais transitoriamente, sendo finalizado pela onda pré-ovulatória de LH. Também, o eCG preveniu algum folículo normal de tornar-se atrésico ou, ainda, recuperou algum desses folículos atrésicos, retornando eles a um padrão normal do seu crescimento. Os autores sugerem que os grandes folículos antrais prevenidos de tornar-se atrésicos, ou recuperados dos estádios iniciais de atresia, devam ser hábeis em sofrer a ovulação ou, ainda, em luteinizar, após a onda pré-ovulatória de LH. Esses folículos que luteinizam ou ovulam após o eCG, não sempre são normais.

A partir desses e outros estudos posteriores (MULVVEHILL; SREENAN, 1977; ROCHE et al., 1992; KASTELIC et al., 1997) e, baseados ainda nas propriedades do eCG, tais quais criar condições de crescimento folicular e de ovulação, esta substância passa a ser empregada em programas de sincronização e/ ou indução de estros nas variadas espécies. O seu emprego tem-se mostrado compensador em rebanhos com baixa taxa de ciclicidade, em

animais recém paridos (período pós parto inferior a 2 meses) e em animais com condição corporal comprometida (BASTOS et al., 2004; BARUSELLI et al., 2004; DUFFY et al., 2004), como também, em novilhas pré-púberes e púberes (LAROCCA; MARTINEZ, 1983; BRANDÃO et al., 2005).

Assim, MACIEL et al. (2001) procuraram avaliar a eficiência de programas hormonais associados ao desmame temporário, na indução da ovulação em vacas de corte criadas extensivamente. Para isso, utilizaram vacas entre 50 e 70 dias após o parto e em condição corporal entre 2 e 3 (1-5), as quais em um dos grupos experimentais receberam uma associação hormonal de MAP, benzoato de estradiol (BE) e eCG. Os resultados alcançados refletiram o efeito benéfico do emprego do eCG no incremento dos índices de prenhez antes de 80 dias pós-parto. O eCG, na dose de 500UI, foi aplicado nas 24h da retirada do progestágeno.

BARUSELLI et al. (2003) trabalhando com vacas da raça Nelore, aos 75 dias de pós-parto, após um programa hormonal baseado no emprego de eCG, verificaram que o grupo que recebeu a referida substância na retirada do progestágeno apresentou uma maior taxa de prenhez após a IATF (38,9% vs 55,1%) e, ainda, ao avaliar a condição ovariana dos animais tratados constataram que o efeito positivo do eCG aumentou conforme o grau de anestro desses animais. Nos animais cíclicos, por outro lado, não foi verificado efeito positivo do tratamento com o eCG.

No mesmo sentido, BASTOS et al. (2004) procuraram desenvolver um programa hormonal para induzir estro e ovulação em vacas com 60 a 75 dias de pós-parto e sobre estresse nutricional. Dito programa associou MAP e BE na sincronização de emergência de uma onda folicular ao eCG, o qual junto a um agente luteolítico, foi aplicado nas 24h anteriores a retirada do progestágeno. A ovulação foi induzida pelo GnRH nas fêmeas que não manifestaram estro nas 48h após a retirada do progestágeno. O desmame dos terneiros foi realizado por 96h (da aplicação do eCG até o final da inseminação artificial em tempo fixo IATF). Os resultados revelaram o melhor desempenho das fêmeas que receberam eCG e com condição corporal > 2.5, as quais obtiveram 66,6% de prenhez. Ao contrário, fêmeas com condição corporal entre 2.0 e 2.5, obtiveram índices de prenhez ao redor dos 35%.

Em estudos recentes, SILVEIRA et al. (2005) procurando desenvolver um sistema hormonal de indução de estro, avaliaram o melhor momento da aplicação do BE e eCG nessa associação. O emprego do eCG busca permitir um maior crescimento folicular compatível com uma melhor resposta ovulatória ao GnRH possibilitando, assim, o emprego de IATF. Para isso, foi realizado a dinâmica folicular do sistema hormonal desenvolvido (MAP + BE +

eCG + GnRH), verificando-se que o emprego do eCG, nas 24h da retirada do MAP, possibilitou um maior crescimento folicular, resultando em uma diferença na curva de crescimento e um maior diâmetro do folículo dominante ao momento do emprego do GnRH, comparado aos demais grupos ($P=0.0001$). Os folículos alcançaram um diâmetro médio de 13mm nas 72h da aplicação do eCG.

Na mesma oportunidade os autores, baseando-se em que a ação do eCG é dose dependente, procuraram avaliar o desempenho de diferentes doses dessa gonadotrofina exógena. Foram testadas as doses de 300UI, 400UI e 500UI aplicadas no mesmo momento (24h da retirada do MAP). Os resultados de prenhez nos grupos 78.7% (214/272; G300 = 76.9%, 70/91; G400 = 80.0%, 68/85; G500 = 79.2%, 76/96; não mostraram diferença significativa. A manifestação média de estro dos grupos, nas 48h da retirada do MAP, ficou em 55.9% (152/272) e a ocorrência de partos gemelares em 4.4% (12/272). A possibilidade da redução da dose de eCG (300UI) permite diminuir os custos do sistema empregado, sem comprometimento do seu desempenho.

3. CAPÍTULO 1

TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

**AVALIAÇÃO DO EMPREGO DO eCG EM UM PROGRAMA
HORMONAL DE INDUÇÃO/SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO E
OVULAÇÃO EM NOVILHAS DE CORTE ENTRE 12 A 14
MESES DE IDADE**

**José Francisco Manta Bragança ; Guilherme de Medeiros Bastos ; João
Francisco Coelho de Oliveira ; Luis Felipe Kruel Borges ; Paulo Bayard
Dias Gonçalves**

Ciência Rural, 2007

**AVALIAÇÃO DO EMPREGO DO eCG EM UM PROGRAMA HORMONAL DE
INDUÇÃO/SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO E OVULAÇÃO EM NOVILHAS DE
CORTE ENTRE 12 A 14 MESES DE IDADE**

**EVALUATION OF THE USE OF eCG IN AT HORMONAL PROGRAM FOR
INDUCTION/SYNCHRONIZATION OF ESTRUS AND OVULATION IN 12- 14
MONTHS OLD BEEF HEIFERS**

**José Francisco Manta Bragança¹ ; Guilherme de Medeiros Bastos⁴ ; João Francisco
Coelho de Oliveira³ ; Luis Felipe Krue Borges¹ ; Paulo Bayard Dias Gonçalves²**

¹ Médico Veterinário, aluno do Programa de Pós-Graduação da UFSM.

² Professor Titular, Doutor, Dpto. de Clínica de Grandes Animais, UFSM.

³ Professor Adjunto, Doutor, Dpto. de Clínica de grandes Animais, UFSM.

⁴ Professor Substituto, Doutor, UNICENTRO-PR

Hospital Veterinário. CEP: 97105-900, fone: 55-2208484, Santa Maria, RS. E-mail:
bayard@biorep.ufsm.br. Autor para correspondência.

RESUMO

O presente estudo realizou uma avaliação acerca do efeito do tratamento com eCG e acetato de medroxi-progesterona (MAP), sobre a eficiência reprodutiva em novilhas de corte. Para tanto, em uma primeira etapa (pré-experimento), foram utilizadas 64 novilhas cruzadas (*Bos taurus x Bos indicus*), de 12 a 14 meses de idade, divididas ao acaso em dois grupos: eCG (n=32) e controle (n=32). Na segunda etapa, utilizou-se um número maior de fêmeas (n=92) da mesma idade e padrão fenotípico, buscando confirmar os resultados alcançados no grupo eCG. Fêmeas dos grupos tratamento (eCG e confirmação), no dia 0 (início do

tratamento), receberam durante sete dias um pessário vaginal, contendo 250mg de MAP, junto a uma injeção intramuscular (IM) de benzoato de estradiol (BE) na dose de 2,5mg. Nas 24h antes da retirada do pessário (dia 6), foi aplicado 104µg de Cloprostenol sódico, via submucosa vulvar e uma injeção IM de 250UI de eCG. Após a retirada dos pessários (dia 7), as fêmeas tiveram seu estro controlado pelo período de 48h, sendo inseminadas nas 12h da sua manifestação. As fêmeas que não manifestaram estro nesse período receberam uma injeção IM de 100µg de GnRH, e, após 16-18h, foram inseminadas sem observação do mesmo (IATF). As fêmeas do grupo controle receberam o mesmo tratamento hormonal anterior sem o emprego do eCG. Nas 48h da retirada do MAP, 75,0% (24/32), 52,0% (48/92) e 40,6% (13/32) das fêmeas manifestaram estro nos grupos tratamento e controle respectivamente, não mostrando diferença significativa. Em relação aos índices de concepção (eCG- 50,0% (12/24); confirmação -60,4% (29/48)) e prenhez (eCG- 46,9% (15/32); confirmação- 45,6% (42/92)) nos grupos tratamento, estes mostraram-se similares e ao serem agrupados foram significativamente superiores aos do grupo controle (23,07% (3/13); 25,0% (8/32) respectivamente ($P < 0,05$). Concluiu-se que o emprego de eCG, associado ao MAP, permite melhorar os índices de prenhez em novilhas de 12 a 14 meses de idade.

Palavras chaves: novilhas de corte, IATF, eCG, sincronização de estro.

ABSTRACT

The present study evaluated the effect of eCG and medroxyprogesterone acetate (MAP) on the reproductive efficiency of beef heifers. Initially, a preliminary experiment comprehending sixty-four 12-14 months old crossbred (*Bos taurus* x *Bos indicus*) beef heifers randomly assigned to groups eCG (n=32) and control (n=32) was performed. In a second

moment, ninety-two heifers of same age and fenotipic background were used as a replicate of the first experiment to confirm the preliminary results. Animals from group eCG received an intravaginal sponge pessary containing MAP (250 mg) on day 0 (beginning of treatment) for 7 days, along with an intramuscular (IM) injection of estradiol benzoate (2.5 mg). Twenty-four hours before sponge withdrawal (day 6), cloprostenol sodium (104 µg) was injected in the vulvar submucosa along with an IM injection of eCG (250 IU). After sponge withdrawal on day 7 estrous detection was carried out for forty-eight hours, and animals were inseminated twelve hours after being observed in estrous. Animals which did not manifested estrous received an IM injection of GnRH (100 µg) and were inseminated 16-18 hours later without estrous detection. Animals in the control group were treated according to the same hormonal protocol used for group eCG except for the eCG injection which it was administered. At forty-eight hours after sponge withdrawal 75,0% (24/32), 52,0% (48/92) e 40,6% (13/32) of the animals were detected in estrous from treatment and control groups, respectively, without any significant difference among groups. Conception rates (preliminary experiment – (eCG- 50,0% (12/24); replicate –60,4% (29/48)) and pregnancy rates (preliminary experiment – 46,9% (15/32); replicate – 45,6% (42/92)) in the treatment groups were similar between the two experiments. Data from both experiments were pooled and compared to control group (23,07% (3/13); 25,0% (8/32) indicating a significant improvement in conception and pregnancy rates, respectively ($P < 0,05$). We conclude that the use of eCG associated with MAP improves pregnancy rates of 12-14 months old beef heifers.

Keys words: breed heifers, IATF, eCG, estrus synchronization.

INTRODUÇÃO

A pecuária de corte no Brasil, ou de maneira geral, é caracterizada por uma baixa eficiência produtiva e reprodutiva. A idade que atingem a puberdade (SCHILLO et al., 1992), a baixa taxa de natalidade e a elevada idade a primeira cria, estão entre os principais fatores responsáveis por essa reduzida eficiência, tendo na nutrição e no manejo inadequados as principais causas (GOTTSCHALL, 1999).

Muitos são os fatores que influenciam a idade à puberdade na novilha de corte e, quando esta não é alcançada ao início da estação de monta, compromete a fertilidade e a eficiência reprodutiva. Assim, tratamentos direcionados à indução da puberdade aumentam a eficiência reprodutiva, uma vez que permitem que as fêmeas completem seu primeiro estro sub-fértil antes do início da estação de monta. Essas novilhas, cobertas nessa época, irão parir no começo da estação de produção, produzindo terneiros mais pesados ao desmame e tendo mais tempo para restabelecerem suas reservas corporais no pós-parto (RASBY et al., 1998; VOGG et al., 2004).

Trabalhos experimentais têm demonstrado que o emprego de gestágenos induz ciclicidade em vacas em anestro (SMITH et al., 1987; FIKE et al., 1997) e a puberdade em novilhas (SHORT et al., 1976; ANDERSON et al., 1996). Em novilhas pré-púberes, a aplicação de progesterona e estradiol 17 β induzem formação de um corpo lúteo e atividade cíclica (GONZALEZ-PADILLA et al., 1975). Da mesma forma, a associação de estrógenos a gestágenos seria útil para elevar a taxa de manifestação de estro e de prenhez em novilhas próximas da puberdade (LAMMOGLIA et al., 1998; RASBY et al., 1998; BRIDGES et al., 1999).

Por outro lado, o eCG em novilhas estimula o crescimento folicular ovariano de uma maneira dose dependente, prevenindo a atresia de alguns folículos não atrésicos e, inclusive,

recuperando folículos atrésicos iniciais (MONNIAUX et al. 1984). Com essa finalidade, o eCG tem sido utilizado no momento da retirada do progestágeno para estimular o crescimento folicular (BÓ et al. 2003). Trabalhando com vacas no pós-parto, têm alcançado resultados significativamente superiores quando o eCG é aplicado 24 h da retirada do pessário vaginal em um sistema misto que inclui observação de estro e IATF (MACIEL et al. 2001; BASTOS et al. 2003).

Baseados nesses resultados, nossa hipótese é a de que a aplicação de eCG um dia antes da retirada do progestágeno em novilhas de corte pré-púberes e no início da puberdade (peri-púberes), promoveria um maior crescimento folicular, permitindo a presença de um folículo com diâmetro capaz de responder ao pico pré-ovulatório de LH induzido pelo GnRH. Além disso, possibilitará a sincronização da ovulação para utilizar a IATF. Ainda, o progestágeno é importante para a atividade cíclica em fêmeas que ainda não a iniciaram.

Assim, o objetivo deste experimento foi verificar o efeito do eCG associado ao tratamento hormonal com acetato de medroxi-progesterona (MAP), sobre a eficiência reprodutiva de novilhas de corte, com idade de 12 a 14 meses.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios experimentais foram executados em duas etapas. A primeira etapa foi conduzida em uma propriedade particular situada em Santa Flora, distrito do município de Santa Maria, localizado na região Centro Oeste do Estado do Rio Grande do Sul (latitude 29° 51' 02,48" e longitude 53° 46' 02,01"). A partir dos resultados obtidos neste experimento, foi implantada a segunda etapa, utilizando-se um número maior de fêmeas. Esta foi executada em uma propriedade no município de Rio Grande, na região Sudoeste do Estado (latitude 31° 46' 19" e longitude 52° 20' 33").

