

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

INDUÇÃO DA OVULAÇÃO EM NOVILHAS COM PGF_{2α}

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carlos Eduardo Porciuncula Leonardi

Santa Maria, RS, Brasil

2011

INDUÇÃO DA PUBERDADE EM NOVILHAS COM PGF_{2α}

por

Carlos Eduardo Porciuncula Leonardi

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

Orientador: Carlos Antonio Mondino Silva

Co-Orientador: Luiz Francisco Machado Pfeifer

Co-Orientadora: Mara Iolanda Batistella Rubin

Santa Maria, RS, Brasil

2011

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

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

INDUÇÃO DA OVULAÇÃO EM NOVILHAS COM PGF_{2α}

elaborada por
Carlos Eduardo Porciuncula Leonardi

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Carlos Antonio Mondino Silva, Dr
(Presidente/Orientador)

Lúcio Pereira Rauber, Dr
Instituto Farroupilha Concórdia/SC

Ivan Brondani, Dr
Departamento de Zootecnia UFSM Santa Maria/RS

Santa Maria, 21 de setembro de 2011.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de estudo durante toda a vida acadêmica.

Ao Programa de pós-graduação em Medicina veterinária.

Ao CNPQ pela bolsa.

Ao Dr. Carlos Antonio Mondino Silva pela orientação e ensinamentos ao longo do mestrado.

À Dra. Mara Iolanda Batistella Rubin, pela compreensão e pela disponibilidade de supervisão e orientação durante a pós-graduação, sempre com extrema dedicação aos valiosos ensinamentos transmitidos.

Ao Dr. Luiz Francisco Machado Pfeifer pela orientação, em especial pela oportunidade de compartilhar comigo suas idéias, conhecimento técnico e científico.

À equipe do Embryolab e da clínica de equinos pelos conhecimentos compartilhados, auxílios, companheirismo e amizade. Em especial aos pós-graduandos durante este período de convivência.

Aos estagiários do Embryolab que atualmente se fazem presente e os que já passaram por esta equipe.

A minha família, pais, irmã, namorada e avós pelo apoio, carinho e compreensão, em especial a minha Vó Gladis pelo incentivo e exemplo de vida.

Muito obrigado!

RESUMO

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

INDUÇÃO DA OVULAÇÃO EM NOVILHAS COM PGF_{2α}

Autor: Carlos Eduardo Porciuncula Leonardi

Orientador: Carlos Antonio Mondino Silva

Co-Orientador: Luiz Francisco Machado Pfeifer

Co-Orientadora: Mara Iolanda Batistella Rubin, Santa Maria, 21 Setembro de 2011

Neste estudo avaliou-se o efeito de 500µg de cloprostenol sódico (PGF_{2α}, Ciosin®) associado ou não ao tratamento prévio com um dispositivo intravaginal liberador de progesterona (P₄, CIDR®) sobre a taxa de ovulação de novilhas pré-púberes. Quarenta novilhas da raça Red Angus, com média de 250 kg de peso-vivo foram distribuídas aleatoriamente em três grupos experimentais: O grupo de fêmeas PPG (n=12) foi tratado com P₄ e PGF_{2α} via i.m no momento da retirada do CIDR. As fêmeas do grupo PG (n=14) receberam PGF_{2α} 5 dias após a emergência da onda folicular (n=14). As fêmeas do Grupo Controle (n=14) não receberam tratamento. Imediatamente após a colocação do CIDR®, as novilhas do grupo PPG receberam 50 mg de P₄ i.m. e 2 mg de benzoato de estradiol. Os dispositivos de CIDR® foram retirados no quinto dia após a emergência da nova onda folicular. A percentagem de ovulação foi maior nos Grupos PPG (10/12, 83,33%) e PG (11/14, 78,5%) comparados ao GC (1/14; 7,14%) (P< 0.0001). A PGF_{2α} induz a ovulação em novilhas pré-púberes, independente se associada ou não a progesterona exógena.

Palavras-chaves: pré-púbere, ovulação, cloprostenol, progesterona, *Bos taurus*.

RESUMO

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

INDUCTION OF OVULATION IN HEIFERS WITH PGF_{2α}

Autor: Carlos Eduardo Porciuncula Leonardi
Orientador: Carlos Antonio Mondino Silva
Co-Orientador: Luiz Francisco Machado Pfeifer
Co-Orientadora: Mara Iolanda Batistella Rubin
Santa Maria, 21 de setembro de 2011

In this study the effect of exogenous 500µg cloprostenol sódico (PGF_{2α} Ciosin®) with or without previous intravaginal progesterone (P4) releasing insert (CIDR) treatment on the ovulation rate of prepubertal heifers was evaluate. Forty crossbred Angus prepubertal heifers 250 kg in average were randomly assigned into three experimental groups: Progesterone + PGF_{2α} Group (PPG Group, n = 12) plus an im. injection of PGF_{2α} at the CIDR's remove, PGF_{2α} Group (PG Group, n = 14) heifers were treated im with PGF_{2α} five days after follicular wave emergence and the Control Group (n = 14) were not treated. Immediately after CIDR insert, the PPG heifers received im 50 mg of progesterone and 2 mg of estradiol benzoate. The CIDRs were removed on the fifth day after the emergence of a new follicular wave. The rate of ovulation was higher in PPG (10/12; 83.33%) and PG Groups (11/14; 78.50%) than in the Control Group (1 / 14; 7.14%) (P < 0.0001). Our study indicates that PGF_{2α} induces ovulation in prepubertal heifers in spite of its use with or without exogenous progesterone.

Key-words: pre-puberty, ovulation, cloprostenol, progesterone, *Bos taurus*.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1: Pattern of the dominant follicle growth in prepubertal heifers treated with $\text{PGF}_{2\alpha}$ with (PPG) or without (PG) prior exposure to progesterone and untreated Controls (A). Pattern of the dominant follicle growth in prepubertal heifers that ovulated following treatment (B). Pattern of development of dominant follicles of heifers that ovulated after treatment with $\text{PGF}_{2\alpha}$ with or without prior exposure to progesterone and untreated Control heifers (C). Comparison of pattern of dominant follicle development among groups considering only heifers that did not ovulate (D). The letters "a" and "b" refer to the days when there were differences among groups ($P < 0.05$).

FIGURA 2: Number of heifers with a corpus luteum detected by ultrasonography 7 (D7), 10 (D10) and 14 (D14) days after ovulation in prepubertal heifers treated with CIDR + 500 μg cloprostenol (PPG) or 500 μg cloprostenol (PG).

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO.....	8
2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1 Padrão de desenvolvimento folicular e hormonal em novilhas pré-púberes.....	10
2.2 Manipulação da puberdade em novilhas pré-púberes.....	12
2.3. Prostaglandina $F_{2\alpha}$	14
2.3.1 Crescimento folicular e ovulação.....	14
2.3.2 Luteólise.....	15
3-CAPÍTULO 1.....	17
4-CONCLUSÃO.....	32
5-REFERÊNCIAS.....	33

INTRODUÇÃO

A fêmea atinge a puberdade quando se torna capaz de liberar gametas e de manifestar sequências de comportamento sexual completo. A puberdade é o resultado de um ajuste gradativo entre o aumento da atividade gonadotrófica e a habilidade das gônadas em assumir simultaneamente a esteroidogênese e a gametogênese (HAFES 2004).

Segundo Satrapa et al (1973) e Evans et al. (1994a), terneiras com duas semanas de idade já apresentam um padrão de desenvolvimento folicular e entre a pré-puberdade e o início da puberdade há aumento no número de folículos e no tamanho do folículo dominante. O padrão do desenvolvimento folicular e os mecanismos de controle do crescimento folicular no período de pré-puberdade e durante o ciclo estral fisiológico de novilhas é aparentemente igual (ADAMS et al., 1994; EVANS et al., 1994b). Estes estudos demonstraram que há um padrão de desenvolvimento folicular em terneiras similar ao de novilhas em puberdade. Entretanto, a maturidade reprodutiva não é atingida com a primeira ovulação, mas continua a evoluir, sendo que o diâmetro do folículo dominante é menor comparado ao de novilhas mais velhas (GINTHER et al., 1989).

