

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

**EFEITO DA eCG SOBRE A DINÂMICA OVARIANA DE VACAS
MISTIÇAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES
CIRCULANTES DE PROGESTERONA DURANTE A
SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO**

PRISCILA ASSIS FERRAZ

**SALVADOR – BAHIA
AGOSTO – 2017**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS

DOUTORADO

**EFEITO DA eCG SOBRE A DINÂMICA OVARIANA DE VACAS
MISTIÇAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES
CIRCULANTES DE PROGESTERONA DURANTE A
SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO**

PRISCILA ASSIS FERRAZ

SALVADOR – BAHIA
AGOSTO – 2017

PRISCILA ASSIS FERRAZ

**EFEITO DA eCG SOBRE A DINÂMICA OVARIANA DE VACAS
MISTIÇAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES
CIRCULANTES DE PROGESTERONA DURANTE A
SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em
Ciência Animal nos Trópicos, da Universidade Federal da
Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de
Doutor em Ciência Animal nos Trópicos.

Área de concentração: Reprodução Animal

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Lisboa Ribeiro Filho

SALVADOR – BA

AGOSTO – 2017

“Reconhece a queda
E não desanima
Levanta, sacode a poeira
E dá a volta por cima”

Paulo Vanzolini

“Ó profundidade da riqueza da sabedoria e do conhecimento de Deus!
Quão insondáveis são os seus juízos e inescrutáveis os seus caminhos!
Quem conheceu a mente do Senhor?
Ou quem foi seu conselheiro?
Quem primeiro lhe deu, para que ele o recompense?
Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente.
Amém. ”

Romanos 11:33-36

AGRADECIMENTOS

À Deus por ser tudo para mim, pelo seu infinito amor e bondade, e por permitir que eu concluísse etapa da vida.

Aos meus pais, Marinalva Pinto de Assis e João Augusto do Vale Ferraz, minha irmã Michelle Assis Ferraz por todo seu amor e dedicação, a minha família, em especial minhas tias Maria José, Aidê e Janira (*in memorium*) e meus primos Vanessa, Breno, Mariana por toda a ajuda e apoio em todos os momentos da minha vida e a Maria Beatriz (minha Bia) por encantar minha vida com sua doçura e alegria.

A meu orientador, Professor Antonio de Lisboa Ribeiro Filho pelo grande aprendizado durante todos estes anos desde a iniciação científica, por ser um exemplo de paixão pela profissão e busca constante pela excelência, além das oportunidades, concedidas, confiança, paciência e incentivo que foram fundamentais para meu crescimento profissional.

Aos professores Marcos Chalhoub Coelho Lima pelos conhecimentos adquiridos, por ser um exemplo de dedicação a profissão e apoio em vários momentos desta jornada, Rodrigo Freitas Bittencourt pelos ensinamentos, amizade e cooperação em todos os projetos de pesquisa e Alberto Lopes Gusmão pelo incentivo para realização do estágio sanduiche e por participar da minha formação acadêmica.

A todos os estagiários, residentes e colegas de pós-graduação do Laboratório de Reprodução Animal (LABORA) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA que contribuíram e foram essenciais para a realização desta pesquisa, Mariana Andrade, Endrigo Adonis, Luís di Paolo, Elisiane Satelles, Bia Carôso, Eliardo Flores, João Gomes, Álvaro Alves, Fernando Cardoso, Bruno Varjão, Gabriel Menezes, Aloísio Bitencourt e Alessandro Bitencourt. Aos colegas de profissão desta jornada, Alexandra Soares Rodrigues e Marcus Vinicius Galvão por todos os anos de convivência, pelo trabalho em equipe e ajuda em vários momentos. Aos amigos formados durante este

período Carlos Henrique Calazans, Bruno Henrique, Edivânia Oliveira, Mariana Barros e Graciene Brito, vocês estarão sempre em meu coração.

Ao Professor Klibs Galvão pela grande oportunidade de realização do doutorado sanduíche na Universidade da Florida, por todos os ensinamentos, oportunidades e ajuda concedida. Aos amigos formados neste período Myriam Jimenez, Johanny Perez, Rodolpho Daetz, Judd Sims, Frederico Cunha, Anderson Veronese, Anna Luisa Belli, Diana Rojas e Sonan Ongmu e especialmente a José Roberto Lopez, aos professores e funcionários da FARMS (Deriso Hall) e toda a família do Campus Church of Christ que contribuíram para que minha estadia em Gainesville fosse a melhor possível.

As minhas queridas amigas Luane Neves, Kelly Newton, Mila Lopes e Barbara Botezelli pela amizade, incentivo e carinho ao longo destes anos.

A Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMEVZ) e a Fazenda Experimental de Entre Rios da UFBA, por ter cedido os animais, a infraestrutura e o transporte para o desenvolvimento deste trabalho, e a toda a ajuda e disponibilidade dos funcionários em especial do técnico agropecuário Nerivaldo Dias e do motorista Josivaldo Rocha.