Para o primeiro experimento, foram utilizadas 64 novilhas mestiças (*Bos taurus* x *Bos indicus*), com idade variando entre 12 a 14 meses, e sendo criadas em pastagens naturais de forma extensiva, divididas em dois grupos denominados eCG (n= 32) e controle (n= 32). Utilizando-se uma escala de 1 a 5 (1 magra e 5 gorda), foram selecionadas as novilhas em condição corporal (cc) 3 e peso vivo médio (pvm) de 298 Kg. Em um segundo experimento, foram utilizadas 92 novilhas para confirmar os resultados do grupo eCG. Neste último experimento, os animais eram também mestiças (raça base a Red Angus), com 12 a 14 meses de idade, criadas em condições similares as do grupo anterior, e apresentando cc 3 e pvm de 280 Kg. Considerando que não houve diferença de prenhez entre os dois grupos tratamentos, os resultados foram agrupados e comparados com o grupo controle.

As novilhas do grupo eCG receberam no dia 0 (início do tratamento) um pessário vaginal contendo 250 mg de acetato de medroxi-progesterona (MAP), durante sete dias, e uma injeção via intramuscular (IM) de 2,5 mg de benzoato de estradiol (BE). No dia 6, foi aplicada uma dose de 104µg de cloprostenol sódico via submucosa vulvar (smv) e 250 UI de eCG IM. No dia 7, realizou-se a retirada do pessário vaginal seguido do controle de estro por 48 h. Durante esse período, a inseminação artificial foi realizada de maneira tradicional, com intervalos de 12 h após a manifestação de estro. As novilhas que não apresentaram estro no final das 48 h de controle, receberam uma dose de 100 µg de GnRH (IM) e foram inseminadas entre 16 e 24 h após, sem controle de estro (inseminação artificial em tempo fixo- IATF). Os animais do grupo controle receberam o mesmo tratamento hormonal, mas sem a aplicação de eCG no dia 6. A Figura 1 mostra o esquema hormonal empregado em novilhas dos grupos tratamento (eCG- confirmação).

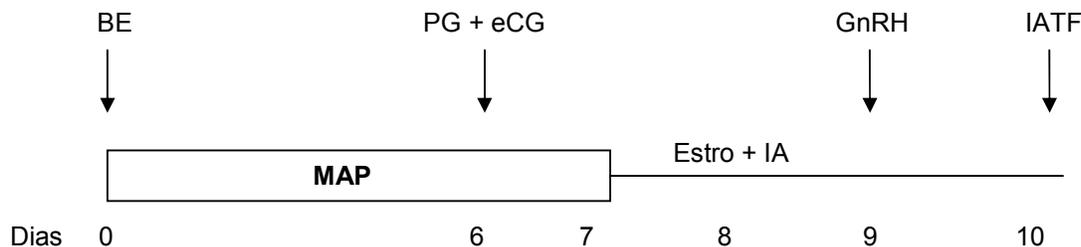


Figura 1: Esquema das aplicações hormonais empregadas nas novilhas entre 12 e 14 meses de idade dos grupos tratamento (eCG-confirmação). As novilhas do grupo controle apenas não receberam a aplicação de eCG no dia 6.

As inseminações foram realizadas com sêmen originário de uma mesma partida, tendo os parâmetros motilidade, vigor e concentração, avaliados previamente. Para o diagnóstico de gestação, realizado 35 a 40 dias após as inseminações, utilizaram-se os recursos de um aparelho ultrassonográfico (Pie Medical). Para a análise estatística, os índices de concepção e prenhez, expressos em percentuais, foram analisados pelo teste de ANOVA em um modelo estatístico para dados categóricos, utilizando o PROC CATMOD (CATEGORICAL DATA ANALYSIS PROCEDURES) no programa estatístico SAS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os percentuais de concepção nos grupos tratamentos foram de 50% (12/24, durante o primeiro experimento) e de 60,4% (29/48, na confirmação, $p= 0,4013$). Ao agrupar os resultados, os índices de concepção foram significativamente superiores ao utilizar eCG do que no grupo controle ($p= 0,0341$, Figura 1). De maneira similar, os índices de prenhez nos grupos tratamentos foram de 46,9% (15/32, no primeiro experimento) e de 45,6% (42/92, na

confirmação, $p= 0,9048$). Os resultados agrupados de prenhez do grupo tratamento foram significativamente superiores ($p= 0,0358$) ao grupo controle (Tabela 1).

O maior índice de concepção nas novilhas que receberam eCG pode ser devido ao incremento nas concentrações plasmáticas de progesterona conforme descrito por MARQUES et al. (2003) aliado ao aumento dos índices de ovulação, principalmente em aqueles animais que ainda não estão ciclando ou se encontram em anestro e foram tratadas com essa gonadotrofina.

Um ponto importante nesse sentido, diz respeito ao diâmetro máximo do folículo dominante quando do emprego do GnRH na indução da ovulação. A produção de um embrião viável requer a ovulação de um oócito competente, uma adequada produção de progesterona pelo corpo lúteo e um adequado ambiente uterino (PERRY et al., 2005). A possibilidade de promover um maior crescimento folicular após, o emprego do eCG como nos grupos tratamento, permite a obtenção de um folículo com diâmetro compatível de uma melhor resposta a onda pré-ovulatória do LH, induzida pelo GnRH. Ainda, esse maior folículo pré-ovulatório dará origem a um corpo lúteo com maior tamanho e capacidade de produzir maiores concentrações de progesterona.

MACNATTY et al., (1979) sugeriram que o desenvolvimento de um corpo lúteo fisiológico, depende do folículo pré-ovulatório apresentar um adequado número de células da granulosa, um adequado número de receptores para o LH nas células da teca e granulosa, com capacidade de sintetizar quantidades suficientes de progesterona após luteinização. Um maior crescimento folicular, o desejado após o emprego do eCG, permitirá alcançar essas características e, a ovulação de um folículo de maior diâmetro, reverterá em um corpo lúteo maior. Também, o aumento das concentrações plasmáticas de progesterona no diestro do ciclo subsequente à IATF, pode melhorar o desenvolvimento embrionário e a manutenção da gestação (BARUSELLI et al., 2004) por permitir uma maior produção de interferon τ (INF- τ)

e a inibição de liberação de prostaglandina ao redor do dia 16 após a inseminação (MANN ; LAMMING, 2001).

Grupos	Vacas (n)	Concepção (%)	Prenhez (%)	
			IATF	Total
eCG	32	50,00 (12/24)a	37,50 (3/8)	46,90(15/32)a
Confirmação	92	60,4 (29/48)a	29,50(13/44)	45,60(42/92)a
s/eCG	32	23,00 (3/13)b	26,30 (5/19)	25,00 (8/32)b

IATF: inseminação em tempo fixo;

TABELA 1: Índices de concepção e prenhez de novilhas de 12 a 14 meses de idade submetidas à indução de estro e ovulação com e sem eCG. *Diferença entre grupos ($P < 0,05$).

Ao contrário, o baixo índice de prenhez alcançado pelo grupo controle (25%) mostra que apenas o tratamento com gestágeno e estradiol não permitiu estimular ou induzir a maioria das fêmeas a ciclicidade estral. Com isto, o estado puberal das novilhas ao início do tratamento podem ter afetado os índices de prenhez referidos. BYERLEY et al (1987) relatam que baixos índices de prenhez e concepção são esperados quando novilhas são cobertas ao seu primeiro estro.

Resultados experimentais obtidos por SIROIS ; FORTUNE (1988) revelaram ainda, que o crescimento folicular em novilhas é dado em forma de ondas foliculares e o modelo comum de desenvolvimento é o de três ondas de crescimento folicular. Em animais ao início

da puberdade, entretanto, várias ondas se sucedem antes da primeira ovulação, os folículos crescem e regridem continuamente até que, níveis de estradiol produzidos por eles sejam suficientes para desencadear a onda pré-ovulatória de LH. Nesses períodos de crescimento, os folículos crescem e regridem sem alcançar o diâmetro compatível com o evento da ovulação. O emprego do eCG junto ao gestágeno, nos dois grupos tratamentos possibilitou as fêmeas tratadas, o pronto estabelecimento do ciclo, um maior crescimento folicular e uma melhor sincronização do estro.

Por outro lado, os índices de prenhez obtidos na IATF ficaram aquém do esperado, variando de 37,5% (3/8) e 29,5% (13/44) nos grupos tratamento e 26,3% (8/32) para o grupo controle. Talvez, algumas novilhas falharam em ovular, devido ao folículo não ter alcançado um diâmetro compatível com o GnRH na indução da ovulação. SARTORI et al (2001) mostraram que folículos, ao redor de 10mm de diâmetro, adquirem capacidade ovulatória. No entanto, necessitam de uma maior dose de LH para ovular quando comparados a folículos com mais do que 12mm. Além disso, a competência de desenvolvimento do oócito é adquirida gradualmente e aumenta com o desenvolvimento folicular (MACHATKOVA et al., 2004), como também a fertilidade do oócito ovulado pode ser menor do que os provenientes de uma ovulação natural (BYERLEY et al., 1987). Desta maneira, a maturação alterada oocitária compromete a fertilização (WEHRMAN et al., 1993). Acredita-se, assim, que estes resultados sejam a explicação para os índices de prenhez alcançados na IATF, aliado a ocorrência de perdas embrionárias ou mortalidade fetal por inadequado desenvolvimento do oócito resultante de uma ovulação induzida de folículos menores do que 10mm.

Nossos resultados, no entanto, mostraram que a sincronização e ou indução de estros em novilhas de 12 a 14 meses de idade é uma ferramenta de manejo interessante para o desempenho reprodutivo destas fêmeas. A precoce manifestação de estros em fêmeas tratadas com eCG, após a retirada do MAP (41,0%), mesmo não apresentando diferença significativa

entre os grupos avaliados, possibilitou que um número expressivo das mesmas manifestassem estro e tivessem a possibilidade de conceberem ao início da estação de monta. Como consequência, as novilhas irão parir ao início da estação de produção. Este fato é importante em novilhas de primeira cria, que necessitam de um maior tempo pós-parto para a recuperação do mesmo e, ainda, continuar o seu desenvolvimento corporal. Aliado a isto, a associação do MAP ao eCG baseados nos resultados obtidos nas duas etapas do estudo experimental permitiram alcançar níveis de prenhez ao redor de 50% em três dias de inseminação artificial.

CONCLUSÃO

A associação de eCG à suplementação com acetato de medroxi-progesterona, $\text{PGF}_2\alpha$ e GnRH, permite um incremento nos índices de prenhez em novilhas de 12 a 14 meses de idade, independentemente de estar ou não ciclando.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BARUSELLI, P.S. et al. Inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte, In: 1º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, Londrina, PR. **Anais....**246p. p.155, 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.

BYERLEY, D.J. et al. Pregnancy rates of beef heifers bred either on puberal or third estrus. **Journal Animal Science**, v.65, p. 645-650, 1987.

BRIDGES, P.J. et al. Follicular growth, estrus and pregnancy after fixed-time insemination in beef cows treated with intravaginal progesterone inserts and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v.52, p.573-583, 1999.

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.

GONZALEZ-PADILLA, E. et al. Puberty in beef heifers. II. Effects of injections of progesterone and estradiol-17 β on serum LH, FSH and ovarian activity. **Journal of Animal Science**, v.40, p.1105-1109, 1975.

GOTTSCHALL, C.S. Desempenho reprodutivo de novilhas submetidas a um programa de sincronização de cios e avaliação do trato reprodutivo. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v.27, n.1, p.21-33, 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 F2 α . **Journal of Animal Science**, v.76, p.1662-1670, 1998.

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

MACHATKOVA, M. et al. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase follicular wave on in vitro embryo production. **Theriogenology**, v.61, p.329-335, 2004.

MACNATTY et al. The microenvironment of the human antral follicle: interrelationship among the steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells and the status of the oocyte in vivo and in vitro. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.49, p.851-860, 1979.

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

MARQUES, M.O. et al. Efeitos da administração de eCG e de benzoato de estradiol para sincronização da ovulação em vacas *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* no período pós-parto. In: V SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, Huerta Grande, v. 1, p.392, 2003.

MONNIAUX, D. et al. Action of PMSG on follicular populations in the heifer. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.70, p.243-253, 1984.

PERRY, G. A et al. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. **PNAS**, v.102, n.14, p.5268-5273, 2005.

RASBY, R.J. et al. Luteal function and estrus in peripubertal beef heifers treated with an intravaginal progesterone releasing device with or without a subsequent injection of estradiol. **Theriogenology**, v.50, p.55-63, 1998.

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

SCHILLO, K.K et al. Regulation of luteinizing hormone secretion in prepubertal heifers: increased threshold to negative feedback action of estradiol. **Journal of Animal Science**, v.54, p325-336, 1982.

SCHILLO, K.K. et al. Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3994-4005, 1992.

SHORT, R.E. et al. Induced or synchronized puberty in heifers. **Journal of Animal Science**, v.43, p.1254-1258, 1976.

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

SMITH, V.G. et al. Response of postpartum beef cows to exogenous progestagens and gonadotropin releasing hormone. **Journal of Animal Science**, v.64, p.540-551, 1987.

VOGG, G. et al. Utilidade do benzoato de estradiol após a suplementação com gestágeno na sincronização de cios de novilhas de corte. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, n.1, p.41-46, 2004.

WEHRMAN, M.E et al. Increasing exogenous progesterone during synchronization of estrus decreases endogenous 17 β -estradiol and increases conception in cows. **Biology of Reproduction**, v.49, p.214-220, 1993.