O peso corporal tem sido considerado um fator importante na determinação da idade a puberdade em novilhas e a nutrição cumpre um papel importante. A idade e o peso corporal interagem para a obtenção da puberdade em novilhas. A condição corporal é um importante determinante do momento da puberdade (CHELIKANI et al., 2003)

De acordo com Madgwick et al. (2005), o padrão de secreção de LH foi considerado um sinal crítico para o início da puberdade. Ocorre um aumento da frequência e amplitude dos pulsos de LH 40 a 80 dias antes da primeira ovulação (EVANS et al., 1994b). O aumento na frequência de liberação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo é o fator principal para o aumento do padrão de liberação de LH (EVANS et al., 1992). Os tratamentos com gonadotrofina podem estimular a ovulação em quase todas as idades em novilhas pré-púberes (SEIDEL et al., 1971), no entanto, esses esforços para diminuir a idade da entrada na puberdade e estimular ciclos estrais regulares não tem sido exitosos, a menos

que tenham sido feitos próximo a idade esperada da primeira ovulação (GONZALEZ-PADILLA et al., 1975; WHISNANT e BURNS 2002).

Há relatos de fertilização *in vivo* de oócitos de terneiras após a indução da ovulação e da inseminação artificial (SEIDEL et al., 1971), assim como a fertilização *in vitro* de oócitos após aspiração de folículos antrais (ARMSTRONG et al., 1992). Entretanto, os oócitos de terneiras e os embriões que elas produzem têm baixa competência de desenvolvimento e são menos tolerantes à manipulação que oócitos e embriões derivados de animais adultos (ARMSTRONG et al., 2001; GANDOLFI et al., 1998 ; PRESICCE et al., 1997). Porém, o uso da estimulação ovariana em combinação com tratamentos curtos de progestágenos é efetivo na produção de terneiros de fêmeas imaturas (TANEJA et al., 2000).

A puberdade pode ser antecipada pela administração de progesterona exógena que modula a frequência da pulsação de LH. Ela atua reduzindo o número de receptores de estradiol no hipotálamo, resultando no aumento da frequência dos pulsos de LH após final do tratamento com progesterona (IMWALLE et al., 1998).

Embora a prostaglandina e seus análogos sejam utilizadas para promover a luteólise, ela também interfere na ovulação, implantação, manutenção da prenhez, parto e fisiologia do pós-parto (WEEMS et al., 2006). As prostaglandinas podem ser preconizadas para sincronização do estro, exclusivamente ou associadas com progestágenos, estrógenos e GnRH.

A prostaglandina $F_{2\alpha}$ pode aumentar a resposta da pituitária ao GnRH e assim o aumento na liberação de LH no pós-parto de vacas e em novilhas pré-púberes, conseqüentemente a ovulação de um folículo dominante (RANDEL et al., 1996; PFEIFER et al., 2009). Com objetivo de avaliar se a $PGF_{2\alpha}$ pode induzir a primeira ovulação em novilhas pré-púberes observou-se a sua utilização com e sem a pré-sensibilização com progesterona.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Padrão de desenvolvimento folicular e hormonal em novilhas pré-púberes.

O crescimento folicular em fêmeas bovinas adultas ocorre em ondas. Durante este processo ocorre a emergência de folículos antrais, divergência de alguns folículos e a dominância de apenas um folículo que segue crescendo até a sua ovulação ou atresia (ADAMS et al., 1994). Nos bovinos, durante o ciclo estral ocorre duas a três ondas foliculares (GUINTER et al., 1989). O padrão de desenvolvimento folicular de novilhas pré-púberes é semelhante ao dos animais adultos, sendo que este padrão já é observado a partir da segunda semana de vida mantendo-se até a primeira ovulação (EVANS et al., 1994 a,b; ADAMS et al., 1994).

As ondas foliculares em novilhas pré-púberes, assim como em fêmeas adultas é precedido pelo aumento na concentração sérica de FSH (ADAMS et al., 1994; EVANS et al., 1994b). Sabe-se que há um marcado aumento na secreção de FSH a partir da sexta semana de idade e a sua concentração aumenta gradativamente até a vigésima quarta semana de vida. Porém, após este período a concentração sérica de FSH se mantém baixa e torna-se estável até o período prévio a primeira ovulação. Portanto, este aumento inicial pós-natal nas concentrações séricas de FSH aparentemente servem para estimular o desenvolvimento folicular, aumentando o número e o tamanho dos folículos antrais.

Entretanto, quando se observa os níveis diários plasmático de FSH, desde o nascimento até a primeira ovulação, observam-se picos de FSH em um intervalo médio de 7 dias (NAKADA et al., 2000). Enquanto o intervalo entre o nível basal e o pico de liberação de FSH se mantém, a concentração média desta gonadotrofina durante o pico diminui à medida que o animal desenvolve-se durante a pré- puberdade. Hanaramooz et al. (1999) relataram o aumento na concentração sérica de LH em terneiras a partir da sexta semana de idade bem como a liberação de LH que ocorre em pulsos. Este incremento está aparentemente relacionada com o

aumento da amplitude dos pulsos de LH. Porém, o aumento da concentração é transitório e não se observa mais após a vigésima quarta semana de vida.

Contudo, nos últimos 40 a 80 dias que antecedem a primeira ovulação há um relativo aumento na frequência dos pulsos de liberação de LH (DAY e ANDERSON, 1998). Este acréscimo que antecede a primeira ovulação impulsionará o aumento no tamanho dos folículos antrais, em consequência uma produção maior de estradiol.

A secreção precoce de gonadotrofinas pode refletir em uma maturação mais prematura do eixo hipotalâmico-hipofisário, seguido pelo estabelecimento da influencia inibitório que mantém a secreção de gonadotrofinas em controle até que se alcance o estado apropriado de crescimento somático ou desenvolvimento. Sendo assim, altos níveis nutricionais permitem um início rápido da maturidade sexual (BERGFELD et al., 1994; DAY et al., 1986). Portanto, aumento prematuro da frequência dos pulsos de LH está associado a um folículo de maior tamanho, ondas foliculares maiores e maior secreção de estrógeno.

A regulação da secreção de LH por meio de retro-alimentação negativo está muito cedo estabelecida nas terneiras, mas não exerce grande influencia na regulação da secreção de LH nas primeiras semanas após o nascimento (DAY et al., 1998; MOSELEY et al., 1994). Após o aumento inicial da secreção de LH o mecanismo de retro alimentação é re-estabelecido. Contudo, entre os 40 a 80 dias que antecedem a primeira ovulação ocorre nova redução da supressão do LH pelo estradiol, isso permite um aumento na frequência dos pulsos de LH, influenciado pelo aumento dos pulsos do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (DAY et al., 1984; DAY et al., 1987). Assim, há crescimento do folículo dominante e produção de estradiol por este folículo, até que o folículo dominante tenha secretado quantidades suficientes de estradiol para causar o pico pré-ovulatório de LH (DAY e ANDERSON, 1998)

Os opióides endógenos podem mediar os efeitos do estradiol na secreção de LH agindo como um inibidor da secreção de LH. Acredita-se que os opióides endógenos atuam direta ou indiretamente nos neurotransmissores do hipotálamo, neurônios produtores de GnRH, diminuindo sua secreção e reduzindo a liberação de LH pela pituitária durante o período pré-púbere (HANARAMOOZ et al., 2000; WOLFE et al., 1992).

Hanaramooz et al. (2000) observaram que o papel estimulante do sistema neuronal alfa adrenérgico se desenvolve 20 semanas antes da primeira ovulação.

Isso pode cumprir um papel na estimulação da secreção de LH antes da primeira ovulação, à medida que decresce o efeito da retro-alimentação negativa e dos opióides endógenos. A redução da retro-alimentação do estradiol pode ser mediado pela diminuição de seus receptores no hipotálamo.

Igualmente se tem demonstrado que a habilidade de um aminoácido excitatório (N-methyl-D,L-ácido aspártico) para causar a liberação de LH, aumenta das 4 a 36 semanas de idade e é mantido até as 48 semanas de idade, sendo que a primeira ovulação é vista na 55^a semana (HANARAMOOZ et al., 1998) de vida. Estes efeitos foram mediados, em parte, pelo óxido nítrico (HANARAMOOZ et al., 1999). A ativação ou desinibição dos neurônios que liberam aminoácidos excitatórios pode ser um mecanismo adicional para estimular a secreção de LH no período que antecede a primeira ovulação, juntamente com a diminuição da retro-alimentação negativa do estradiol e dos opióides endógenos (RAWLINGS et al., 2003)

Portanto, quando se observa em intervalos semanais as concentrações dos hormônios gonadotróficos e dos hormônios esteróides, o seu padrão pode ser dividido em três períodos: o primeiro período compreende as primeiras semanas de vida, onde há um recíproco relacionamento entre os esteróides e as gonadotrofinas. Altos níveis de esteróides ocorrem no período de maior mudança, aproximadamente na quarta semana de idade (segunda fase), havendo acréscimo nas concentrações de LH, estradiol 17 β , testosterona e inibina. A terceira fase compreende as cinco semanas que antecedem a primeira ovulação, onde há um aumento nas concentrações de estradiol 17 β seguido do aumento de LH (NAKADA et al., 2000).