4. CAPÍTULO 2

TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

**PROGRAMA DE SINCRONIZAÇÃO/ INDUÇÃO DE ESTRO E
OVULAÇÃO PARA NOVILHAS DE CORTE COM 12 A 14
MESES DE IDADE**

**José Francisco Manta Bragança; Rogério Ferreira; Rosane Silveira
Loguercio; Rodrigo Camponogara; Luciano Loguercio; João Francisco
Coelho de Oliveira; Paulo Bayard Dias Gonçalves**

Ciência Rural, 2007

**PROGRAMA DE INDUÇÃO/SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO E OVULAÇÃO PARA
NOVILHAS DE CORTE COM 12 A 14 MESES DE IDADE**

**PROGRAM FOR SYNCHRONIZATION/INDUCTION OF ESTRUS AND
OVULATION IN 12- 14 MONTHS OLD BEEF HEIFERS**

**José Francisco Manta Bragança¹; Rogério Ferreira¹; Rosane Silveira Loguercio²;
Rodrigo Camponogara³; Luciano Loguercio⁴; João Francisco Coelho de Oliveira⁵;**

Paulo Bayard Dias Gonçalves⁶

¹ Médico Veterinário, aluno do Programa de Pós-Graduação da UFSM;

² Médica Veterinária, Doutora da Equipe do Laboratório BioRep UFSM;

³ Aluno de Graduação do Curso de Medicina Veterinária da UFSM;

⁴ Médico Veterinário Autônomo- Granja 4 Irmãos- Rio Grande;

⁵ Professor Adjunto, Doutor, Dpto. de Clínica de grandes Animais, UFSM;

⁶ Professor Titular, Doutor, Dpto. de Clínica de Grandes Animais, UFSM
Hospital Veterinário. CEP: 97105-900, fone: 55-2208484, Santa Maria, RS. E-mail:
bayard@biorep.ufsm.br. Autor para correspondência.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicação de eCG previamente a uma associação hormonal de análogos de GnRH e PGF2 α procurando melhorar a resposta ovulatória dos folículos em novilhas de corte de 12 a 14 meses. Novilhas *Bos taurus*, predominante Red Angus, com 12 a 14 meses de idade foram divididas aleatoriamente em dois grupos: eMGPG (n=85) e eGPG (n=85). As novilhas do grupo eMGPG receberam 400UI de eCG (IM; dia 0) com a finalidade de provocar um aumento de crescimento folicular, tornando-os mais responsivos ao GnRH. Após 72h os animais receberam uma injeção de GnRH (100 μ g; IM) e um pessário vaginal contendo 250mg de acetato de medroxi-progesterona (MAP), por sete dias. Na retirada do MAP (dia 7) foi aplicada uma dose de 5mg de Dinoprost, via submucosa vulvar. Nas 48h seguintes à retirada dos pessários foi realizado o controle da manifestação de

estro e inseminação artificial (IA). As novilhas que não manifestaram estro, nesse período, receberam uma dose de 100µg de GnRH por via IM e foram inseminadas sem observação de estro nas 16 a 24h seguintes (IATF). As fêmeas do grupo eGPG receberam o protocolo similar ao anterior, porém sem o MAP. A percentagem de estro dos grupos eMGPG e eGPG, após a aplicação da prostaglandina, foram de 23,5% (20/85) e 22,3% (19/85), respectivamente ($p>0,05$). Igualmente, os índices de concepção e prenhez nos grupos eMGPG (65,0%; 13/20 e 37,6%; 32/85) e eGPG (68,4%; 13/19 e 28,2%; 24/85) não diferiram estatisticamente. Com intuito de avaliar a resposta de folículos de diferentes tamanhos após administração de eCG, novilhas de 12-14 meses foram aleatoriamente distribuídas para receber 400UI de eCG (IM) na presença de folículos de 5,0, 8,5 e >10,0mm, durante o diestro. Os diâmetros médios dos folículos no dia 3 da dinâmica foram, de 13mm, de 10mm e de 8mm nos grupos de folículos grandes, de folículos médios e de folículos pequenos respectivamente. Conclui-se que a aplicação prévia de eCG para aumentar o índice de folículos responsivos ao GnRH não substitui uma fonte de gestágeno na sincronização/indução de estro em novilhas de corte com 12 a 14 meses de idade. Pode-se concluir, também, que algumas fêmeas, apesar da aplicação prévia de eCG, dependendo do momento do crescimento folicular em que se encontram, não atingem um diâmetro folicular compatível com resposta ao GnRH.

Palavras chaves: novilhas de corte, MAP, indução de estro, eCG, GnRH.

ABSTRACT

Our aim was to evaluate whether eCG prior to the application of a hormonal association of GnRH and PGF2 α analogs would improve the ovulatory response of follicles in 12-14 months old beef heifers. Bos taurus heifers, mostly Red angus, 12-14 months old were divided randomly into two groups: eMGPG (n=85) and eGPG (n=85). Group eMGPG

received an intramuscular (IM) injection of eCG (400 IU) on day zero with the objective of inducing an increase in follicular growth making follicles more responsive to GnRH. Seventy-two hours after eCG injection animals received one GnRH injection (100µg; IM) and a vaginal pessary containing 250mg of medroxyprogesterone acetate (MAP) for 7 days. After MAP withdrawal (day 7) 5mg of Dinoprost were injected into the vulvar submucosa. Forty-eight hours after the MAP withdrawal estrus detection and artificial insemination (AI) were performed. Heifers which were not detected in estrus received GnRH (100µg; IM) and were inseminated without estrus detection between 16 and 24 hours after GnRH injection. Females from group eGPG received a hormonal protocol similar to group eMGPG, but did not receive MAP. Estrus rates after prostaglandin application in groups eMGPG and eGPG were 23.5% (20/85) and 22.3% (19/85) respectively ($p>0.05$). Similarly, conception and pregnancy rates in groups eMGPG (65.4%; 13/20 and 37.6%; 32/85) and eGPG (68.4%; 13/19 and 28.2%; 24/85) were not significantly different from each other. In order to evaluate the response of follicles of different sizes to eCG treatment, 12-14 months old heifers were randomly distributed according to follicular size (5.0, 8.5 and >10.0mm) to receive eCG (400IU; IM) during diestrus. The average follicular diameters on day 3 of the follicular dynamic were 13, 10 and 8mm in groups with large, medium and small follicles, respectively. We conclude that the use of eCG prior to the application of the hormonal protocol used, with the objective of increasing the rate of follicles responsive to GnRH, does not replace the use of a progestin for the induction/synchronization of estrus in 12-14 months old beef heifers. We also conclude that depending upon the stage of follicular development the follicles of some heifers do not reach a developmental stage compatible with GnRH responsiveness in response to eCG.

Key words: Breed heifers, MAP, estrus induction, eCG, GnRH.

INTRODUÇÃO

Na busca de uma ótima produtividade na pecuária torna-se interessante que as novilhas de reposição concebam ao início da estação de monta e venham a parir aos dois anos de idade. Para isso, programas de sincronização e/ ou indução de estros surgem como ferramentas efetivas, ao aumentar a proporção de fêmeas que concebem nesse período e, ainda, por promoverem a redução da estação reprodutiva e a uniformidade dos terneiros nascidos (DZIUK; BELLOWS, 1983).

A esse respeito, programas que associam o GnRH à prostaglandina têm sido desenvolvidos e amplamente utilizados em bovinos de corte (TWAGIRAMUNGU et al., 1992; 1995) e de leite (PURSLEY et al., 1995; SCHMITT et al., 1996; WILTBANK, 1997) permitindo, ainda, a inseminação artificial sem controle de estro (IATF). Eles utilizam o GnRH para iniciar uma nova onda de crescimento folicular e/ou para induzir a ovulação de um folículo dominante. Apesar de folículos com diâmetros de 10mm terem a capacidade de ovular em resposta ao LH na espécie bovina, um diâmetro de 12mm foi requerido para a totalidade dos folículos ovularem (SARTORI et al., 2001).

Assim sendo, os protocolos de IATF, baseados na associação GnRH e prostaglandina, quando empregados em novilhas, não têm resultado em índices de prenhez satisfatórios como aqueles alcançados em vacas, não superando os 15% a 20% (PURSLEY et al., 1995; RIBEIRO et al., 2001), aliado a uma alta percentagem de fêmeas (15 a 34%) que apresentam ciclo estral curto (SCHMITT et al., 1996). A primeira razão para essa baixa resposta parece estar relacionada com a inabilidade de sincronizar a onda folicular com o GnRH, nesta categoria.

Após uma aplicação de GnRH em estádios aleatórios do ciclo estral, 64% a 75% das vacas no pós-parto, tanto de corte como de leite ovularam (GEARY et al., 1998;

THOMPSON et al., 1999), enquanto apenas 48% a 60% das novilhas ovularam em resposta ao mesmo tratamento (MACMILLAN; THATCHER, 1991; PURSLEY et al., 1995; MOREIRA et al., 2000). Essa falha resulta também em novilhas mostrando estro anteriormente à aplicação da prostaglandina, não permitindo assim, o emprego da IATF. Aliado a estes estros prematuros a ocorrência de uma incompleta regressão luteal, após a indução da luteólise, colabora com as falhas na concepção (BURKE et al., 1996). MOREIRA et al (2000) mostraram que o corpo lúteo, induzido pela primeira aplicação de GnRH, pode não vir a regredir completamente após a aplicação de prostaglandina, interferindo no sucesso do programa.

Assim, a incidência de estros anteriores à prostaglandina foi de 6% a 9% em vacas que a receberam 6 dias após a primeira aplicação de GnRH, e de 12% a 13% nas fêmeas que receberam o agente luteolítico em um intervalo de 7 dias, enquanto que em novilhas estes índices foram de 18% (MARTINEZ et al., 2002). Os autores mostraram que a inclusão de um CIDR-B em uma associação hormonal de GnRH e prostaglandina para a utilização de IATF preveniu a manifestação prematura de estro entre a primeira aplicação de GnRH e o agente luteolítico, aumentando os índices de prenhez em novilhas de corte.

Por outro lado, o eCG pela sua ação foliculo estimulante, tem sido o produto de escolha para promover um maior crescimento folicular em vacas no pós-parto (MACIEL et al., 2001; SILVEIRA et al., 2003; BASTOS et al., 2004) e em novilhas (KERR et al., 1991) . SILVEIRA et al. (2005), por meio de estudo ultrasonográfico verificaram que a aplicação do eCG um dia antes da retirada do progestágeno (MAP), quando os folículos apresentavam diâmetro de 8mm, estimulou o crescimento dos mesmos, permitindo a estes alcançarem um diâmetro de aproximadamente 13mm no dia 9 (72h após o emprego do eCG). Este diâmetro é compatível com uma melhor resposta ovulatória ao desafio com o GnRH.

Desta forma, a hipótese aqui defendida consistiu na utilização do eCG antes da aplicação de GnRH (em uma associação com análogo de prostaglandina) para aumentar o tamanho folicular e a resposta ao GnRH. Ainda, possibilitaria o desenvolvimento de um corpo lúteo de maior tamanho, com potencial de produzir maiores concentrações de progesterona, funcionando, assim, como uma fonte de progestágeno necessária para a manutenção do crescimento folicular até o momento da indução da luteólise.

Portanto, o objetivo deste experimento foi o de desenvolver um programa hormonal de sincronização e ou indução de estros para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) de novilhas de 12 a 14 meses de idade, após um curto controle de estro (48h). O referido programa baseia-se na prévia aplicação de eCG (-72h) a uma associação de GnRH e prostaglandina, procurando-se avaliar ainda, a necessidade de um progestágeno para evitar a manifestação precoce de estro e sincronizar a ovulação.

MATERIAL E MÉTODOS

a) Experimento 1

O ensaio experimental foi realizado em uma propriedade particular, situada no município de Rio Grande, na região Sudoeste do Estado do Rio Grande do Sul (latitude 31° 46' 19" e longitude 52° 20' 33"). Para tanto, foram utilizadas 170 novilhas *Bos taurus* (predominantemente da raça Red Angus), com idade de 12 a 14 meses, constituindo um peso vivo médio de 280 Kg e apresentando uma condição corporal 4 (escala de 1 a 5). As novilhas não tiveram seu estado de ciclicidade avaliado previamente. Após pesagem e avaliação da condição corporal, as novilhas foram identificadas com a colocação de um brinco auricular e

divididas aleatoriamente em dois grupos experimentais denominados: eMGPG (n=85) e eGPG (n=85).

As fêmeas do grupo eMGPG receberam no dia 0 (início do tratamento) uma injeção (IM) de eCG na dose de 400 UI. Nas 72 h posteriores, foi aplicado 100µg de GnRH (IM) e colocado um pessário intravaginal com 250mg de acetato de medroxi-progesterona (MAP), que permaneceu por sete dias. No sétimo dia, procedeu-se a retirada do pessário vaginal, e a aplicação de 125µg de cloprostenol sódico (análogo sintético das Prostaglandinas), via submucosa vulvar (smv). Após a retirada do pessário, as fêmeas tiveram seu estro controlado por um período de 48h (dias 8 e 9), sendo esse controle realizado em dois turnos, por um tempo médio de 1,5h. As novilhas que manifestaram estro, nesse período, foram inseminadas de maneira convencional (12h após a manifestação); enquanto que aquelas que não o apresentaram no final das 48h de controle do mesmo foram reunidas e receberam uma segunda aplicação de GnRH, na dose de 100µg (IM), sendo inseminadas sem controle de estro (IATF) nas 16 a 24h seguintes (Figura 1). Por sua vez, as fêmeas do grupo eGPG receberam o mesmo tratamento anterior com a diferença de não receberem o pessário vaginal de MAP.

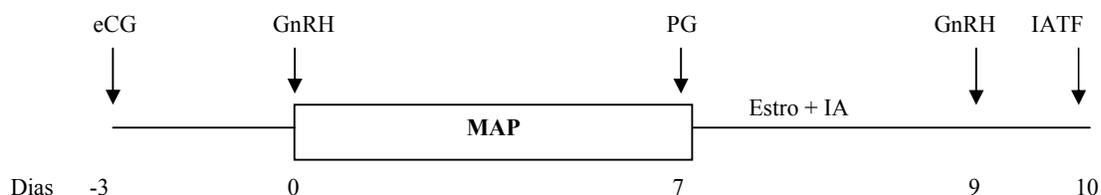


Figura 1: Representação esquemática das aplicações hormonais nas novilhas de 12 a 14 meses de idade do grupo eMGPG. As novilhas no grupo eGPG apenas não receberam o pessário vaginal de MAP entre os dias 0 e 7.

O sêmen empregado foi proveniente de uma única partida e teve seus parâmetros de motilidade e vigor avaliados previamente, ao início do experimento (segundo normas sugeridas pelo CBRA), sendo a inseminação artificial realizada por técnico experiente. Os índices reprodutivos considerados foram percentagens de estro, de concepção e de prenhez. Para a análise estatística, os resultados expressos em percentuais foram analisados através do qui-quadrado, utilizando-se o PROC CATMOD, no programa estatístico SAS.

b) Experimento 2

Em decorrência dos resultados obtidos no experimento de campo não terem sido os esperados, verificou-se o efeito do programa hormonal, utilizado no experimento 1, na dinâmica folicular ovariana. Especificamente, foi avaliado o crescimento folicular após a aplicação de eCG em novilhas com folículos de diferentes tamanhos, visando uma melhor resposta ao GnRH. O eCG foi aplicado em novilhas com folículos de 5mm (emergência), de 8,5mm (seleção) e > 10mm (dominância). Para isto, foram empregadas 24 (de um grupo de 50) novilhas de 12 a 14 meses de idade, da raça Red Angus, com peso vivo médio de 280 Kg e condição corporal de 3 a 4, as quais tiveram, previamente, seu ciclo estral pré-sincronizado pela aplicação de duas injeções de análogo de Prostaglandina com 14 dias de intervalo.

Após a segunda dose do agente luteolítico, as fêmeas passaram a ter seu estro controlado por um período de 72h em dois turnos diários, com intervalo de 12h, por 1,5h. À medida que manifestavam o estro, eram separadas para comporem o grupo da avaliação da dinâmica folicular. No 10° e 11° dia da manifestação do estro foi realizada a punção folicular em todas as fêmeas, as quais tiveram seus folículos maiores de 5mm aspirados utilizando um transdutor setorial de 7,5MHz, acoplada a uma guia de biópsia e um aparelho de ultra-som Pie-Medical-Scanner 200, objetivando a emergência de uma nova onda folicular.

O primeiro dia em que se encontrou um folículo com diâmetro de 5mm foi considerada a emergência da onda folicular (GINTHER et al., 1989). Todas as fêmeas eram portadoras de um corpo lúteo, verificado com auxílio do ultra-som, para que o efeito do eCG no crescimento do folículo ocorresse sob efeito de níveis de progesterona endógena.

Ao segundo dia da punção, iniciou-se o controle da dinâmica e a aplicação de eCG na dose de 400UI (IM) nas fêmeas com folículos de 5mm, formando o grupo de novilhas com folículos pequenos. À medida que as fêmeas alcançavam os diâmetros determinados para cada grupo (8,5mm grupo folículos médios e >10mm grupo folículos dominantes) recebiam o eCG na dose de 400UI (IM). A partir desse momento, a dinâmica folicular era avaliada até que fosse alcançado o diâmetro folicular maior do que 10mm, para uma melhor responsividade ao GnRH. As fêmeas do grupo controle não receberam a aplicação do eCG e apenas tiveram sua dinâmica de crescimento folicular acompanhada.

Durante o acompanhamento da dinâmica de crescimento folicular, diariamente eram tomadas e registradas as medidas do maior e segundo maior folículo e determinadas. A sua localização exata no ovário em um mapa ovariano, para a continuação da seqüência diária de medições. Os diâmetros dos folículos dominante e subordinado foram medidos pela maior distância (mm), entre dois pontos da cavidade antral dos folículos a partir de 4mm.

Na análise estatística, o diâmetro folicular foi comparado, utilizando um modelo de análise de variância para dados repetidos no PROC MIXED do pacote estatístico SAS. Os efeitos principais grupo e hora e a interação grupo x hora foram determinados e a diferença do diâmetro folicular entre os grupos em determinada hora foram comparados pelo “estimate statement”, também no SAS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As percentagens de fêmeas em estro nos grupos eMGPG e eGPG, após a aplicação da prostaglandina, foram de 23,5% (20/85) e de 22,3% (19/85) respectivamente, não existindo diferença entre esses resultados. Entretanto, um percentual de 21% das fêmeas do grupo eGPG (4/19) manifestou estro anteriormente a aplicação do agente luteolítico. A esse respeito MARTINEZ et al. (2002) revelaram, também, em novilhas de corte, índices de estro nesse mesmo período da ordem de 18%. Está demonstrado na figura 2 a percentagem de novilhas em estro, em relação à aplicação de prostaglandina, nos diferentes grupos estudados.

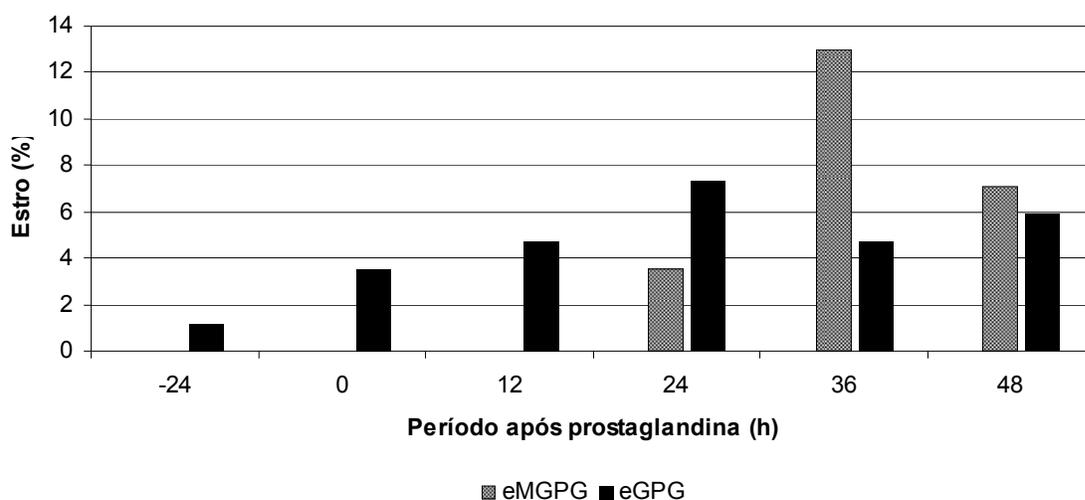


Figura 2: Percentagem de novilhas de 12 a 14 meses de idade manifestando estro em relação à aplicação da prostaglandina nos grupos eGPG e eMGPG.

A manifestação precoce de estro nas fêmeas do grupo eGPG (dia 7) indica falha de ovulação do folículo ao momento da aplicação do primeiro GnRH. Essa ausência de ovulação

é devida ao folículo não apresentar um diâmetro compatível com uma melhor resposta ao indutor da ovulação ou por estar no início da onda folicular no momento do GnRH. Portanto, se o primeiro tratamento com GnRH não induzir a ovulação de um folículo dominante, não haverá um sincronismo na formação do corpo lúteo e, conseqüentemente, da resposta à prostaglandina.

O evento da ovulação ocorre após o folículo atingir um tamanho superior a 10mm, provavelmente em conseqüência da aquisição de um número significativo de receptores para o LH nas células da granulosa (XU et al., 1995, SARTORI et al., 2001). Por isso, foi testada a hipótese de aumentar o crescimento folicular, utilizando eCG antes da primeira aplicação de GnRH. Além disso, era esperado que a resposta de estro das novilhas sem o pessário vaginal fosse similar àquelas que receberam MAP, tendo em vista um aumento do tamanho folicular por ação do eCG e, conseqüentemente, um maior tamanho do corpo lúteo e uma maior produção de progesterona. Apesar dos níveis de progesterona não terem sido avaliados, a manifestação de estro foi mais concentrada no grupo que recebeu MAP.

Da mesma maneira, as novilhas que receberam o pessário vaginal de MAP junto à aplicação do primeiro GnRH (grupo eMGPG) não manifestaram estro antes da aplicação da prostaglandina. É sabido que a progesterona bloqueia a pico ovulatório do LH (CHRISTIAN; CASIDA, 1948; SIRIOS; FORTUNE, 1990). Esses resultados indicam que ao menos parte das novilhas estavam em fase média do diestro, no momento da aplicação do eCG, e não tiveram um folículo responsivo ao GnRH, demonstrando mais uma janela de falha à indução da ovulação em que o eCG não contribuiu ao crescimento folicular.

O estudo da dinâmica folicular revelou que novilhas que receberam eCG no momento da emergência de uma onda folicular (novilhas do grupo com folículos pequenos - 5mm), não apresentaram um folículo maior do que 10mm para responder ao GnRH (Figura 3). As novilhas do grupo de folículos pequenos tiveram um comportamento similar ao das novilhas

do grupo controle (sem eCG) quanto a dinâmica de crescimento folicular, explicando a baixa resposta ao GnRH.

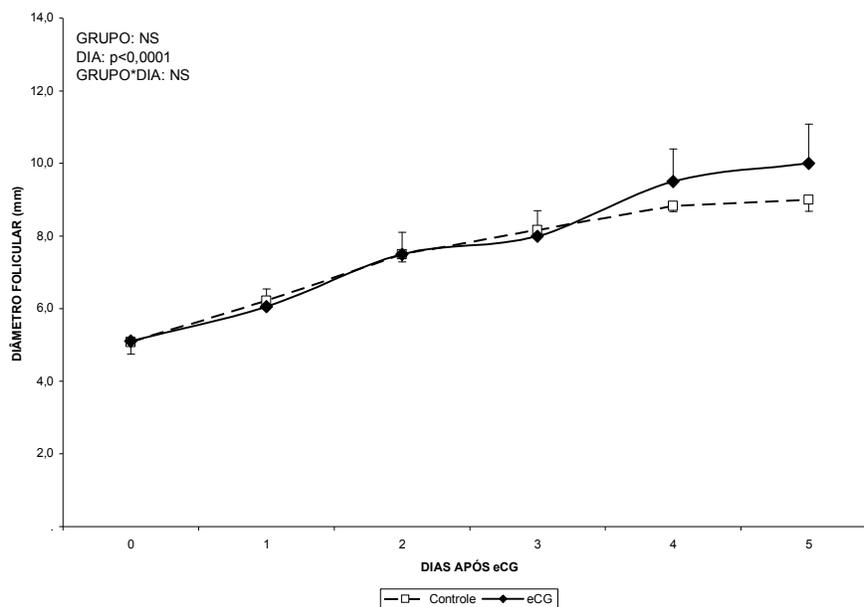


Figura 3: Crescimento dos folículos com diâmetro de 5mm a partir da aplicação ou não de eCG em novilhas de corte com 12 a 14 meses de idade.

Por outro lado, as novilhas dos grupos médios e grandes apresentaram folículos com 10mm ou superiores no terceiro dia após a aplicação de eCG (Figura 4). Quando o folículo estava na fase de divergência (grupo de folículos médios no momento do eCG), alguns folículos já estavam entrando em atresia no quarto dia após o eCG, reduzindo a média do tamanho folicular neste grupo. Esses achados evidenciam que os folículos com 10mm e alguns com 8,5mm no momento do eCG atingem o tamanho ideal para responder ao GnRH, demonstrando a importância do tamanho folicular nesse sistema de indução da ovulação e IATF.

Os índices de concepção (65,0% - 13/20 e 68,4% - 13/19) e prenhez (37,6% - 32/85 e 28,2% - 24/85) foram similares entre os grupos eMGP e eGP, respectivamente. Numericamente, o programa *Ovsynch* tem resultado também em percentagens de prenhez entre os 25% e 35% quando empregados em novilhas (SCHMITT et al., 1996; PURSLEY et al., 1997). O índice geral de 22,9% (39/170) de novilhas que manifestaram estro entre a aplicação de prostaglandina e GnRH demonstra a necessidade do controle de estro nas 48h seguintes da aplicação de prostaglandina.

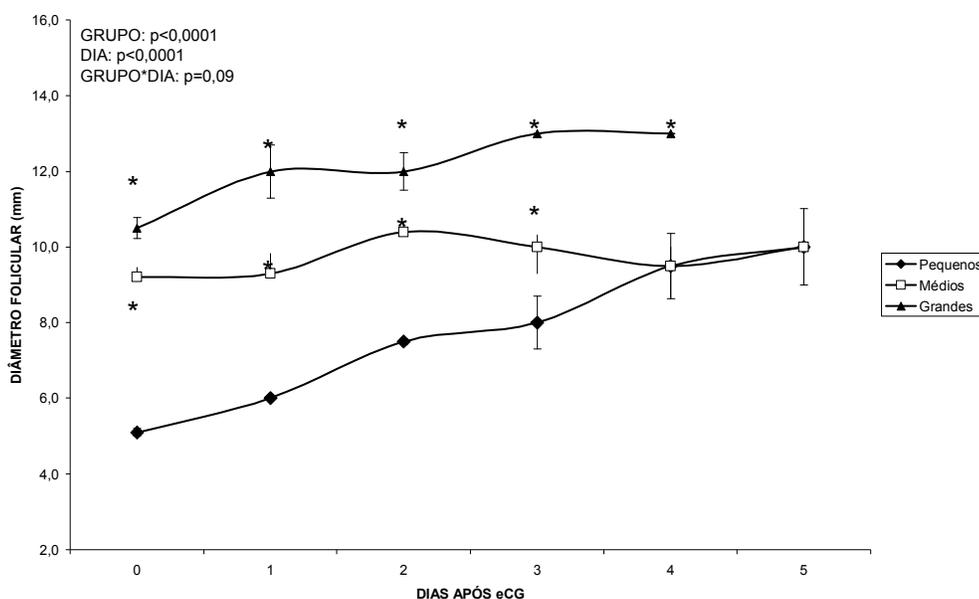


Figura 4: Crescimento folicular após a aplicação de eCG nos grupos de folículos pequenos (5mm), médios (8,5mm) e grandes (>10mm) em novilhas de 12 a 14 meses de idade.

Quando computados apenas os índices alcançados após a IATF, a percentagem de prenhez foi de 29,2% (19/65) e 16,6% (11/66) nos grupos eMGPG e eGPG, respectivamente. Esses resultados são evidências da falta de sincronismo no tamanho folicular e, conseqüentemente, da ovulação, provavelmente em decorrência da falta de resposta ao primeiro GnRH. Por outro lado, apesar de geralmente não ocorrer a ovulação de folículos menores do que 11mm em resposta ao GnRH, quando isso ocorre, os índices de prenhez são menores e os de mortalidade embrionária e fetal são maiores, em decorrência de baixas concentrações de progesterona e menor capacidade embrionária de produzir interferon tau (GEARY et al., 2005; PERRY et al., 2005), podendo justificar uma pequena parte dos baixos índices de prenhez no sistema estudado.

Um fato agravante nos resultados de prenhez é a idade de 12 a 14 meses das novilhas. Esta categoria de animais apresenta, no programa *Ovsynch*, taxas de ovulação, após a primeira injeção de GnRH, da ordem de 50% (MARTINEZ et al., 1999), ao passo que em vacas esse índice varia de 64% (VASCONCELOS et al., 1999) a 90% (PURSLEY et al., 1995). A dinâmica folicular das novilhas explica esse menor desempenho em relação a vacas adultas. Igualmente, devemos levar em conta que muitas novilhas possam não ter atingido a puberdade, mesmo recebendo uma fonte de progestágeno (MAP), como no caso das fêmeas do grupo eMGPG. A esse respeito, a ciclicidade das fêmeas não foi avaliada ao início dos trabalhos, mas somente idade, peso e condição corporal, para refletir exatamente a realidade do manejo reprodutivo empregados nas empresas rurais. Nesse sentido, a percentagem de prenhez é da ordem de 19% inferior em novilhas inseminadas em seu estro puberal, quando comparadas a suas contemporâneas inseminadas ao seu terceiro estro (BYERLEY et al., 1987).

CONCLUSÃO

O tamanho folicular, concepção e prenhez não é incrementada pela utilização de MAP em um programa de indução/sincronização de estro que associa, eCG, GnRH, PG, GnRH. Ainda, os índices de prenhez em novilhas entre 12 a 14 meses de idade, com o emprego de eCG três dias antes da primeira aplicação de GnRH, estão dentro da amplitude descrita para o programa *Ovsynch*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 et al. Evaluation of timed insemination using a gonadotropin-releasing agonist in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.1385-1393, 1996.