2.2. Manipulação da puberdade em novilhas pré-púberes

O peso corporal é considerado um fator importante na determinação da idade a puberdade em novilhas e a nutrição cumpre um papel importante para isto. Numerosos estudos examinaram a relação entre a idade, o peso e a obtenção da puberdade em novilhas e tem se sugerido que é necessária uma interação entre esses fatores para que a puberdade ocorra. Chelikani et al. (2003) demonstrou que a condição corporal é um fator determinante para as novilhas atingirem a puberdade.

Outros fatores, como o padrão da dieta recebida pelos animais durante a pré-puberdade, ou pelo período que antecede a puberdade interferem adiantando ou atrasando o início da vida reprodutiva da fêmea bovina (BERGFELD et al., 1994;

GASSER et al., 2005). Em contrapartida foi visto que a exposição de novilhas pré-púberes ao touro por um intervalo de um ano não adiantou a puberdade quando comparada a um mesmo rebanho sem exposição ao macho (WEHRMAN et al., 1996). Existem vários tratamentos com gonadotrofinas que podem estimular a ovulação praticamente em qualquer idade em novilhas pré-púberes. Porém, estes tratamentos não tem sido exitosos para diminuir a idade a puberdade e tampouco para estimular ciclos estrais regulares, ao menos que tenham sido realizados próximos a idade esperada da primeira ovulação (WHISNANT et al., 2002).

A exposição prévia à progesterona tornou-se o método mais estudado para induzir a primeira ovulação em novilhas pré-púberes. O acetato de melengesterol (MGA) foi utilizado para induzir a puberdade, mostrando-se eficaz quando utilizado sozinho (IMWALLE et al., 1998) ou em associação com Hormônio Liberador de Gonadotrofina (PATTERSON et al., 1990; WOOD-FOLLIS et al., 2004). Apenas a exposição pelo período de oito dias à progesterona fez com que as novilhas apresentassem maior frequência nos pulsos de liberação do LH, em consequência maior crescimento folicular e um folículo pré-ovulatório de maior tamanho (IMWALLE et al., 1998).

O tratamento prévio com MGA por 7 dias associado a um análogo de GnRH com a função de induzir a ovulação manifestou alto percentual de ciclo estral de curta duração em novilhas pré-púberes. Constatou-se também que o protocolo da inseminação artificial no primeiro cio após a pré-puberdade apresenta baixos índices de prenhez (PATTERSON et al., 1990). Porém, se descartado o primeiro cio é possível obter índices de manifestação de estro e de prenhez semelhantes ao de novilhas púberes com uma nova indução de cio auxiliada por análogos do GnRH e Prostagandina $F_{2\alpha}$ (WOOD-FOLLIS et al., 2004).

Os implantes ou dispositivos de liberação de progesterona já foram utilizados em vários estudos em novas associações hormonais visando obter melhores índices de manifestação de estro, menor número de ciclos estrais de curta duração e maiores índices de prenhez (PATTERSON et al., 1990; ANDERSON et al., 1996; LUCY et al., 2001; PFEIFER et al., 2009).

A fertilização *in vivo* de oócitos de novilhas pré-púberes após a indução da ovulação e logo após a inseminação artificial é possível (SEIDEL et al., 1971), assim como a fertilização *in vitro* de oócitos após aspiração de folículos antrais (ARMSTRONG et al., 1992). Entretanto, os oócitos dessas novilhas e os embriões

que elas produzem têm uma baixa competência de desenvolvimento, sendo menos tolerantes a manipulação que os oócitos e embriões derivados de animais adultos (PRESICCE et al., 1997; GANDOLFI et al., 1998; ARMSTRONG et al., 2001).

2.3. Prostaglandina F_{2α}

As prostaglandinas desempenham papel importante na ovulação, função lutea, reconhecimento materno da gestação, implantação, manutenção da gestação e no parto. Elas têm ação nos ovários, útero, placenta e na regulação das funções da glândula pituitária nas espécies animais usadas na produção (WEEMS et al., 2006).

O ácido araquidônico é um ácido graxo essencial precursor da maioria das prostaglandinas mais intimamente associadas com a reprodução PGF_{2α} e a PGE₂. Ao contrário de outros agentes humorais, as prostaglandinas não estão localizadas em um único tecido em particular. Elas são transportadas na corrente circulatória para atuar num tecido-alvo distante do sítio de produção (HAFEZ et al., 2004).

2.3.1. Crescimento folicular e ovulação

O crescimento folicular é influenciado pela ação das prostaglandinas (PGs), pois elas aumentam a resposta da hipófise ao GnRH ocorrendo uma maior liberação de hormônio luteinizante (LH) em vaca no pós-parto (RANDEL et al., 1996). Mais recentemente, foi demonstrado que a prostaglandina pode induzir a ovulação de novilhas pré-púberes, desde que um folículo dominante esteja presente no ovário no momento de sua aplicação (PFEIFER et al., 2009). Apesar de que a indução da puberdade em novilhas associada a tratamentos com progesterona ou associado a punção folicular para induzir uma nova onda folicular já tenha sido demonstrado (PFEIFER et al., 2009), não há relato do uso somente da PG para induzir ovulação em novilhas pré-púberes. Também não se sabe a existência de ação direta das PGs no crescimento folicular sem a presença do LH.

As PGs produzidas pelo folículo ovulatório são importantes para a ovulação (MURDOCH e MCCORMICK, 1993). As células da granulosa em bovinos produzem PGF_{2α} e PGE₂ (BRIDGES e FORTUNE, 2003). A liberação de gonadodrofinas

aumenta o RNA mensageiro para dois receptores de progesterona nas células da teca e da granulosa e folículos pré-ovulatórios de bovinos (JO et al., 2002). A progesterona regula a ocitocina folicular, a síntese das enzimas de PG e dos receptores de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGE_3 (TSAI et al., 1996).

2.3.2. Luteólise

Após a ovulação, o corpus luteum (CL) desenvolve-se a partir do restante da parede do folículo ovulatório. As células da granulosa diferenciam em células luteais grandes, responsáveis pela secreção de 70% da progesterona, sendo que estas células não são estimuladas pela ação do LH. Em contrapartida, as células da teca diferenciam-se em células luteais pequenas e sob a influência do LH liberam apenas 30% da progesterona secretada pelo CL (FARIN et al., 1989; NISWENDER et al., 1994). A perda da progesterona secretada pelo CL ocorre somente após sua regressão (GINTHER et al., 1974).

Em bovinos, a luteólise primariamente inicia-se nas células luteais grandes (NISWENDER et al., 1994) aproximadamente dezesseis a dezessete dias após o estro (GUINTER et al., 1974). Observa-se aproximadamente no 18º dia após o final do estro a diminuição nos níveis de progesterona sanguínea, como consequência da atrofia das células luteais e anastomose da vascularização do CL (KOBAYASHI et al., 2001).

A $\text{PGF}_{2\alpha}$ secretada pelo endométrio é responsável pelo início da luteólise, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ que passa pelos vasos uterinos aumenta primeiramente entre 16 a 17 dias após o estro (THATCHER et al., 1995). Apenas 1mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$ aplicada via intra muscular é necessário para causar a luteólise nas éguas, porém em vacas são requeridas 25mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$ intra muscular para esta finalidade (DOUGLAS e GUNTHER et al., 1972).

A Progesterona, o Estradiol-17Beta, LH e a Ocitocina estão provavelmente envolvidos no processo de liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio (BAZER et al., 1992). A $\text{PGF}_{2\alpha}$ secretada e estimulada pela ocitocina, sendo que o estrógeno potencializa a resposta da ocitocina (SILVIA et al., 1991). Alternativamente, a progesterona pode modular a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial através da COX que pode diminuir os receptores de progesterona (FOGWELL et al., 1985). Durante a luteólise, os receptores de LH no endométrio aumentam e fazem com que o LH

liberado no final do ciclo estral estimule a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$, podendo assim potencializar a luteólise (SHEMESH et al., 2002).