BYERLEY, D.J et al. Pregnancy rates of beef heifers bred either on puberal or third estrus. **Journal Animal Science**, v.65, p.645-650, 1987.

CHRISTIAN. R.E.; CASIDA.L.E. The effect of progesterone in altering the oestral cycle of the cow. **Journal of Animal Science**, v.7, p.540, 1948.

DZIUK, P.J.; BELLOWS, R.A. Management of reproduction of beef cattle, sheep and pigs. **Journal of Animal Science**, v.57, supl.2, p.355-377, 1983.

GEARY et al. Ovarian and estrous response of suckled beef cows to the Select Synch estrous synchronization protocol. **Prof. Anim. Sci**, v.16, p.1-5, 1998.

GINTHER et al. Temporal association among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and three follicular waves. **Journal Reproductive Fertility**, v.87, p.223-230, 1989

KERR et al. Evaluation of three estrus synchronization regimens for use in extensively managed Bos indicus and Bos indicus/ Taurus heifers in northern Australia. **Theriogenology**, v.36, p.129-141, 1991.

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

MACMILLAN; THATCHER, Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v.45, p.883-889, 1991.

MARTINEZ et al. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v.57, p.23-33, 1999.

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

MOREIRA et al. Effects of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. **Journal of Animal Science**, v.78, p.1568-1576, 2000.

PERRY et al. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. **PNAS**, v.102, n.14, p.5268-5273, 2005.

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

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

RIBEIRO et al. Taxa de prenhez em novilhas selecionadas por escore ovariano, submetidas a inseminação artificial com tempo pré-fixado sincronizadas pelo protocolo Ovsynch. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.25, n.1, p.292-294, 2001.

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

SCHMITT et al. Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotrophin-releasing or an agonist of gonadotrophin-releasing hormone. **Journal of Animal Science**, v.74, p.1074-1083, 1996.

SILVEIRA et al. Proposta de um novo sistema de indução de estro e inseminação artificial pré-fixada (sistema BioRep) em comparação com sistemas de desmame definitivo e temporário para vacas de corte no pós-parto. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p.590-591, 2003.

SILVEIRA, R.L. **Regulação de receptores esteróides, dinâmica folicular e incremento na eficácia reprodutiva pós-parto das vacas de corte**. 2005.85f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

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

THOMPSON et al. Follicular, hormonal, and pregnancy responses of early postpartum suckled beef cows to GnRH, norgestomet, and prostaglandin F2 α . **Jornal of Animal Science**, v.77, p.1823-1832, 1999.

TWAGIRAMUNGU et al. Synchronization of estrus and fertility in beef cattle with two injections of Buserelin and prostaglandin. **Theriogenology**, v.38, p.1131-1144, 1992.

TWAGIRAMUNGU 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.

VASCONCELOS et al. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and conception rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrus cycle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.52, p. 1067-1078, 1999.

WILTBANK, M.C. How information on hormonal regulation of the ovary has improved understanding of timed breeding programs. **Proc. Annual Meeting Soc. For Theriogenology**, Montreal, PQ, p. 83-97, 1997.

XU et al. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid in bovine follicles of the first follicle wave. **Biology of Reproduction**, v.53, p.951-957, 1995.

5. DISCUSSÃO

Este estudo procurou desenvolver e avaliar o desempenho reprodutivo de dois programas hormonais para sincronização e ou indução de estro e ovulação em novilhas de corte com idade entre 12 e 14 meses. Os referidos programas associam o emprego da IATF, após curto período de detecção de estro (48h).

O aumento da produtividade da pecuária de corte, tanto no Brasil como no Estado do Rio Grande do Sul, tem sido colocado como uma alternativa de melhoria do resultado econômico das empresas dedicadas à atividade (BERETTA et al., 2001). Nesse sentido, tanto o Brasil como nosso Estado têm um grande potencial para a produção de carne bovina, entretanto, apresentam baixa eficiência, tendo propriedades onde as fêmeas têm idade ao primeiro parto entre 36 e 42 meses e intervalo entre partos variando de 18 a 24 meses. Assim, a antecipação da idade ao primeiro parto e a diminuição do intervalo de partos são pontos fundamentais na produtividade da pecuária de corte.

A esse respeito, FRIES; ALBUQUERQUE (1999) revelam que quando o sistema produtivo baseia-se na primeira parição aos quatro anos de idade, o nível de desfrute do rebanho fica em torno de 10%. Esse índice de desfrute pode ser quase duplicado, se a primeira parição ocorrer aos 3 anos de idade e atingirá 40% com o primeiro parto aos 24 meses de idade e abate dos machos aos 12 a 13 meses. Nessa tendência da intensificação da produção de bovinos de corte, empresas rurais começam a acasalar suas novilhas pela primeira vez aos 12 a 14 meses de idade, no conhecido “sistema um ano”. Nesses casos, o ponto central de interesse está no conhecimento de que existe maior eficiência biológica nas fêmeas que parem pela primeira vez aos dois anos de idade, havendo potencialmente maior lucratividade, pois a vaca produziria mais quilogramas de carne durante sua vida produtiva. Além disso, a redução do intervalo de gerações resulta em um maior ganho genético do rebanho como também, diminui a participação de animais improdutivos ou em recria na composição do rebanho.

Os hormônios esteróides (progesterona e estradiol) influenciam a síntese de gonadotrofinas hipofisiárias (LH e FSH). Assim, durante o ciclo estral bovino, a produção de

esteróides gonadais é caracterizada por concentrações altas de progesterona e baixas de estradiol na circulação. No entanto, ao final do ciclo estral, o corpo lúteo regride e o folículo dominante da última onda folicular torna-se o folículo pré-ovulatório, secretando quantidades aumentadas de estradiol. No período de pró-estro, acontece o declínio das concentrações de progesterona e aumento das concentrações de estradiol, como resultado, o aumento de frequência dos pulsos de LH finalizando com uma onda pré-ovulatória do mesmo, juntamente com o início do estro (SIROIS; FORTUNE, 1990). Tanto os estrógenos (folicular) como a progesterona (do corpo lúteo) influenciam a maneira de secreção das gonadotrofinas durante o ciclo estral e também afetam o crescimento folicular e desenvolvimento do corpo lúteo (MARTINEZ et al., 2001).

O emprego de esteróides ovarianos, na manipulação do desenvolvimento folicular, tem sido revisado e relatado nesta tese (WILTBANK, 1961; WILTBANK; KASSON, 1962; BÓ et al., 1993; 1995; O ROURKE et al., 2000). Eles revelaram a sincronização da emergência de uma nova onda de crescimento folicular, após a combinação de estrógenos e progesterona. Alguns ensaios experimentais mostraram também que o emprego de progesterona ou progestágenos induz a puberdade em novilhas de corte com o desenvolvimento de um corpo lúteo e início de ciclicidade (GONZALEZ-PADILLA et al., 1975; SHORT et al., 1976; ANDERSON et al., 1996).

Por outro lado, o eCG cria condições de crescimento folicular e de ovulação e seu emprego tem-se mostrado compensador em rebanhos com baixa taxa de ciclicidade, em animais no pós-parto (MACIEL et al., 2001; BASTOS et al., 2004; SILVEIRA et al., 2005) e em baixas condições nutricionais (BARUSELLI et al., 2004). Recentemente BARUSELLI et al (2004), em ensaio experimental realizado com novilhas da raça Nelore, verificaram um aumento na taxa de ovulação e nas concentrações plasmáticas de progesterona após, o emprego de eCG. Do mesmo modo, SILVEIRA et al (2005), mediante acompanhamento da dinâmica folicular em vacas no pós-parto, observaram que o eCG aplicado nas 24h da retirada do MAP, quando o folículo apresentava diâmetro ao redor dos 8mm, promoveu um maior crescimento folicular o qual, permitiu ao folículo alcançar diâmetros ao redor dos 13mm, diâmetro este, compatível com uma melhor resposta a onda pré-ovulatória do LH induzida pelo GnRH.

Baseado nessas considerações, o primeiro experimento procurou avaliar o efeito da aplicação de eCG em uma associação hormonal que utiliza o MAP e BE na sincronização de emergência de uma nova onda de crescimento folicular. Assim, o emprego do eCG objetivou um adicional efeito nesse crescimento, para o desenvolvimento de um sistema eficaz de

indução de estro/ ovulação e o emprego da IATF, após curto período de controle de estro (48h) em novilhas de corte com apenas 12 a 14 meses de idade.

Os resultados alcançados de manifestação de estro, após as 48h da retirada do MAP nos grupos tratamento (75,0% - eCG; 52,0% - confirmação) e controle (40,6%), não mostraram diferença significativa. Porém, 25,0% e 31,0% das novilhas manifestaram estro nas primeiras 24h da retirada do progestágeno nos grupos de tratamento (eCG; confirmação) respectivamente, sendo a ocorrência de manifestação de estro nas fêmeas do grupo controle, nas 48h dessa. Quando do emprego de progestágeno na sincronização de estro, o pico de manifestação do mesmo ocorre nas 48 da retirada da fonte de esteróide. Esses resultados concordam com os alcançados por outros grupos de pesquisa (RAMIREZ-GODINEZ et al., 2000) nos quais, o emprego do eCG encurtou o intervalo da retirada do progestágeno à manifestação de estro.

Essa manifestação precoce nos sugere a presença de um folículo dominante no momento da retirada do progestágeno, com capacidade de ovular espontaneamente logo após a luteólise induzida. Assim, a aplicação de eCG, junto ao agente luteolítico 24h da retirada do MAP, possibilitou ao folículo um crescimento e maturação final. Estudos revelaram que uma boa sincronia de estro é alcançada quando da presença de um folículo dominante na retirada do progestágeno (AUSTIN et al., 1999).

Quando avaliados os índices de concepção e prenhez, os resultados obtidos nos grupos tratamento (eCG- confirmação) de 50% e 46,9%; 60,4% e 45,6% respectivamente foram superiores e estatisticamente diferentes aos do grupo controle (23,07% e 25,0%). Isso nos revela que o emprego de eCG favoreceu o desempenho reprodutivo nas novilhas com ele tratadas. Entretanto, os resultados obtidos na IATF ficaram aquém do esperado. Acreditamos que muitas novilhas falharam em responder ao GnRH quando da sincronização da ovulação para o emprego da IATF. Essa falha na resposta pode ter sido devida ao folículo não apresentar um diâmetro compatível com uma melhor resposta ao GnRH em algumas fêmeas.

A esse respeito, PERRY et al. (2005) confirmam que a ovulação de folículos menores do que 11mm no seu diâmetro, resultaram em índices de prenhez diminuídos e mortalidade embrionária aumentadas. Aliado a isso, muitas fêmeas, mesmo sendo tratadas com progestágenos, podem não ter alcançado a puberdade visto que não verificamos o seu estado de ciclicidade ao início dos trabalhos. Este fato foi evidente em novilhas do grupo controle.

Outro método a sincronizar a emergência de uma onda de crescimento folicular é o de induzir a ovulação ou luteinização de um folículo dominante presente ao momento do tratamento. Assim, o GnRH e o próprio LH são as substâncias de escolha nessa indução

(MACMILLAN; THATCHER, 1991, MARTINEZ et al., 1999). A administração de GnRH exógeno ou de seus análogos estimulou a liberação de FSH e LH. Além disso, o intervalo do tratamento com GnRH ou LH e a emergência de uma nova onda folicular têm sido relatadas a ser de aproximadamente 2 dias (PURSLEY et al., 1995; TWAGIRAMUNGU et al., 1995; MARTINEZ et al., 1999). Entretanto, a ovulação aconteceu somente quando um folículo dominante ativo estava presente ao momento do tratamento, sincronizando efetivamente a emergência de uma nova onda (KASTELIC; MAPLETOFT, 1998). Em estudos anteriores, MACMILLAN; THATCHER, (1991) tinham reportado que, após a aplicação de GnRH ou seus análogos, verificava-se a ovulação ou luteinização do folículo presente ao momento do tratamento.

Protocolos hormonais que consistem em duas injeções de GnRH, aplicadas com intervalo de 9 dias e uma injeção de prostaglandina dois dias antes da aplicação do segundo GnRH, foram desenvolvidos e denominados de protocolos *Ovsynch* (PURSLEY et al., 1995). Esses protocolos têm permitido alcançar índices aceitáveis de fertilidade a IATF, realizada nas 16 a 24h após o segundo GnRH em vacas adultas. Os resultados em novilhas, porém, foram inferiores, ficando ao redor dos 15% a 20% (PURSLEY et al., 1995; WILTBANK, 1997).

Por outro lado, uma percentagem de fêmeas têm sido detectadas em estro precocemente entre o primeiro GnRH e a prostaglandina, impedindo o emprego de IATF ao final do protocolo. Esse evento foi atribuído à baixa incidência de ovulação ao primeiro GnRH (50%). O emprego de GnRH ou de seus análogos, em diferentes estágios de crescimento do folículo da primeira onda folicular, resultou em 56% (GnRH) ou 78% (pLH) (MARTINEZ et al., 1999) de ovulação nas novilhas tratadas. Além disso, verificou-se que as concentrações de progesterona circulantes ao momento do tratamento podem influenciar a maior ou menor resposta ao GnRH nessas novilhas. Assim, a resposta ovulatória diminuiu de 89% no dia 3 para 56% no dia 6, até chegar a 22% no dia 9 do ciclo.

Além disso, o estágio do folículo dominante interferiu na mesma resposta na qual, folículos dominantes, menores do que 8mm no diâmetro, não ovularam após o tratamento, apesar de 50% delas o terem feito. É esperado que a ovulação induzida pelo segundo GnRH venha a ser completada caso o folículo dominante tenha sido selecionado e adquirido receptores para o LH previamente (XU et al., 1995). A inserção de um CIDR-B entre o primeiro GnRH e o agente luteolítico resultou em aumentos nos índices de prenhez das novilhas tratadas (MARTINEZ et al., 2000).

A partir dessas considerações, desenhamos e implantamos o segundo experimento, em que procuramos desenvolver um protocolo hormonal para sincronização e/ou indução de estro em novilhas de corte de apenas 12 a 14 meses de idade que permita associar também o emprego de IATF após um curto período de controle de estro (48h). O referido protocolo baseou-se no emprego de um análogo de GnRH na indução de emergência de onda folicular. Tentando melhorar a reposta folicular ao GnRH, buscamos estimular o crescimento do folículo previamente mediante o uso de eCG, baseados na ação folículo estimulante deste. A referida gonadotrofina exógena foi empregada nas 72h prévias à aplicação de GnRH levando em conta os resultados da dinâmica folicular realizada por SILVEIRA et al. (2005) os quais, tinham verificado o efeito no folículo da aplicação de eCG nas 24h anteriores a retirada da fonte de progestágeno (MAP). Os resultados desse estudo revelaram que, após 72h do eCG, os folículos alcançavam o melhor diâmetro para uma melhor resposta ao GnRH (13mm).

Sendo assim, a nossa hipótese consistiu em que o maior crescimento do folículo, proporcionado pelo emprego de eCG, permitiria ao mesmo uma melhor resposta ovulatória quando da aplicação do GnRH, além uma melhor sincronização da emergência de onda folicular. Aliado a isso, um folículo de maior diâmetro no momento de sua ovulação dará origem a um corpo lúteo de maior calibre, com condições de produzir mais progesterona. Estes níveis plasmáticos de esteróide produzidos seriam suficientes para manter o crescimento do folículo até a indução da luteólise.

As percentagens de fêmeas, manifestando estro após a indução da luteólise, foram de 23,5% (20/85) e 22,3% (19/85) nos grupos eMGPG e eGPG, respectivamente. Entretanto, 21,0% (4/19) das novilhas do grupo eGPG manifestaram no intervalo do primeiro GnRH e da prostaglandina. Por outro lado, nenhuma das que recebeu o MAP junto ao GnRH o fez. MARTINEZ et al (2002) reportam índices de 18% de novilhas em estro anteriormente à aplicação do agente luteolítico, revelando a falta de ovulação do folículo quando da aplicação de GnRH. Isso nos remete à necessidade de uma fonte de progestágeno para evitar a manifestação de estro e ovulação precoces nesse intervalo, o que causa uma assincronia de emergência de onda folicular e sincronização de ovulação. A hipótese de um maior crescimento folicular, resultante da prévia aplicação de eCG que, por sua vez, reverteria em um maior corpo lúteo com potencial de produzir maiores concentrações de progesterona, não foi mantida.

Os índices de concepção 65,0% (13/20) e 68,4% (13/19) e prenhez de 37,6% (32/85) e 28,2% (24/85) nos grupos eMGPG e eGPG, respectivamente, não mostraram diferença significativa, assim como os índices de prenhez oriundos da IATF de 29,2% (19/65) no grupo

eMGPG e 16,6% (11/66) no grupo eGPG também não. Numericamente os índices de prenhez alcançados com o protocolo *Ovsynch* em novilhas situam-se também nos 25% a 35% (SCHMITT et al., 1996; PURSLEY et al., 1997). Estes resultados refletem a pobre sincronia de ovulação alcançada durante o tratamento, concluindo-se que muitas fêmeas não apresentassem um folículo de diâmetro compatível a uma melhor resposta ao GnRH quando da sincronização da ovulação para o emprego de IATF. Por outro lado, muitas novilhas podem ter ovulado folículos menores, resultando em corpos lúteos pequenos, concentrações de progesterona inferiores e perdas embrionárias e de prenhez aumentadas (PERRY et al., 2005).

O acompanhamento da dinâmica folicular, a qual avaliou o efeito do eCG em várias fases do crescimento folicular, mostrou que fêmeas que receberam a gonadotrofina exógena no momento de emergência de onda (grupo de folículos de 5mm) comportaram-se similarmente as fêmeas que não a receberam (grupo controle). O intervalo de 72h entre o eCG e o GnRH neste grupo não permitiu que as fêmeas tivessem um folículo com diâmetro compatível a uma melhor resposta ovulatória ao último, sob níveis de progesterona endógena oriundos de um corpo lúteo. Isso significa que, ao falharem em responder ao primeiro GnRH, não tiveram sua emergência de onda sincronizada e, por conseguinte, a ovulação, refletindo-se em baixos índices de prenhez na IATF principalmente.

Por outro lado, as novilhas dos grupos de folículos médios (8,5mm) e grandes (>10mm) quando do momento da aplicação de eCG têm chances de apresentar, ao momento da aplicação de GnRH, um folículo com condições de melhor resposta ovulatória. Nesse momento de crescimento folicular, os folículos já apresentam uma maior quantidade de receptores para o LH (XU et al., 1995), que se traduz em capacidade de resposta ao LH. Pelo referido, o diâmetro folicular passa a ser fator crítico no sucesso dos protocolos avaliados, tanto quando sincronizamos a ovulação com GnRH para o emprego de IATF (primeiro e segundo experimento) como quando da sincronização de emergência de uma nova onda de crescimento folicular (segundo experimento) pelo emprego desse hormônio.

Os protocolos desenvolvidos e avaliados para o emprego em novilhas de 12 a 14 meses de idade promoveram índices de prenhez satisfatórios, se considerarmos que ao redor de 45% das fêmeas têm condições de conceberem após 3 dias de inseminação artificial. Além do mais, surge a possibilidade de conceberem ao início da estação de monta, fator crítico nesta categoria. Isso se justifica pelo fato de que virão a parir ao início da estação de produção, tendo mais tempo de recuperação no pós-parto e condições de repetição de cria, já

que um dos gargalos na produção pecuária é o desempenho reprodutivo das fêmeas primíparas.

6. CONCLUSÕES

- O emprego da eCG, 24h antes da retirada do MAP, incrementa os índices de prenhez, independentemente do estado de ciclicidade das novilhas;
- A eCG, aplicada previamente a uma associação de GnRH e prostaglandina para a sincronização de emergência de uma nova onda de crescimento folicular e da ovulação, não incrementa os índices de prenhez, necessitando uma fonte de progestágeno para evitar a manifestação precoce de estro e sincronizar a ovulação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G.P et al. Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.100, p.27-33, 1994.

ADAMS, G.P. Control of ovarian follicular dynamics in mature and prepubertal cattle for synchronization and superstimulation. PROCEEDINGS XX WORLD BUIATRICS CONGRESS, Sydney, Australia. p.595-606, 1998.

ADAMS, G.P. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.54, p.17-32, 1999.

ADVIS, J.P. et al. Direct hypothalamic control of vasoactive intestinal peptide (VIP) levels in the developing rat ovary. **Brain Research Bull**, v.22, p.605-610, 1989.

ALLEN, W.R. The immunological measurement of pregnant mare serum gonadotrophin. **Journal Endocrinology**, v.43, p.593-598, 1969.

ALLEN, W.R; MOOR, R.M. The origin of the equine endometrial cups. I. Production of PMSG by foetal trophoblast cells. **Journal of Reproduction of Fertility**, v.29, p.313-316, 1972.

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

ARMSTRONG, D.T. Recent advances in superovulation of cattle. **Theriogenology**, v.39, p.7-24, 1993.

BAGAVANDOSS, P. et al. Developmental changes in the ovarian follicular basal lamina detected by immunofluorescence and electron microscopy. **Journal Histochemic and Cytochemic**, v.31, p.633-640, 1983.

BAIRD, D.T. Reproductive hormones. In: AUSTIN, C.R; SHORT, R.V (eds). **Reproduction in mammals**. 1972. Cambridge University Press: London.p.1-28.

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

BAO, B; GARVERICK, H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal of Animal Science**, v.76, p.1903-1921, 1998.

BARNES, M.A. et al. Follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and estradiol-17 β response in GnRH treated prepubertal Holstein heifers. **Biology of Reproduction**, v.22, p.450-465, 1980.

BARUSELLI, P.S. et al. Programas de IA em tempo fixo em Bos-Indicus. **Curso de Abordagem teórico-prática de novas técnicas de sincronização sem observação de cio em bovinos (IA e TE)**. Coronel Procópio, PR, Outubro 2001.

BARUSELLI, P.S. et al. Effect of eCG on pregnancy rates of lactating zebu beef cows treated with CIDR-B devices for timed artificial insemination. **Theriogenology**, v.59, n.1, p.214, 1993.

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

BARUSELLI, P.S. et al. Inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte, In: 1º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, Londrina, PR. **Anais....**246p. p.155, 2004.

BARRET, S. et al. Initiation of the estrous cycle in the ewe by infusion of PGF2 α to the autotransplanted ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.24, p.136-137, 1971.

BARROS, C.M. et al. Controle farmacológico do ciclo estral e superovulação em zebuínos de corte. In: **Simpósio sobre controle farmacológico do ciclo estral em Ruminantes**. São Paulo: Fundação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, 2000, 332p.

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

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.

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

BERARDINELLI, J.G. et al. Source of progestone prior to puberty in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v.49, n.5, p.1276-1280, 1979.

BERETTA, V. et al. Produtividade e eficiência biológica de sistemas pecuários de cria diferindo na idade das novilhas ao primeiro parto e na taxa de natalidade do rebanho no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.4, p.1278-1286, 2001.

BINELLI, M. Estratégias anti-luteolíticas para a melhora da sobrevivência embrionária em bovinos. In: **Simpósio sobre controle farmacológico do ciclo estral em Ruminantes**. São Paulo. Fundação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, 2000, 332p.

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. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v.43, p.31-40, 1995.

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

BÓ, G.A. et al. Programas de inseminación artificial y transferencia de embriones a tiempo fijo. In: 1º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2004, Londrina, PR. **Anais...**Londrina: Hotel Sumatra, 2004. p.56-81.

BORGES, A.M. et al. Dinâmica folicular ovariana em novilhas mestiças Holandês-Zebú. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.1-13, 2001.

BORGES, J.B.S; GREGORY, R.M. Indução e sincronização de estro com progesterona, benzoato de estradiol e GnRH de vacas de corte acíclicas para inseminação artificial a tempo fixo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.3, p.312-314, 2001.

BOSU, W.T.K. The use of GnRH in bovine reproduction. **Compendium Continuum Education Practice Veterinary**, v.4, p.555, 1982.

BRAGANÇA, J. F. M. et al. Sincronização de estro e ovulação em novilhas de 12 a 14 meses de idade e inseminadas artificialmente com observação de estro e horário pré-fixado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, p. 73-77, 2004.

BRANDÃO, B.J.F et al. Efeito da Progesterona e PMSG no comportamento reprodutivo de Novilhas da Raça Hereford. Disponível em: <http://www.sbz.org.br/eventos/Fortaleza> Acesso em: 20/09/2005.

BRAW-TAL, R; YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Journal Reproductive Fertility**, v.109, p.165-171, 1997.

BREUEL, K.F. et al. Factors affecting fertility in the postpartum cow: role of the oocyte and follicle in conception rate. **Biology of Reproduction**, v.48, p.655-661, 1993.

BRIDGES, P.J. et al. Follicular growth, estrus and pregnancy after fixed-time insemination in beef cows treated with intravaginal progesterone inserts and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v.52, p.573-583, 1999.

BURKE et al. Evaluation of timed insemination using a gonadotropin-releasing agonist in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.1385-1393, 1996.

BYERLEY, D.J et al. Pregnancy rates of beef heifers bred either on puberal or third estrus. **Journal Animal Science**, v.65, p.645-650, 1987.

- CALDANI, M. et al. LH pulsatile release and its control. In: THIBAUT, M.C; LEVASSEUR, R.H.F. **Reproduction in Mammals and Man**. Ed: Hunter Elipses: Paris, 1993, p.79-96.
- CASTILHO, C. et al. Resposta do corpo lúteo de vacas Nelore à PGF2 α administrada por via intramuscular ou via submucosa vulvar. **Arquivos Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v.25, n.1, p.204, 1997.
- CAVALIERI, J. et al. Synchronization of estrus and ovulation and associated endocrine changes in Bos Indicus cows. **Theriogenology**, v.47, p.801-814, 1997.
- CAVESTANY, D. Estrus synchronization in lactating Holstein cows with a vaginal sponge impregnated with medroxyprogesterone acetate. In: 13^o INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, Austrália. **Anais...** Sydney, 1996, p.4-13.
- CAVESTANY, D. et al. Use of medroxyprogesterone (MAP) in lactating Holstein cows within an Ovsynch protocol: follicular growth and hormonal patterns. **Theriogenology**, v.59, p.1787-1798, 2003.
- CHALLIS, J.R.G. Prostaglandins. In: AUSTIN, C.R; SHORT, R.V (eds). **Reproduction in Mammals**. 1972. Cambridge University Press, London. P. 81-116.
- CHEGINI, N. et al. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor gene expression in human myometrium and leiomyomata and the direct action of GnRH analogs on myometrial smooth muscle cells and interaction with ovarian steroids in vitro. **Journal Clinical Endocrinology ; Metabolism**, v.81, p.3215-3221, 1996.
- CHENAULT, J.R. LH and FSH of Holstein heifers to Fertirelin acetate, Gonadorelin and Buserelin. **Theriogenology**, v.34, n.1, p.81-98, 1990.
- CHUPIN, D; SAUMANDE, J. New attempts to decrease the viability of ovarian response to PMSG in cattle. **Annales Biology Animal Biochimie and Biophys**, v.19, n.5, p.1489-1498, 1979.
- CHUPIN, D; COMBARNOUS, Y; PROCUREUR, R. Antagonistic effect of LH on FSH-induced superovulation in cattle. **Theriogenology**, v.21, p.229, 1984.
- CHRISTIAN. R.E; CASIDA.L.E. The effect of progesterone in altering the oestral cycle of the cow. **Journal of Animal Science**, v.7, p.540, 1948.
- COLAZO, M.G. et al. Effects of dose and route of administration of cloprostenol on luteolysis, estrus and ovulation in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v.72, p.47-62, 2002.
- COLE, H.H; HART, G.H. Potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat. **American Journal Physiology**, v.93, p.57-58, 1930.
- COLE, H.H; GOSS, H.T. The source of equine gonadotropin. In: **Essays in Biology in Honour of H.M. Evans**, Ed: University of California Press, Califórnia.1943, p.107.

CORNER, G.W; ALLEN, W.M. Physiology of the corpus luteum. II Production of a special uterine reaction (progesterone proliferation) by extracts of the corpus luteum. **American Journal Physiology**, v.88, p.326, 1929.

COY, D.H; SCHALLY, A.V. Gonadotropin releasing hormone analogues. **Annales Clinics Research**, v.10, p.139-144, 1978.

CUMMING, I.A. et al. The time of oestrus and ovulation following various synchronization techniques using progesterone impregnated intravaginal devices. **Australian Veterinary Journal**, v.59, p.14-18, 1992.

DAY, M.L. et al. Endocrine mechanisms of puberty in heifers: estradiol negative feedback regulation of luteinizing hormone secretion. **Biology of Reproduction**, v.31, p.332-341, 1984.

DAY, M.L. et al. Effects of restriction of dietary energy intake during the prepubertal period on secretion of luteinizing hormone and responsiveness of the pituitary to luteinizing hormone-releasing hormone in heifers. **Journal of Animal Science**, v.62, p.1641-1648, 1986.

DAY, M.L. 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.

DEL CAMPO, C.H; GINTHER, O.J. Vascular anatomy of the uterus and ovaries and the unilateral luteolytic effect of the uterus: horses, sheep and swine. **American Journal Veterinary Research**, v.34, p.305-316, 1973.

DESJARDINS, C; HAFS, H.D. Levels of pituitary FSH and LH in heifers from birth to puberty. **Journal of Animal Science**, v.27, p.472-477, 1968.