3. CAPÍTULO 1

TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

Theriogenology

Induction of ovulation in heifers with $\text{PGF}_{2\alpha}$

Carlos Eduardo Porciuncula Leonardi, Luiz Francisco Machado Pfeifer, Mara
Iolanda Batistella Rubin, Jaswant Singh, Reuben Mapletoft, Gilson Antonio
Pessoa, Andreia Molardi Bainy, Carlos Antonio Mondino Silva,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

Induction of ovulation in heifers with prostaglandin F2 α

Leonardi, CEP¹; Pfeifer, LFM²; Rubin, MIB^{1}; Singh, J³; Mapletoft, R³; Pessoa, GA¹; Bairy, AM¹; Silva, CAM¹*

¹*Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Clínica de Grandes Animais, Embryolab.*

²*Brazilian Agricultural Research Corporation- Embrapa – Rondônia, Porto Velho, RO, Brazil*

³*Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada*

**Corresponding author*

Correspondence Address:

Dr. Mara I B Rubin, Departamento de Clínica de Grandes Animais Predio 97, Bloco 4,

Sala 428. Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria. 97.105-

900 Santa Maria/RS Brasil. Telefone: (55) 5532208501

E-mail: mararubin90@yahoo.com.br

26 **Abstract**

27

28 The objective of this study was to determine the effect of exogenous prostaglandin $F_{2\alpha}$
29 ($PGF_{2\alpha}$), with or without progesterone treatment, on first ovulation in prepubertal heifers. We
30 tested the hypothesis that $PGF_{2\alpha}$ has a luteolysis-independent ovulatory effect in cattle.
31 Crossbred Angus heifers (12 to 14 m old, 250 kg body weight, average body condition score
32 of 3 on 1 to 5 scale) were examined by transrectal ultrasonography on two occasions at 11
33 days interval. Heifers in which a corpus luteum was not detected at either examination were
34 considered prepubertal. Heifers were assigned then randomly to three experimental groups:
35 1) PG group (n = 14), heifers were treated with $PGF_{2\alpha}$ analog (500 μ g cloprostenol im) 5 d
36 after the emergence of a spontaneous (i.e., naturally-occurring non-induced) follicular wave;
37 2) PPG group (n = 12), heifers were given an Intravaginal progesterone-releasing insert
38 (CIDR), a follicular wave was induced with 50 mg of progesterone + 2 mg of estradiol
39 benzoate im and $PGF_{2\alpha}$ analog was given at the time of CIDR removal on Day 5 of the wave
40 (on average, 8.6 ± 0.5 days after CIDR insertion); and 3) Control group heifers were given no
41 treatment (n = 14). Animals were examined daily by ultrasonography from the start of
42 experiment till either ovulation happened, or 5 days post $PGF_{2\alpha}$ injection (PG and PPG
43 groups) or till dominant follicles of the next wave reached 8mm (Control group). The
44 percentage of heifers that ovulated within 10 days of wave emergence was higher
45 ($P < 0.0001$) in PPG (10/12; 83.3%) and PG (11/14; 78.5%) groups than in Control (1/14;
46 7.1%). Ovulations occurred 69.6 ± 6 h in PPG group and 93.8 ± 5 h in PG group after $PGF_{2\alpha}$
47 treatment, and 96 h after Day 5 of follicular wave in Control Group ($P = 0.13$). In summary,
48 $PGF_{2\alpha}$ induced ovulation in prepubertal heifers with or without the addition of exogenous
49 progesterone as a pretreatment and our hypothesis that $PGF_{2\alpha}$ can induce ovulation by a
50 luteolysis-independent mechanism was supported.

51

52 Key-words: prostaglandin $F_{2\alpha}$; follicular development; progesterone; *Bos taurus*; ovulation

53 1. Introduction

54

55 In beef cattle production systems, heifers that reach puberty early in the breeding season are
56 more likely to become pregnant in their first breeding season [1,2]. Therefore, the earlier the
57 heifers achieve puberty, the higher will be the profitability of cattle production. In that regard,
58 onset of puberty can be hastened with exogenous progestins that modulate LH pulse
59 frequency [3]. Exogenous progesterone acts by decreasing the number of hypothalamic
60 estradiol receptors, resulting in increased LH pulse frequency after cessation of progesterone
61 treatment [3,4]. In association with progesterone, most of estrus synchronization hormonal
62 treatment protocols use prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) to regress the functional corpus luteum
63 (CL) in cattle.

64 $PGF_{2\alpha}$ is a biologically potent substance that has multiple applications in the control of
65 reproduction. In cattle, the most common uses are based on its luteolytic properties, i.e.
66 estrus synchronization, regression of persistent corpora lutea, induction of abortion and
67 initiation of parturition [5]. Although prostaglandins (and their analogues) are primarily used
68 as luteolysins, they have also been reported to affect ovulation, implantation, pregnancy
69 maintenance, parturition, and postpartum physiology [6]. One possible mechanism of
70 ovulation induction by $PGF_{2\alpha}$ is by increasing pituitary responsiveness to GnRH, thereby
71 increasing LH release in postpartum cows and prepubertal heifers [7]. Further, experimental
72 evidence in cattle indicates that during the periovulatory period, intrafollicular prostaglandin is
73 essential for ovulation [8]. Although the ovulatory effect of $PGF_{2\alpha}$ associated with
74 progesterone treatment or follicular aspiration has been already demonstrated [9], no studies
75 have been published demonstrating if prostaglandin per se can induce ovulation in
76 prepubertal heifers.

77 The present investigation was designed to determine if it is possible to induce ovulation in
78 prepubertal heifers (in the absence of a functional CL) with an injection of exogenous $PGF_{2\alpha}$
79 with or without exogenous progesterone. We tested the hypothesis $PGF_{2\alpha}$ can induce

80 ovulation by a luteolysis-independent mechanism. To test our hypothesis, we designed an
81 experiment wherein we compared the ovulation rates in heifers treated with PGF_{2α} on Day 5
82 of a naturally-occurring follicular wave with those in which either no treatment was given on
83 Day 5 of the wave emergence (control) or in which progesterone treatment was given and a
84 follicular wave was induced with estradiol before giving PGF_{2α} treatment.

85

86 **2. Materials and methods**

87 The Committee for Ethics in Animal Experimentation from the Universidade Federal de Santa
88 Maria has approved all procedures performed in this experiment.

89 *2.1. Animal treatments and ultrasonographic examinations*

90 Forty prepubertal beef heifers (*Bos taurus*; Red Angus crosses) were used for this
91 experiment. The heifers were 12 to 14 mo of age, 240 to 270 Kg of body weight, and were
92 maintained at 30°08'27" S and 53°21'04" W on native pasture with free access to water and
93 mineralized salt.

94 Heifers were examined daily by transrectal ultrasonography with a Pie Medical 220 B-mode
95 scanner with a 7.5 MHz linear-array transducer (Company info) to monitor ovarian follicular
96 dynamics and to detect ovulation. At each examination, a sketch of each ovary was made,
97 and the diameter and location of all follicles > 4 mm in diameter were recorded. The day of
98 wave emergence, defined as the day when the dominant follicle of a wave was first recorded
99 (4 to 5 mm in diameter) with concurrent increase in 4mm follicles, was determined
100 retrospectively and designated as Day 0. Ovulation was defined as the disappearance of a
101 previously identified follicle > 8 mm in diameter [10]. Before the beginning of the experiment,
102 ovaries of the heifers were examined by ultrasonography on two occasions, 11 d apart, to
103 confirm that the heifers were prepubertal (i.e., absence of CL at both examinations). Only
104 heifers in which a CL was not detected at either ultrasonographic examination were included
105 in the study.

106

107 Prepubertal heifers were assigned randomly into three groups: 1) PG group (n = 14): 500 µg
108 of PGF_{2α} analog (cloprostenol; CIOSIN[®], Schering-Plough Animal Health Ind. Com Ltda,
109 Campinas, São Paulo, Brazil) im was given 5 days after the emergence of a spontaneous
110 follicular wave, i.e., animals were monitor daily by ultrasonography and treatment was given
111 on Day 5 of naturally-occurring follicular wave; 2) PPG Group (n = 12): an intravaginal
112 progesterone-releasing device (CIDR[®], 1.9 g progesterone; Pfizer Animal Health, Montreal,
113 QC, Canada) was placed in vagina, a follicular wave was induced and 500 µg cloprostenol
114 im was given at the time of CIDR removal on Day 5 of the wave; and 3) Control group (n =
115 14): no treatment was given but heifers were monitor daily by ultrasonography as in other
116 two groups. Ultrasound examinations continued till either ovulation occurred or a wave
117 emergence happened. PPG group heifers were given 50 mg progesterone (Progesterona
118 Rio de Janeiro, Laboratório Allignani Hnos SRL, Argentina) and 2 mg of estradiol benzoate
119 (Estrogin, Farmavet, São Paulo-Brasil) Im immediately after CIDR insertion to induce the
120 emergence of a follicular wave. CIDR were removed from PPG group on Day 5 of the newly
121 induced follicular wave and all heifers with a follicle > 9 mm received 500 µg of cloprostenol
122 im. Ultrasonographic examinations were conducted daily from the beginning of the
123 experiment to ovulation (all groups) or, in the absence of ovulation, up to 5 d after the
124 cloprostenol injection (PG and PPG groups), or up to the detection of a dominant follicle of
125 the subsequent follicular wave at > 8 mm in diameter (Control group). In heifers that
126 ovulated, three ultrasonographic examinations were performed (7, 10 and 14 d after
127 ovulation) to determine CL diameter and detect premature luteolysis.

128 *2.3. Statistical analyses*

129 Proportions of the dichotomus outcomes, such as ovulation (yes/no) and the presence of CL
130 at 7, 10 and 14 days after ovulation, were evaluated by chi-square analysis or by Fisher's
131 exact test (if the "expected value" was < 5). Single-point measures (e.g., maximum diameter
132 of the ovulatory follicle, growth rate of the ovulatory follicle and day of ovulation) were
133 compared among groups by one-way ANOVA. Follicle diameter data over time were

134 compared among groups and also between heifers that ovulated or did not ovulate, by the
135 MIXED procedure, using SAS 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) for repeated measures
136 to evaluate the main effects of treatment, time, and their interactions [11]. Differences among
137 groups were considered statistically significant when probability (P) value was less than or
138 equal to 0.05. When the main effects or interactions were different, a least square difference
139 test was used to determine differences among treatments or treatment effect at each time.

140

141 **3. Results**

142 The percentage of heifers that ovulated within 5 days of the treatment was higher in the two
143 groups that received PGF_{2α} than in the Control group (P < 0.001). Ovulation occurred in in
144 78.5% (11/14) in the PG group and 83.3% (10/12) of heifers in the PPG group (P > 0.05).

145 One out of 14 (7.1%) heifers ovulated in the control group 96 h after Day 5 of the wave.

146 Ovulations occurred 69.6 ± 5.9 h in PPG group and 93.82 ± 5.7 h in PG Group after
147 prostaglandin treatment (P = 0.13).

148 Ovarian follicular growth profiles are summarized in Fig.1. The duration of the growth phase
149 of the ovulatory wave (from wave emergence to ovulation) and growth rate were not different
150 among groups (P = 0.13 and P = 0.57, respectively). Considering all groups, the maximum
151 diameter of dominant follicle was larger in ovulatory heifers (12.5 ± 0.22 mm) than
152 anovulatory heifers (10.9 ± 0.35 mm; P < 0.05). No differences in the diameters of ovulatory
153 follicles were detected between PPG and PG groups. Also, there was no difference in the
154 growth rate of ovulatory follicles (1.1 ± 0.05 mm / day) and anovulatory follicles (1.0 ± 0.05
155 mm / day).

156 Only one female ovulated in the Control group, but 7 d later a CL was not present. There was
157 no difference in the percentage of heifers with a detectable CL 7 days after ovulation
158 between PPG (83.33%) and PG (78.57%) groups. At 10 and 14 days after ovulation, the
159 presence of a CL was also similar between PPG (66.7%) and PG (50.0%) groups (Fig. 2).

160

161 4. Discussion

162 The results observed in this study support our hypothesis that $\text{PGF}_{2\alpha}$ can induce ovulation by
163 a luteolysis-independent mechanism. To the best of our knowledge, this is the first report
164 providing data on $\text{PGF}_{2\alpha}$ per se in inducing ovulation in prepubertal heifers. Previous studies
165 have provided data on the effect of progesterone treatment on first ovulation of prepubertal
166 heifers [12, 13]. However, results of our earlier study documented that $\text{PGF}_{2\alpha}$ and
167 progesterone may act synergistically in inducing ovulation in prepubertal heifers [9].
168 Progesterone may have reduced the negative feedback of estradiol on the hypothalamus by
169 reducing the number of estradiol receptors [14], whereas $\text{PGF}_{2\alpha}$ may have increased the
170 responsiveness of the pituitary to GnRH [7]. Therefore, one might expect a higher ovulation
171 rate in the PPG group, due to the synergic effect of progesterone plus $\text{PGF}_{2\alpha}$ association
172 [15]. However, no difference in the proportion of heifers that ovulated whether or not
173 progesterone was added to the prostaglandin treatment protocol. Furthermore, $\text{PGF}_{2\alpha}$
174 treatment caused ovulation regardless of whether or not the follicular wave was synchronized
175 with progesterone and estradiol benzoate. These results lead us to believe that $\text{PGF}_{2\alpha}$ may
176 have potential application for induction of ovulation in fixed-time artificial insemination (FTAI)
177 programs. This alternative, if its effectiveness is proven, could replace GnRH reducing the
178 costs of FTAI protocols, particularly in countries where the use of estradiol is prohibited [27,
179 28]. This implies the need for more comprehensive studies using prostaglandin as a
180 promoter of ovulation to confirm its use in FTAI programs.

181 In anestrous cows, an increased frequency of LH release was observed 6 hours after
182 treatment with a $\text{PGF}_{2\alpha}$ analogue [7]. Apparently, $\text{PGF}_{2\alpha}$ increases pituitary responsiveness
183 to GnRH and thereby enhancing the release of LH prior to ovulation [7] in a process leading
184 up to ovulation. In contrast, in a more recent study, it was observed that $\text{PGF}_{2\alpha}$ inhibited LH
185 secretion in rat pituitary cells [16].

186 Besides the central effect described previously, prostaglandin seems to play a local role in
187 the ovary. Prostaglandin secretion by the preovulatory follicle has been shown to be closely

188 linked with the ovulatory process [17]. Prostaglandins (PGE_2 and $\text{PGF}_{2\alpha}$) are produced by
189 granulosa cells [18], acting directly on the preovulatory follicle. Considering these
190 experimental evidences ovulation caused by $\text{PGF}_{2\alpha}$ could be an associated effect of the
191 sensitizing GnRH receptors in the pituitary [7] or by a direct action of $\text{PGF}_{2\alpha}$ on the target
192 cells in preovulatory follicles. Although prostaglandin in bovine periovulatory follicles is
193 essential for ovulation, the actions of prostaglandins on bovine preovulatory follicles are still
194 being studied [8].

195 In the current study was observed that dominant follicles of the ovulatory waves were larger
196 than those of nonovulatory waves, as described elsewhere [9]. However, the increasing
197 effect of progesterone in diameter of dominant follicle and of rate of follicular growth [3, 19,
198 9], were not observed.

199 Surprisingly, the CL lifespan observed in heifers treated with prostaglandin indicates that
200 ovulation did not result in short estrous cycles, as would be expected when progesterone is
201 not used. Several authors have reported that the corpus luteum formed following the first
202 ovulation is smaller and of short lifespan than those of subsequent or physiological estrous
203 cycles [12, 20]. However, in this study, there was no difference in the lifespan of CL during
204 the three ultrasonographic evaluations (7, 10 and 14 days) after ovulation. Unfortunately it
205 was not possible to assess the length of the subsequent estrous cycle following the induction
206 of ovulation with $\text{PGF}_{2\alpha}$ analogue or if these ovulations and prevailing uterine environment
207 would lead to successful establishment of the pregnancy or not. It is known the lack of
208 exposure of the endometrium to progesterone can promote premature release of $\text{PGF}_{2\alpha}$,
209 which is thought to be caused by inadequate expression of progesterone receptors and
210 consequent unsynchronized expression of estrogen receptor- α and oxytocin receptor in the
211 endometrium [25, 26]. Although progesterone seems to be pivotal in orchestrating the
212 luteolytic cascade by regulating the expression of progesterone receptor, estrogen receptor-
213 α , and oxytocin receptor [24], our results suggest that $\text{PGF}_{2\alpha}$ per se can cause ovulation
214 without any detrimental results on CL formation. Therefore, further studies are necessary to

215 confirm whether prostaglandin-induced ovulation results in premature luteolysis in
216 prepubertal heifers.

217 In conclusion, PGF_{2α} injection caused ovulation in prepubertal heifers, without any
218 detrimental effect on the subsequent CL development. Moreover, these results have
219 demonstrated that treating heifers with prostaglandin when a dominant follicle is present in
220 the ovary can hasten the onset of puberty.

221

222

223 Acknowledgements

224 The authors thank Capes and CNPq for scholarships granted to the first two authors. The
225 authors also thank Pfizer Animal Health for CIDR inserts.