DEUTSCHER, G.H. Estrus synchronization for beef cattle. Disponível na internet <<http://www.unl.edu/ianr/pubs/extnpuhs/beef/g493.htm>. Acesso em 28 dec.2006.

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

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

DODSON, S.E. et al. Endocrine changes from birth to puberty in the heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.82, p.527-538, 1988.

DOTT, H.M. et al. Effect of exogenous gonadotropin (PMSG) on the antral follicle population in the sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.56, p.683-689, 1979.

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

- DZIUK, P.J; BELLOWS, R.A. Management of reproduction of beef cattle, sheep and pigs. **Journal of Animal Science**, v.57, supl.2, p.355-377, 1983.
- ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal of Animal Science**, v.25, p.800-805, 1966.
- EVANS, A.C.O et al. Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.100, p.187-194, 1994a.
- EVANS, A.C.O et al. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.102, p.463-470, 1994b.
- EVANS, A.C.O; FORTUNE, J.E. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. **Endocrinology**, v.138, n.7, p.2963-2971, 1997.
- FINDLAY, J.K et al. Hormonal regulation of the reproduction: general concepts. **Animal Reproduction Science**, v.28, p.319-328, 1992.
- 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.
- FOLMAN, Y. et al. Comparison of methods for the synchronization of estrous cycles in dairy cows. 2. Effects of progesterone and parity on conception. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.2817-2825, 1990.
- FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v.50, p.225-232, 1994.
- FORTUNE, J.E. et al. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v.65, p. 648-654, 2001.
- FRIES, L; ALBUQUERQUE, L.G. Prenhez aos catorze meses: presente e futuro. Elementos do componente genético. In: XXXVI REUNIÃO ANUAL SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, julho 1999, Porto Alegre, RS. **Anais...** Porto Alegre, 1999. p.227-239.
- FRIKE, P.M. et al. Efficacy of decreasing the dose of GnRH used in a protocol for synchronization of ovulation and timed AI in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.50, p.1275-1284, 1998.
- GAINES, J.D. Analyzing the economic benefits of using prostaglandin for estrus synchronization of beef heifers. **Veterinary Medicine**, v.89, n.11, p.1085-1090, 1994.
- GARVERICK, H.A. et al. Regulation of expression of ovarian mRNA encoding steroidogenic enzymes and gonadotrophin receptors by FSH and GH in hypogonadotrophic cattle. **Reproduction**, v.123, p.651-661, 2002.

- GAY, V.L et al. Patterns of gonadotrophin secretion associated with ovulation. **Fedeen Proceedings**, v.29, n.6, p.1880-1887, 1970.
- GEARY, T.W. Ovarian and estrus response of suckled beef cows to the Select Synch estrous synchronization protocol. **Profit Animal Science**, v.16, p.1-5, 1998.
- GEARY, T.W; WHITTIER, J.C. Effects of timed insemination following synchronization of ovulation using the Ovsynch or Cosynch protocol in beef cow. **Profit Animal Science**, n.14, p.217-220, 1998.
- GEARY, T.W. Effect of calf removal on pregnancy rates of cows synchronized with the Ovsynch or Co-synch protocol. **Proceedings Western Section American Society of Animal Science**, n.49, p.205-207, 1998.
- GEARY, T.W. et al. Synchronization of ovulation using GnRH or hCG with the Co-Synch protocol in suckled beef cows. **Journal of Animal Science**, v.79, p.2536-2541, 2001 a.
- 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 b.
- GIBBONS, J.R. et al. Relationship between follicular development and the follicle-stimulating hormone surge decline in heifers. **Biology of Reproduction**, v.60, p.72-77, 1999.
- GINTHER, O.J. Internal regulation of physical processes through local venoarterial pathways: a review. **Journal of Animal Science**, v.39, p.550-564, 1974.
- GINTHER, O.J. et al. Temporal association among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, p.223-230, 1989.
- GINTHER, O.J. et al. Relationships between FSH and follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.108, p.271-279, 1996.
- GINTHER, O.J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. **Biology of Reproduction**, v.63, p.383-389, 2000.
- GINTHER, O.J. et al. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v.64, p.197-205, 2001.
- GODING, J.R. et al. Prostaglandin F₂ α . The luteolytic hormone in the ewe. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 28, p.146-147.
- GONG, J.G. et al. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. **Biology of Reproduction**, v.55, p.68-74, 1996.
- GONÇALVES, A.F.C. **Efeito da suplementação para matrizes Brangus de primeira cria**. 2003. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/Universidade de São Paulo, 2003.

- GONZÁLEZ, F.H.D. **Introdução a Endocrinologia Reprodutiva Veterinária**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS. Porto Alegre, 2002. p.89.
- GONZALEZ-PADILLA, E. et al. Puberty in beef heifers. II. Effects of injections of progesterone and estradiol-17 β on serum LH, FSH and ovarian activity. **Journal of Animal Science**, v.40, p.1105-1109, 1975.
- GORDON, I. Controlled breeding in cattle. **Animal Breeding Abstracts**, v.44, n.6, p.265-275, 1976.
- GOTTSCHALL, C.S. Desempenho reprodutivo de novilhas submetidas a um programa de sincronização deaios e avaliação do trato reprodutivo. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v.27, n.1, p.21-33, 1999.
- GREGORY, R.M; ROCHA, D.C. Protocolos de sincronização e indução de estros em vacas de corte na Rio Grande do Sul. In: 1° SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2004, Londrina, PR. **Anais...Londrina: Hotel Sumatra**, 2004. p.56-81.
- HALL, J.B. et al. Effect of age and pattern of gain on induction of puberty with a progestin in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v.75, p.1606-1611, 1997.
- HANSEL, W; CONVEY, E.M. Physiology of estrous cycle. **Journal of Animal Science**, v.57, n.2, p.404-424, 1983.
- HEAP, R.B; FLINT, A.P.F. Progesterone. In: AUSTIN, C.R; SHORT, R.V (ed) **Reproduction in Mammals**. Cambridge University Press: London, 1979. Cap.7.p.185-232.
- HERNÁNDEZ, C.J. et al. Inducción del estro con prostaglandina F2 alfa. Efecto del intervalo entre tratamiento y la presentación del estro sobre el índice de concepción de vaquillas Holstein. **Veterinária México**, v.25, p.19-27, 1994.
- HILL, I.D. Precocidade: o caminho do lucro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.20, n3/4, p.99-105, 1996.
- HOLMES, P.R. **The opportunity of a lifetime reproductive efficiency in the beef herd**. New Jersey: MSDAGVET, 1989.34p.
- 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.
- HONARAMOOZ, A. et al. Ultrasonographic evaluation of the pre-puberal development of the reproductive tract in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v.80, p.15-29, 2004.
- HUNTER, M.G. et al. Progesterone pretreatment has a direct effect on GnRH iduced preovulatory follicles to determine their ability to develop into normal copora lutea in anestrus ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.76, p.349-363, 1986.

- HURNIK, J.F. et al. Estrous and related behaviour in postpartum Holstein cows. **Application Animal Ethology**, v.2, p.55-68, 1975.
- HUTSON, J.M. et al. Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. **Endocrine Reviews**, v.18, p.259-280, 1997.
- IMORI, T. Biological half life of progesterone in the peripheral blood of the cows. **Japan Journal Veterinary Science**, n.29, p.201, 1967.
- INSKEEP, E.K. Potential uses of prostaglandins in control reproductive cycles of domestic animals. **Journal of Animal Science**, v.36, n.6, p.1149-1157, 1973.
- INSKEEP, E.K. et al. Receptors for luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in largest follicles of postpartum beef cows **Biology of Reproduction**, v.38, p.587-591, 1988.
- KANG, S.K. et al. Role of gonadotropin-releasing hormone as an autocrine growth factor in human ovarian surface epithelium. **Endocrinology**, v.141, p.72-80, 2000.
- KASTELIC, J.P. et al. Melengestrol acetate and estradiol – 17 β for synchronizing estrus and improving reproductive performance in beef cattle. **Canadian Journal Animal Science**, v.77, p.683-688, 1997.
- KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R.J. Follicular responses in dairy cows treated with GnRH and Cloprostenol. **Canadian Veterinary Journal**, v.39, p.107-109, 1998.
- KERR et al. Evaluation of three estrus synchronization regimens for use in extensively managed Bos indicus and Bos indicus/ Taurus heifers in northern Australia. **Theriogenology**, v.36, p.129-141, 1991.
- KINDER, J.E. et al. Endocrine regulation of puberty in cows and ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.34, p.167-186, 1987.
- KING, M.E. et al. Effect of stage of the estrous cycle on interval to estrus after PGF₂ alpha in beef cattle. **Theriogenology**, v.18, p.191-200, 1982.
- KING, R.G. et al. Genetic parameters in Herefords for puberty in heifers and scrotal circumference in bulls. **Proceedings Western Section American Society Animal Science**, v.34, p.11-17, 1983.
- KITTOK, R.J. et al. Endocrine response after GnRH in luteal phase cows and cows with follicular cysts. **Journal of Animal Science**, v.37, p.985-989, 1973.
- KOJIMA, F.N. et al. Development of an estrus synchronization protocol for beef cattle with short-term feeding of melengestrol acetate: 7-11 synch. **Journal of Animal Science**, v.78, p.2186-2191, 2000.
- KULICK, L.J. et al. Follicle selection in cattle: follicle deviation and codominance within sequential waves. **Biology of Reproduction**, v.65, p.839-846, 2001.

KUMAR, T.R. et al. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. **Nature Genetic**, v.15, p.201-204, 1997.

LAMB, G.C. et al. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F2 alpha for ovulation control in postpartum suckled beef cows. **Journal of Animal Science**, v.79, p.2253-2259, 2001.

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.

LAROCCA, C; MARTINEZ, Y.G. Inducción y sincronización del celo em novillas Siboney (5/8 H, 3/8 C) mediante bajas dosis de progesterona y PMSG. **Revista Cubana de Reproducción Animal**, v.9, n.2, p.7-13, 1983.

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

LAUDERDALE, J.W. Effects of PGF 2 α on pregnancy and estrus cycle of cattle. **Journal of Animal Science**, v.35, p.246, 1972.

LAVRANOS, T.C. et al. Anchorage independent culture of bovine granulosa cells: the effects of basic fibroblast growth factor and dibutyryl cAMP on cell division and differentiation. **Experiment Cell Research**, v.211, p.245-251, 1994.

LEMASTER, J.W. et al. Effectiveness of GnRH plus prostaglandin F2 alfa for estrus synchronization in cattle of Bos indicus breeding. **Journal of Animal Science**, v.79, p.309-316, 2001.

LEMON, M. The effect of oestrogens alone or in association with progesagens on the formation and regression of the corpus luteum of the cyclic cow. **Annales Biology Animal Biochimic and Biophys**, v.15, n.2, p.243-253, 1975.

LESMEISTER, J.L. et al. Date of first calving in beef cows and subsequent calf production. **Journal of Animal Science**, v.36, n.1, p.1-6, 1973.

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.

LIEHR, R.A. et al. Effects of prostaglandin on cattle estrous cycles. **Journal of Animal Science**, v.35, p.247, 1972.

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. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3615-3626, 1992.

LUSSIER, J.G. et al. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.81, p.301-307, 1987.

MACHATKOVA, M. et al. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase follicular wave on in vitro embryo production. **Theriogenology**, v.61, p.329-335, 2004.

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

MACKENZIE, B; KENNEY, R.M. Histologic features of ovarian follicles of gandotropin-injected heifers. **American Journal Veterinary Research**, v.34, p.1033-1040, 1973.

MACMILLAN, K.L. et al. Associations between the manipulation of patterns of follicular development and fertility in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.327-344, 2003.

MACMILLAN, K.L; PETERSON, A.J. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for synchronization, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anoestrus. **Animal Reproduction Science**, v.33, p.1-25, 1993.

MACMILLAN, K.L. et al. Plasma progesterone concentrations in heifers and cows treated with a new intravaginal device. **Animal Reproduction Science**, v.26, p.25-40, 1991.

MACMILLAN, K.L; THATCHER, W.W. Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v.45, p.883-889, 1991.

MACMILLAN, K.L; HENDERSON, H.V. Analyses of the variation in the interval from an injection of prostaglandin F2 alpha to oestrus as a method of studying patterns of follicle development during dioestrus in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.6, p.245-254, 1984.

MACNATTY et al. The microenvironment of the human antral follicle: interrelationship among the steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells and the status of the oocyte in vivo and in vitro. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.49, p.851-860, 1979.

MAHFUZ, P.A.A, et al. Eficiência de dois sistemas de controle do ciclo estral com inseminação artificial com tempo fixo em novilhas de corte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.3, p.314-316, 2001.

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

MAPLETOFT, R.J; GINTHER, O.J. Adequacy of main uterine vein and ovarian artery in the local venoarterial pathway for uterine-induced luteolysis in ewes. **Proceedings Society Experiment Biology Medicine**, p.124, 1974.

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

MARQUES, M.O. et al. Efeitos da administração de eCG e de benzoato de estradiol para sincronização da ovulação em vacas *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* no período pós-parto. In: V SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, Huerta Grande, v. 1, p.392, 2003.

MARTINEZ, M.F. et al. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v.57, p.23-33, 1999.

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

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

MARTINEZ, A.C. et al. Eficiência da inseminação artificial, com tempo pré-fixado em vacas lactentes com e sem bezerro ao pé. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.3, p.290-291, 2001.

MATSUO, H. et al. Structure of the porcine LH-and FSH releasing hormones. I. The proposed amino acid sequences. **Biochemistry Biophys.**, v.43, p.1334-1339, 1971.

MAUER, R.E. et al. Ovulation control in cattle with progesterone intravaginal device (PRID) and gonadotrophin releasing hormone (GnRH). **Annales Biology Animal Biophys.**, v.15, p.291-296, 1975.

MIALOT, J.P. et al. Estrus synchronization in beef cows: comparison between GnRH + PGF2 α + GnRH and PRID + PGF2 α + eCG. **Theriogenology**, v.60, p.319-330, 2003.

MIHM, M. et al. Effect of dominant follicle persistence on follicular fluid oestradiol and inhibin and on oocyte maturation in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.116, p.293-304, 1999.

MILVAE, R.A. et al. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v.45, p.1327-1349, 1996.

MONNIAUX, D. et al. Action of PMSG on follicular populations in the heifer. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, p.243-253, 1984.

MOOR, R.M. et al. Extra-ovarian control of folliculogenesis: limits of superovulation? **Theriogenology**, v.21, p.103-115, 1984.