- 226 1. Yelich JV, Wettemann RP, Marston TT, Spicer LJ. Luteinizing hormone, growth
227 hormone, insulin-like growth factor-I, insulin and metabolites before puberty in heifers
228 fed to gain at two rates. *Domest Anim Endocrinol* 1996;13:325–38.
- 229 2. Leismeister JL, Burfening PJ, Blackwell RL. Date of first calving in beef cows and
230 subsequent calf production. *J Anim Sci* 1973;36:1–6.3. Anderson LH, McDowell CM,
231 Day ML. Progestin-induced puberty and secretion of luteinizing hormone in heifers.
232 *Biol Reprod* 1996; 54: 1025-31.
- 233 4. Imwalle DB, Patterson DJ, Schillo KK. Effects of melengestrol acetate on onset of
234 puberty, follicular growth, and patterns of luteinizing hormone secretion in beef
235 heifers. *Biol Reprod* 1998; 58:1432-36.
- 236 5. Gabriel HG, Wallenhorst S, Dietrich E, Holtz W. The effect of prostaglandin F_{2α}
237 administration at the time of insemination on the pregnancy rate in dairy cows. *Anim*
238 *Reprod Sci* 2011; 123: 1-4.
- 239 6. Weems CW, Weems YS, Randel RD. Prostaglandins and reproduction in female
240 farm animals. *Vet J.* 2006; 171: 206-228.
- 241 7. Randel RD, Lammoglia MA, Lewis AW, Neuendorff DA, Guthrie MJ. Exogenous
242 PGF_{2α} enhanced GnRH-induced LH release in postpartum cows. *Theriogenology.*
243 1996; 45: 643-654.
- 244 8. Fortune JE, Willis EL, Bridegs PJ, Yang CS. The periovulatory period in cattle:
245 progesterone, prostaglandins, oxytocin and ADAMTS proteases. *Anim Reprod.* 2009;
246 6: 60-71.
- 247 9. Pfeifer LFM, Siqueira LG, Mapletoft RJ, Kastelic JP. Effects of exogenous
248 progesterone and cloprostenol on ovarian follicular development and first ovulation in
249 prepubertal heifers. *Theriogenology* 2009; 72: 1054-1064.
- 250 10. Martinez MF, Kastelic JP, Bo GA, Caccia M, Mapletoft RJ. Effects of oestradiol
251 and some of its esters on gonadotrophin release and ovarion follicular dynamics in
252 CIDR-treated beef cattle. *Anim Reprod Sci* 2005;86: 37-52.
- 253 11. Littell RC, Henry PR, Ammerman CB. Statistical analysis of repeated mensures
254 data using SAS procedures. *J. Animal Sci* 1998; 76: 1216-31.
- 255 12. Patterson DJ, Corah LR, Brethour JR. Response of prepubertal *Bos taurus* and
256 *Bos indicus* x *Bos taurus* heifers to melengestrol acetate with or without
257 gonadotropin-releasing hormone. *Theriogenology* 1990; 33: 661–668.
- 258 13. Lucy MC, Billings HJ, Butler WR, Ehnis LR, Fields MJ, Kesler DJ, Kinder JE,
259 Mattos RC, Short RE, Thatcher WW, Wettemann RP, Yelich JV, Hafs HD. Efficacy of
260 an intravaginal progesterone insert and an injection of PGF 2alpha for synchronizing
261 estrus and shortening the interval to pregnancy in postpartum beef cows, peripubertal
262 beef heifers, and dairy heifers. *J. Anim Sci* 2001; 79: 982–995.

- 263 14. Day ML, Imakawa K, Garcia-Winder M, Zalesky DD, Schanbacher BD, Kittok RJ,
264 Kinder JE. Endocrine mechanisms of puberty in heifers: estradiol negative feedback
265 regulation of luteinizing hormone secretion. *Biol Reprod* 1984; 31: 332-341.
- 266 15. Madgwick S, Evans AC, Beard AP. Treating heifers with GnRH from 4 to 8 weeks
267 of age advanced growth and the age at puberty. *Theriogenology* 2005; 63:2323-
268 2333.
- 269 16. Naor Z, Jabbour HN, Nidich M, Pawson AJ, Morgan K, Battersby S, Millar MR,
270 Brown P, Millar RP. Reciprocal Cross Talk between Gonadotropin-Releasing
271 Hormone (GnRH) and Prostaglandin Receptors Regulates GnRH Receptor
272 Expression and Differential Gonadotropin Secretion. *Mol Endocrinol.* 2007; 21:524-
273 537.
- 274 17. Murdoch WJ, Hansen TR, McPherson LA. A review: role of eicosanoids in
275 vertebrate ovulation. *Prostaglandins.* 1993; 46: 85-115.
- 276 18. Bridges PJ, Fortune JE. Progesterone mediates gonadotrophin-induced secretion
277 of prostaglandins E and F2a (PGE, PGF) by follicular cells from bovine preovulatory
278 follicles. *Biol Reprod* 2003; 68 (Suppl. 1, Abstract): 47.
- 279 19. St. Clair EN, Patterson DJ, Schillo KK. Progestogen treatment stimulates follicle
280 growth without affecting LH secretion in prepubertal beef heifers. *J Anim Sci.* 1995;
281 73 (Suppl 1):222.
- 282 20. Evans ACO, Adams GP, Rawlings NC. Endocrine and ovarian follicular changes
283 leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. *J. Reprod Fertil* 1994; 100:
284 187-194.
- 285 21. Sirois J, Fortune JE. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers
286 monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod.* 1988; 39: 308-317.
- 287 22. Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF. Pattern of growth of dominant follicles
288 during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil.* 1988; 83: 663-671.
- 289 23. Rawlings NC, Evans ACO, Honaramooz A, Bartlewski PM. Antral follicle growth
290 and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. *Anim Reprod Sci*
291 2003; 78:259-270.
- 292 24. Silvia WJ, Lewis GS, Mccracken JA, Thatcher WW, Wilson jr L. Hormonal
293 regulation of uterine secretion of prostaglandin F2a during luteolysis in ruminants.
294 *Biol Reprod.* 1991; 45: 655-663.
- 295 25. Garverick HA, Zollers WG, Smith MF. Mechanisms associated with corpus luteum
296 lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. *Anim Reprod Sci.*
297 1992; 28: 111-124.
- 298 26. Zollers WG, Garverick HA, Smith MF, Moffat RJ, Salfen BE, Youngquist RS.
299 Concentrations of progesterone and oxytocin receptors in endometrium of

300 postpartum cows wxpected to have a short or normal oestrus cycle. J Reprod
301 Fertil.1993; 97: 329-337.

302 27.Commission Decision 2002/657/EC. Off J Eur Comm 2002;L221:8–36.

303 28.Council Directive 96/22/EC. Off J Eur Comm 1996;L125:3–9.

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

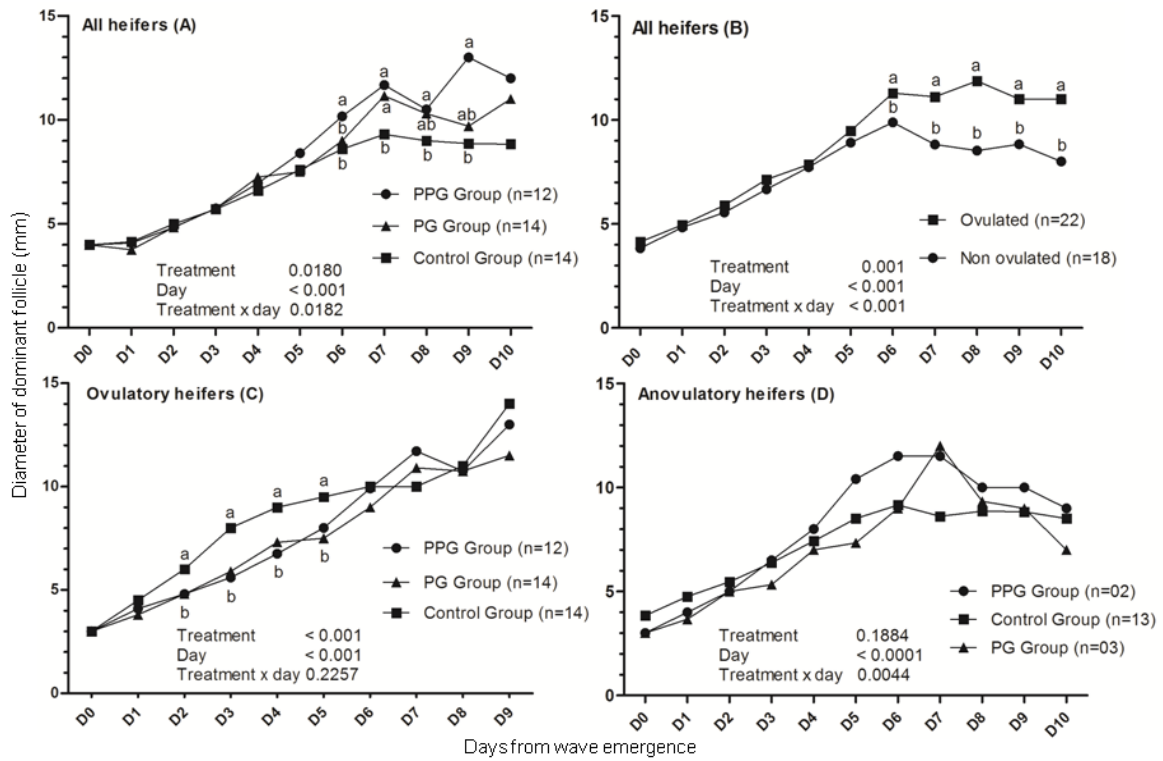
316

317

318

319

320



321

322 Fig. 1: Pattern of the dominant follicle growth in prepubertal heifers treated with PGF_{2α}
 323 with (PPG) or without (PG) prior exposure to progesterone and untreated Controls (A).
 324 Pattern of the dominant follicle growth in prepubertal heifers that ovulated following
 325 treatment (B). Pattern of development of dominant follicles of heifers that ovulated after
 326 treatment with PGF_{2α} with or without prior exposure to progesterone and untreated Control
 327 heifers (C). Comparison of pattern of dominant follicle development among groups
 328 considering only heifers that did not ovulate (D). The letters "a" and "b" refer to the days
 329 when there were differences among groups (P < 0.05).

330

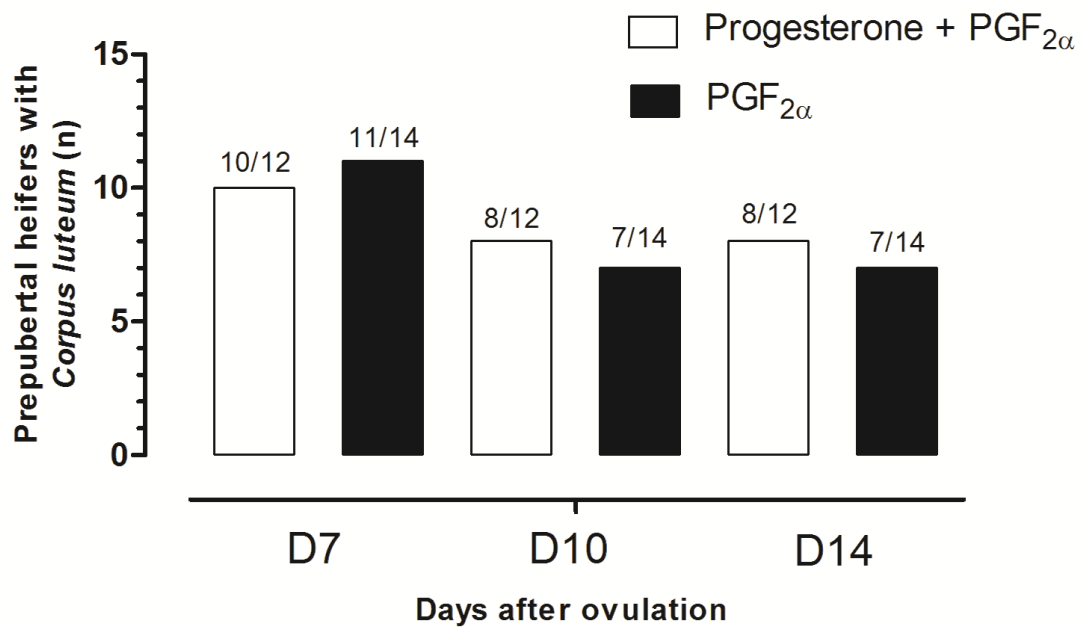
331

332

333

334

335



336

337 Fig. 2. Number of heifers with a corpus luteum detected by ultrasonography 7 (D7), 10 (D10)
338 and 14 (D14) days after ovulation in prepubertal heifers treated with CIDR + 500 µg
339 cloprostenol (PPG) or 500 µg cloprostenol (PG).

340

341

342

343

344

345

346

4- CONCLUSÕES

A Prostaglandina $F_{2\alpha}$ induz a ovulação em novilhas pré-púberes associada ou não a progesterona exógena.

A indicação para o uso comercial de um análogo da $PGF_{2\alpha}$ como indutor da ovulação não está totalmente comprovada, pois a função lútea, ou seja, a capacidade do *Corpus luteum* formado a partir da ovulação induzida pelo análogo da $PGF_{2\alpha}$ gerar um ciclo estral fisiológico de um animal púbere não pôde ser comprovada.

A proibição do uso dos estrógenos na reprodução animal em muitos países torna os análogos da $PGF_{2\alpha}$ possíveis substitutos dos estrógenos e também uma opção menos onerosa comparada ao GnRH para indução da ovulação em bovinos.

5. REFERÊNCIAS

ADAMS, G.P. ADAMS, G.P.; EVANS, A.C.; RAWLINGS, N.C. Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 100, p. 27-33, 1994.

ANDERSON, L.H.; MCDOWELL, C.M.; DAY, M.L. Progestin-induced puberty and secretion of luteinizing hormone in heifers. **Biology Reproduction** v. 54, p.1025-1031, 1996.

ARMSTRONG, D.T. Pregnancies and live birth from in vitro fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. **Theriogenology** v.38, p. 667-678, 1992.

ARMSTRONG, D.T. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. **Theriogenology** v. 55, p. 1303-1322, 2001.

BAZER, F.W.; MIRANDO, M.A.; OTT, T.L.; HARNEY, J.; DUBOIS, D.; SCHALUE, T.; PONTZER, C.; HOSTETLER, C.; JOHNSON, H.; OGLE, T. Roles of ovine trophoblastic protein-1 and estradiol-17 β /prolactin in the establishment of pregnancy in sheep and pigs. **Reproduction Fertility and Development**. v.4, p. 335–340. 1992

BERGFELD, E.G.M.; KOJIMA, F.N.; CUPP, A.S.; WEHRMAN, M.E.; PETERS, K.E.; GARCIA-WINDER, M.; KINDER, J.E. Ovarian follicular development in prepubertal heifers is influenced by level of dietary energy intake. **Biology of Reproduction** v.51, p.1051-1057, 1994.

BRIDGES, P.J.; FORTUNE, J.E. Progesterone mediates gonadotrophin-induced secretion of prostaglandins E and F_{2a} (PGE, PGF) by follicular cells from bovine preovulatory follicles. **Biology of Reproduction**. v. 68 (Suppl. 1, Abstract), p.47, 2003.

CHELIKANI, P.K.; AMBROSE J.D.; KENNELLY, J.J. Effect of dietary energy and protein density on body composition, attainment of puberty, and ovarian follicular dynamics in dairy heifers. **Theriogenology** v. 60, p. 707-725, 2003.

DAY, M.L.; IMAKAWA, K.; GARCIA-WINDER, M.; ZALESKY, D.D.; SHANBACHER, B.D.; KITTOK, R.J.; KINDER, J.E. 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.; IMAKANA, K.; ZALESKY, D.D.; KITTOK, R.J.; KINDER, J.E. 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 Animal of Science** v. 62, p. 1641-1648, 1986

DAY, M.L.; IMAKANA, K.; WOLFE, P.L.; KITTOK, R.J.; KINDER, J.E. 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.

DAY, M.L.; ANDERSON, L.H. Current concepts on the control of puberty in cattle. **Journal of Animal Science**. V.76, p. 1-15, 1998.

DOUGLAS, R.; GINTHER, O.J. Effect of prostaglandin F2a on length of diestrus in mares. **Prostaglandins**. v.2, p. 265–271. 1972

EVANS, A.C.O.; CURRIE, W.D.; RAWLING, N.C. Effects of naloxone on circulating gonadotrophin concentrations in prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 96, p. 847-855, 1992.

EVANS, A.C.O.; ADAMS, G.P.; RAWLINGS, N.C. Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 100, p. 187-194, 1994 A.

EVANS, A.C.O.; ADAMS, G.P.; RAWLINGS, N.C. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 102, p. 463-470, 1994 B.

FOGWELL, R.; COWLEY, J.; WORTMAN, J.; AMES, K.; IRELAND, J.J. Luteal function in cows following destruction of ovarian follicles at midcycle. **Theriogenology**. v.23, p.389–398. 1985.

GANDOLFI, F.; MILANESI, E.; POCAR, P.; LUCIANO, A.M.; BREVINI, T.A.L.; ACOCELLA, F.; LAURIA, A.; ARMSTRONG, D.T. Comparative analysis of calf and cow oocytes during in vitro maturation. **Molecular Reproduction and Development** v. 49, 168-175, 1998.

GASSER, L.C.; BRIDGES, G.A.; MUSSARD, M.L; GRUM, D.E.; KINDER, J.E.; DAY, M.L. Induction of precocious puberty in heifers III: Hastened reduction of estradiol negative feedback on secretion of luteinizing hormone. **Journal of Animal Science** v.84, p.2050-2056, 2006.