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

- MORAES, J.F.C et al. Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos. In: GONÇALVES, P.B.D; FIGUEIREDO, J.R; FREITAS, V.J. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2001. Cap.2. p.25-55.
- MORAN, C. et al. Puberty in heifers: a review. **Animal Reproduction Science**, v.18, p.167-182, 1989.
- MOREIRA et al. Effects of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. **Journal of Animal Science**, v.78, p.1568-1576, 2000.
- MORRIS, C.A. A review of relationships between aspects of reproduction in beef heifers and their lifetime production. I. Associations with fertility in the first joining season and with age at first joining. **Animal Breeding Abstracts**, v.48, p.655-667, 1980.
- MULVEHILL, P; SREENNAN. Improvement of fertility in post partum beef cows by treatment with PMSG and progestagen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.50, p.323-325, 1977.
- MURPHY, B.D; MARTINUK, S.D. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrine Reviews**, v.12, n.1, p.27-44, 1991.
- NAKADA, K. et al. Changes in concentrations of plasma immunoreactive follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol-17 β , testosterone, progesterone, and inhibin in heifers from birth to puberty. **Domestic Animal Endocrinology**, v.18, p.57-69, 2000.
- NAKADA, K. et al. Changes in response to GnRH on luteinizing hormone and follicle stimulating hormone secretion in prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Development**, v.48, p.545-551, 2002.
- NEVES, J.P. et al. Utilização do Estrumate (Cloprostenol-ICI-80.996) em novilhas da raça Charolesa. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.3, p.29-34, 1979.
- NEVES, J.P. et al. Sincronização do ciclo estral em fêmeas nulíparas da raça Charolesa com prostaglandina F2 alfa análoga (Cloprostenol-ICI-80996) por via intramuscular. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.3, n.3, p.7-11, 1980.
- 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.
- ODDE, K.G. A review of synchronization of estrus in post-partum cattle. **Journal of Animal Science**. v. 68, p. 817-830, 1990.
- OLIVEIRA, J.V.L. et al. Efeito da dosagem hormonal sobre a fertilidade e a função luteal de vacas zebus sincronizadas com uma combinação de GnRH e prostaglandina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.3, p.323-326, 2001.
- ORY, S.J. Clinical used of luteinizing hormone-releasing hormone. **Fertility Sterility**, v.39, p.577-591, 1983.

- O'ROURKE, M.O. et al. The effect of dose and route of oestradiol benzoate administration on plasma concentrations of oestradiol and FSH in long-term ovariectomized heifers. **Animal Reproduction Science**, v.59, p.1-12, 2000.
- PATTERSON, D.J. Management considerations in heifers development and puberty. **Journal of Animal Science**, v.70, p.4018-4035, 1992.
- PETERSEN, S.L. et al. Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1771-1778, 2003.
- PANTOJA, C. et al. Taxa de prenhez em vacas Santa Gertrudis e Pitangueiras inseminadas com tempo pré-fixado e sincronizadas pelo protocolo Ovsynch. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.3, p.294-296, 2001.
- PARROTT, J.A; SKINNER, M.K. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Endocrinology**, v.140, p.4262-4271, 1999.
- PERRY, G.A. et al. Ontogeny of FSH receptor and steroidogenic enzyme mRNA expression in bovine fetal ovaries. **Biology of Reproduction**, v.62, sup.1, p.196, 2000.
- PERRY, G.A. et al. Effect of follicle size at time of GnRH-induced ovulation on luteal function and fertility. **Proceedings Western Section American Society Animal Science**, v.53, p.45-48, 2002.
- PERRY, G.A. et al. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. **PNAS**, v.102, n.14, p.5268-5273, 2005.
- PIERSON, R.A; GINTHER, O.J. Ultrasonography of the bovine ovary. **Theriogenology**, v.29, p.495-504, 1984.
- PIERSON, R.A; GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, v.29, p.21-37, 1988.
- PORTELA Jr, V.V.M. et al. Inseminação artificial com tempo pré-fixado empregando pessários de medroxi-progesterona. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.3, p.291-292, 2001.
- PORRAS, A.I; GALINA, C.S. Utilización de los progestágenos para la manipulación del ciclo estral bovino. **Veterinária México**, n.23, p.31-36, 1992.
- PRAÇA, B.N.L. et al. Utilização do CIDR associado ao benzoato de estradiol em vacas Nelore primíparas e múltiparas em anestro pós-parto com cria ao pé. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.3, p.310-312, 2001.
- PURSLEY et al. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. **Theriogenology**, v.44, p.915-923, 1995.
- PURSLEY et al. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at synchronized ovulation or synchronized estrus. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.295-300, 1997.

PURSLEY et al. Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.2139-2144, 1998.

QUIRKE, J.F. et al. Onset of puberty and duration of the breeding season in Suffolk, Rambouillet, Finnish Landracem Dorset and Finn-Dorset ewe lambs. **Journal of Animal Science**, v.60, p.1463-1471, 1985.

RAMIREZ-GODINEZ, J.A. et al. Uso de la PMSG o PGF2 alfa al retirar el implante del SMB en vacas productoras de carne. **Agrociência**, v.34, p.423-428, 2000.

RASBY, R.J. et al. Luteal function and estrus in peripubertal beef heifers treated with an intravaginal progesterone releasing device with or without a subsequeute injection of estradiol. **Theriogenology**, v.50, p.55-63, 1998.

RATHBONE, M.J. et al. Fertility regulation in cattle: review. **Journal Controloded Released**, v.54, p.117-148, 1998.

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

RETTMER, I. et al. Endocrine responses and ovarian changes in inseminated dairy heifers after injection of a GnRH agonist 11 to 13 days after estrus. **Journal of Animal Science**, v.70, p.508-517, 1992.

RIBEIRO et al. Taxa de prenhez em novilhas selecionadas por escore ovariano, submetidas a inseminação artificial com tempo pré-fixado sincronizadas pelo protocolo Ovsynch. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.25, n.1, p.292-294, 2001.

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

ROCHA, M.G; LOBATO, J.F.P. Avaliação do desempenho reprodutivo de novilhas de corte primíparas aos dois anos de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.3, p.1388-1395, 2002.

ROCHE, J.F. Calving rate of cows following insemination after a 12 day treatment with silastic coils impregnated with progesterone. **Journal of Animal Science**, v.43, n.1, p.164-169, 1976.

ROCHE, J.F. et al. Postpartum anoestrus in dairy and beef cows. **Animal Reproduction Science**, v.28, p.371-378, 1992.

ROCHE, J.F. et al. Physiology and practice of induction and control of oestrus in cattle. **Bovine Practice**, v.31, n.2, p.4-10, 1997.

RODRIGUES, H.D. et al. Estradiol regulation of LH secretion in heifers of two breeds that reach puberty at different ages. **Biology of Reproduction**, v.66, p. 603-609, 2002.

ROSENBERG, M. et al. Comparison of methods for synchronization of estrous cycle in dairy cows. 1. Effects on plasma progesterone and manifestation of estrus. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.2807, 1990.

ROWSON, L.E.A. et al. The use of prostaglandins for synchronization of oestrus in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.29, p.145, 1972.

SALVERSON, R.R. et al. Synchronization of estrus in virgin beef heifers using melengestrol acetate and prostaglandin: an efficacy comparison of Cloprostenol and Dinoprost Tromethamine. **Theriogenology**, v.57, p.853-858, 2002.

SANTOS, M.D. et al. Percentual de estro e taxa de gestação de vacas da raça Nelore sincronizadas com CIDR-B. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.3, p.308-310, 2001.

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

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT: User's guide**. 11 ed. Cary, 1996.

SAVIO, J.D. et al. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.83, p.663-671, 1988.

SCHILLO, K.K. et al. Regulation of luteinizing hormone secretion in prepubertal heifers: increased threshold to negative feedback of estradiol. **Journal of Animal Science**, v.54, p.325-336, 1982.

SCHILLO, K.K. et al. Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3994-4005, 1992.

SCHILLO, K.K. **Oestrus cycle**. Encyclopedia of Dairy Science. San Diego, CA: Academic Press. 2003.

SCHMITT, R.D. et al. Insemination of Holstein heifers at preset time after estrous cycle synchronization using progesterone and prostaglandin. **Journal of Animal Science**, v.58, n.4, p.793-800, 1984.

SCHMITT, R.D. et al. Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotrophin-releasing or an agonist of gonadotrophin-releasing hormone. **Journal of Animal Science**, v.74, p.1074-1083, 1996.

SEGUIN, B. Strategies for estrus control to improve dairy reproductive performance. **Proceedings Annals Meeting Society Theriogenology**, p.320-331, 1997.

SEMMELMANN, C.E.N. et al. Efeito de sistemas de alimentação no ganho de peso e desempenho reprodutivo de novilhas Nelore acasaladas aos 17/18 meses de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.3, p.835-843, 2001.

SHORT, R.E. et al. Induced or synchronized puberty in heifers. **Journal of Animal Science**, v.43, p.1254-1258, 1976.

SHORT, R.E. et al. Breeding heifers at one year of age: Biological and economic considerations. In: FIELDS, M.J.; SAND, R.S. **Factors affecting calf crop**. CRC Press, London, p.55-68, 1994.

SILVA, C.M. **Aspectos da Fisiologia e Patologia da Reprodução na égua Puro Sangue de Corrida**. Centro de Ciências Rurais. Universidade Federal de Santa Maria-UFSM, 1978.32p. (Publicação avulsa, 1)

SILVEIRA et al. Proposta de um novo sistema de indução de estro e inseminação artificial pré-fixada (sistema BioRep) em comparação com sistemas de desmame definitivo e temporário para vacas de corte no pós-parto. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p.590-591, 2003.

SILVEIRA, R.L. **Regulação de receptores esteróides, dinâmica folicular e incremento na eficácia reprodutiva pós-parto das vacas de corte**. 2005.85f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

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

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

SORENSEN, A.M. **Reproducción Animal: principios y prácticas**. McGraw-Hill. México, 1982. 302 p.

SMITH, V.G. et al. Response of postpartum beef cows to exogenous progestagens and gonadotropin releasing hormone. **Journal of Animal Science**, v.64, p.540-551, 1987.

SMITH, V.G; JENNES, L. Neural signals that regulate GnRH neurons directly during the oestrus cycle. **Reproduction**, v.122, p.1-10, 2001.

SPICER, L.J; ECHTERNKAMP, S.E. Ovarian follicular growth, function and turnover in cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v.62, p.428-451, 1986.

SPIRE, M.F. Managing replacement heifers from weaning to breeding. **Veterinary Medicine**, v.92, n.2, p.182-192, 1997.

STEVENSON, J.S. et al. Stage of estrous cycle, time of insemination and seasonal effects on estrus and fertility of Holstein heifers after prostaglandin F2 alpha. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.1798-1805, 1984.

STEVENSON, J.S. et al. Postinsemination administration of Receptal: follicular dynamics, duration of cycle, hormonal responses, and pregnancy rates. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.2536-2547, 1993.

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

STEWART, J.M; ALLEN, W.R. Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotropins. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.62, p.527-536, 1981.

SUÑE, J.F.V. et al. Inseminação artificial em gado de corte durante dez dias utilizando uma minidose de prostaglandina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.9, n.3, p.141-145, 1985.

TANABE, T.Y; HANN, R.C. Synchronized estrus and subsequent conception on dairy heifers treated with prostaglandin. I. influence on stage of cycle at treatment. **Journal of Animal Science**, v.58, p.805-811, 1984.

TANAKA, Y. et al. Appearance and number of follicles and change in the concentration of serum FSH in female bovine fetuses. **Reproduction**, v.121, p.777-782, 2001.

THATCHER, W.W. et al. Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. **Theriogenology**, v.31, p.149-164, 1989.

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

THATCHER, W.W. et al. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. **Theriogenology**, v.55, p.75-89, 2001.

THOMPSON et al. Follicular, hormonal, and pregnancy responses of early postpartum suckled beef cows to GnRH, norgestomet, and prostaglandin F2 α . **Journal of Animal Science**, v.77, p.1823-1832, 1999.

TRIMBERGER, G.W; HANSEL, W. Conception rate and ovarian function following estrus control by progesterone injection in dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v.14, 224, 1955.

TWAGIRAMUNGU et al. Synchronization of estrus and fertility in beef cattle with two injections of Buserelin and prostaglandin. **Theriogenology**, v.38, p.1131-1144, 1992.

TWAGIRAMUNGU 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.

VAN VOORHIS, B.J. Follicular development. In: KNOBIL, E ; NEILL, J.D (eds.). **Encyclopedia of Reproduction**, Academic Press, New York, 1999, n.2, p.376-389.

VAN WEZEL, I.L; RODGERS, R.J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1003-1011, 1996.

VASCONCELOS et al. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and conception rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrus cycle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.52, p. 1067-1078, 1999.

VOGG, G. et al. Utilidade do benzoato de estradiol após a suplementação com gestágeno na sincronização de cios de novilhas de corte. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, n.1, p.41-46, 2004.

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

WANDJI, S.A. et al. Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. **Biology of Reproduction**, v.55, p.942-948, 1996.

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

WATSON, E.D. A note on the effect of post-parturient fatty liver on clearance rate of exogenous progesterone from blood. **Animal Production**, n.42, p.425, 1986.

WEBB, R. et al. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.54, p.33-48, 1999.

WEHRMAN, M.E et al. Increasing exogenous progesterone during synchronization of estrus decreases endogenous 17 β -estradiol and increases conception in cows. **Biology of Reproduction**, v.49, p.214-220, 1993.

WILTBANK, J.N. et al. Effects of various forms of estrogens alone or in combinations with gonadotrophins on the estrous cycle in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v.20, p.341-346, 1961.

WILTBANK, J.N. et al. Use of progestational compounds alone or in combination with estrogen for synchronization of estrus. **Journal of Animal Science**, v.24, p.990-994, 1965.

WILTBANK, J.N; KASSON, C.W. Synchronization of estrus in cattle with an oral progestational agent and an injection of an estrogen. **Journal of Animal Science**, v.27, p.113, 1968.

WILTBANK, M.C. How information on hormonal regulation of the ovary has improved understanding of timed breeding programs. **Proceedings Annual Meeting Society For Theriogenology**, Montreal, PQ, p. 83-97, 1997.

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

WOLFE, M.W. et al. Opioid and 17β estradiol regulation of LH and FSH secretion during sexual maturation in heifers. **Domestic Animal Endocrinology**, v.8, n.4, p.491-498, 1991.

WRIGHT, P.J.; MALMO, J. Pharmacological manipulation of fertility. **Applied Food Animal Practitioner**, v.8, p.57-89, 1992.

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

XU et al. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid in bovine follicles of the first follicle wave. **Biology of Reproduction**, v.53, p.951-957, 1995.

ZARCO, L. et al. Release of Prostaglandin F₂ alpha and the timing of events associated with luteolysis in ewes with oestrus cycles of different lengths. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.83, p.517-526, 1988.

ZHAO, Y; LUCK, M.R. Gene expression and protein distribution of collagen, fibronectin and laminin in bovine follicles and corpora lutea. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.104, p.115-123, 1995.

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