FARIN, C.E.; SAWYER, H.R.; NISWENDER, G.D. Analysis of cell types in the corpus luteum of the sheep. **Journal of Reproduction and Fertility** v.37 , p.181-192, 1989

GINTHER, O.J. Internal regulation of physiological processes through local venoarterial pathways: a review. **Journal of Animal Science**. v.39, p.550–564, 1974.

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

GONZALEZ-PADILLA, E.; NISWENDER, G.D.; WILTBANK, J.N. Puberty in beef heifers. II. Effect of injections of progesterone and estradiol-17beta on serum LH, FSH and ovarian activity. **Journal Animal Science**. v.40, p. 1105 - 1109, 1975.

HAFES, E.S.E.; HAFES, B. Reprodução Animal. **Ed. Manoela, São Paulo**, 7^oed., 2004.

HANARAMOOZ, A.; CHANDOLIA, R.K.; BEARD, A.P.; RAWLINGS N.C. Excitatory amino acid regulation of gonadotropin secretion in prepubertal heifer calves. **Biology of Reproduction**. v.59, p.1124-1130, 1998.

HANARAMOOZ, A.; COOK, S.J.; BEARD, A.P.; BARTLEWSKI, P.M.; RAWLINGS, N.C. Nitric oxide regulation of gonadotrophin secretion in prepubertal heifers. **Journal of Neuroendocrinology**. v.11, p.667-676, 1999.

HANARAMOOZ, A.; CHANDOLIA, R.K.; BEARD, A.P.; BARTLEWSKI, P.M.; RAWLINGS N.C., Opioidergic, dopaminergic and adrenergic regulation of LH secretion in prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.119, p.207-215, 2000

IMWALLE, D.B.; PATTERSON, D.J.; SCHILLO, K.K. Effects of melengestrol acetate on onset of puberty, follicular growth, and patterns of luteinizing hormone secretion in beef heifers. **Biology of Reproduction**. v. 58, p.1432-1436, 1998.

JO, M.; KOMAR, C.M.; FORTUNE, J.E. Gonadotropin surge induces two separate increases in messenger RNA for progesterone receptor in bovine preovulatory follicles. **Biology of Reproduction**. v.67, p. 1981–1988. 2002

KOBAYASHI, S.; BERISHA, B.; AMSELGRUBER, W.M.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Production and localization of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin F₂ alpha. **Journal of Endocrinology**. v.170, p. 369–380, 2001.

LUCY, M.C.; BILLINGS, H.J.; BUTLER, W.R.; EHNIS, L.R.; FIELDS, M.J.; KESLER, D.J.; KINDER, J.E.; MATTOS, R.C.; SHORT, R.E.; THATCHER, W.W.; WETTEMANN, R.P.; YELICH, J.V.; HAFS, H.D. Efficacy of an intravaginal progesterone insert and an injection of PGF **2alpha** for synchronizing estrus and

shortening the interval to pregnancy in postpartum beef cows, peripubertal beef heifers, and dairy heifers. **Journal of Animal Science**. v. 79, p. 982–995, 2001.

MADGWICK, S.; EVANS, A.C.; BEARD, A.P. Treating heifers with GnRH from 4 to 8 weeks of age advanced growth and the age at puberty. **Theriogenology**. v. 63, p. 2323-2333, 2005.

MOSELEY, W.N.; DUNN, T.G.; KALTENBACH, C.C.; SHORT, R.E., STAIGMILLER, R.B. Negative feedback control of luteinizing hormone secretion in prepubertal beef heifers at 60 and 200 days of age. **Journal of Animal Science** v.58, p. 145-150, 1984

MUURDOCH, W.J.; MCCORMICK, R.J. Mechanisms and physiological implications of leukocyte chemoattraction into periovulatory ovine follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 97, p.375-380, 1993

NAKADA, K.; MORIYOSHI, M.; NAKAO, T.; WATANABE, G.; TAYA, K. Changes in concentrations of plasma immunoreactive follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol-17beta, testosterone, progesterone, and inhibin in heifers from birth to puberty. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 18, p. 57-69, 2000.

NISWENDER, G.D.; JUENGEL, J.L.; MCGUIRE, W.J.; BELFIORE, C.J.; WILTBANK, M.C. Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. **Biology of Reproduction**. v. 50, p. 239–247, 1994.

PATTERSON, D.J.; CORAH, L.R.; BRETHOUR, J.R. Response of prepubertal *Bos taurus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* heifers to melengestrol acetate with or without gonadotropin-releasing hormone. **Theriogenology**. v. 33, p. 661–668, 1990.

PRESICCE, G.A. Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. **Biology of Reproduction** v. 56, p. 386-392, 1997.

PFEIFER, L.F.M.; SIQUEIRA, L.G.; MAPLETOFT, R.J.; KASTELIC, J.P. Effects of exogenous progesterone and cloprostenol on ovarian follicular development and first ovulation in prepubertal heifers. **Theriogenology**. v. 72, p. 1054-1064, 2009.

RANDEL, R.D.; LAMMOGLIA, M.A.; LEWIS, A.W.; NEUENDORFF, D.A.; GUTHRIE, M.J. Exogenous PGF₂α enhanced GnRH-induced LH release in postpartum cows. **Theriogenology**. v. 45, p. 643-654, 1996.

RAWLINGS, N.C.; EVANS, A.C.O.; HONARAMOOZ, A.; BARTLEWSKI, P.M. Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. **Animal Reproduction Science**. v. 78, p.259-270, 2003.

SAVIO, J.D.; KEENAN, L.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal Reproduction Fertility**. v. 83, p. 663-671, 1988.

SATAPRA, Von R.; GRUNERT, E.; SILVA, C.A.M. Untersuchungen über den Östrogengehalt im Kot neugeborener Kälber. **Deutsche tierärztliche wochenschrift** v.8, p179-181, 1973

SEIDEL, G.E.; LARSON, L.L.; SPILMAN, C.H.; HAHN, J.; FOOTE, R.H. Culture and transfer of calf ova. **Journal Dairy Science**. v. 54, p. 923-926, 1971.

SHEMESH, M.; MIZRACHI, D.; SHORE, L.S.; REED, J.; CHANG, S.-M.T. Expression of functional luteinizing hormone (LH) receptor and its messenger ribonucleic acid in bovine endometrium: LH augmentation of cAMP and inositol phosphate in vitro and human chorionic gonadotrophin (hCG) augmentation of peripheral prostaglandin in vivo. **Reproductive Biology**. v.1, p.13–32, 2002

SILVIA, W.J.; LEWIS, G.S.; MCCRACKEN, J.A.; THATCHER, W.W.; WILSON jr., L. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F_{2a} during luteolysis in ruminants. **Biology of Reproduction**. v.45, p.655–663. 1991.

TANEJA, M. Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. **Biology of Reproduction** v. 62, p. 206-213, 2000.

THATCHER, W.W.; MEYER, M.D.; DANET-DESNOYERS, G. Maternal recognition of pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.49 , p. 15–28, 1995.

TSAI, S.J.; WILTBANK, M.C.; BODENSTEINER, K.J. Distinct mechanisms regulate induction of messenger ribonucleic acid for prostaglandin (PG) G/H synthase-2, PGE (EP3) receptor, and PGF₂ alpha receptor in bovine preovulatory follicles. **Endocrinology**. v.137, p.3348–3355, 1996.

WEEMS, C.W.; WEEMS, Y.S.; RANDEL, R.D. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. **The Veterinary Journal**. v. 171, p. 2006.

WEHRMAN, M.E.; KOJIMA, F.N.; SANCHEZ, T.; MARISCAL, D.V.; KINDER, J.E. Incidence of precocious puberty in developing beef heifers. **Journal of Animal Science**. v.74, p.2462-2467, 1996.

WHISNANT, C.S.; BURNS, P.J. Evaluation of steroid microspheres for control of estrus in cows and induction of puberty in heifers. **Theriogenology**. v. 58; p. 1229-1235, 2002.

WOLFE, M.W., ROBERSON, M.S., STUMPF, T.T., KITTOK, R.J., KINDER, J.E. Modulation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in circulation by interactions between endogenous opioids and estradiol during the peripubertal period of heifers. **Journal of Reproduction Fertility**. v.96, p.165-174, 1992

WOOD-FOLLIS, S.L.; KOJIMA, F.J.; LUCY, M.C.; SMITH, M.F.; PATTERSON, D.J. Estrus synchronization in beef heifers with progestin-based protocols I. Differences in response based on pubertal status at the initiation of treatment **Theriogenology**. v. 62, p. 1518–1528, 2004.