A professora Thereza Cristina Borio dos Santos Calmon de Bittencourt pela colaboração na análise estatística do estudo.

Ao Setor de Reprodução Animal da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMEVZ) da UFBA que concedeu os equipamentos e materiais de consumo necessários para desenvolvimento da pesquisa.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da EMEVZ pelo armazenamento das amostras e ao Laboratório de Imunologia do ICS da UFBA pelas dosagens hormonais de progesterona realizadas para o experimento.

Aos professores e funcionários da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia e do Setor de Reprodução Animal da UFBA que contribuíram para execução do experimento e minha formação profissional.

A CAPES pelo auxílio financeiro concedido através da bolsa de doutorado.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para esta conquista.

Muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS

Efeito da eCG sobre a dinâmica ovariana de vacas mestiças com diferentes concentrações circulantes de progesterona durante a sincronização da ovulação

	Página
Figura 1 - Representação esquemática do protocolo de pré-sincronização da ovulação.....	45
Figura 2 - Representação esquemática do protocolo de pré-sincronização da ovulação e <i>design</i> experimental.....	46 e 47
Figura 3 - Imagens ultrassonográficas do folículo dominante: imagem A: folículo com áreas de baixa vascularização com sinais Doppler colorido, imagem B: folículo com áreas de alta vascularização com sinais Doppler colorido e imagem C: folículo com sinais Doppler colorido com área irrigada delimitada.....	49
Figura 4 - Imagens ultrassonográficas do corpo lúteo: imagem A: corpo lúteo compacto com sinais Doppler colorido, imagem B: corpo lúteo cavitário com sinais Doppler colorido e imagem C: corpo lúteo com sinais Doppler colorido com área irrigada delimitada.....	50
Figura 5 - Diâmetro do folículo dominante nos dias 8 e 10 (mm), diâmetro do folículo pré-ovulatório (mm) e concentração sérica de progesterona (ng/mL) nos dias 0, 8 e 10 do protocolo de sincronização nos diferentes grupos experimentais.....	54 e 55
Figura 6 - Momento da ovulação (h) em relação à retirada dos dispositivos intravaginais de progesterona nos diferentes grupos experimentais.....	59
Figura 7- Diâmetro e percentual da área de vascularização do corpo lúteo (mm e %) e concentração sérica de progesterona (ng/mL) no dia 24 do protocolo de sincronização nos diferentes grupos experimentais.....	63

LISTA DE TABELAS

Efeito da eCG sobre a dinâmica ovariana de vacas mestiças com diferentes concentrações circulantes de progesterona durante a sincronização da ovulação

	Página
<p>Tabela 1 - Médias e Desvios-padrão dos parâmetros de dinâmica folicular (mm e cm²), taxa de crescimento folicular (mm/d), vascularização folicular (cm² e %) e momento da ovulação (h) avaliados por ultrassonografia modo B e Doppler colorido, e as concentrações séricas de progesterona (ng/mL) nos dias 0, 8 e 10 do protocolo de sincronização nos diferentes grupos experimentais.....</p>	53
<p>Tabela 2 - Médias e Desvios-padrão dos parâmetros morfofuncionais do corpo lúteo avaliados por modo B (mm e cm²) e Doppler colorido (cm² e %) e as concentrações séricas de progesterona (ng/mL) no dia 24 do protocolo de sincronização nos diferentes grupos experimentais.....</p>	62

LISTA DE SIGLAS

%: por cento
% PVASCL: percentual de vascularização na área do corpo lúteo
% PVFOL8: percentual de vascularização na área da parede do folículo no dia oito
% PVFOL10: percentual de vascularização na área da parede do folículo no dia dez
% PVFOL: percentual de vascularização na área da parede do folículo pré-ovulatório
ACL: Área do corpo lúteo
AMH: hormônio anti-mulleriano
AMP cíclico: Monofosfato cíclico de adenosina
Ang II: Angiotensina II
ANOVA: Análise de variância
ANPT-1: Angiopoetina-1
ANPT-2: Angiopoetina-2
APFOL: Área total da parede do folículo pré-ovulatório
AFOLD8: Área total da parede do folículo dominante no dia oito
AFOLD10: Área total da parede do folículo dominante no dia dez
AVASCL: Área de vascularização do corpo lúteo
BE: Benzoato de estradiol
BPM: Proteína morfogenética óssea
CE: Cipionato de estradiol
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
CL: Corpo lúteo
CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
cm: centímetro
cm²: centímetro quadrado
D-16: Dia menos dezesseis
D-8: Dia menos oito
D0: Dia zero
D8: Dia oito
D10: Dia dez
D24: Dia vinte e quatro
DCL: Diâmetro do corpo lúteo
DFOL: Diâmetro do folículo pré-ovulatório
DFOL8: Diâmetro do folículo dominante no dia oito
DFOL10: Diâmetro do folículo dominante no dia dez
ECC: Escore de condição corporal
eCG: Gonadotrofina coriônica equina
ET-1: Endotelina - 1
FGF: Fator de crescimento fibroblástico
FGF-1: Fator de crescimento fibroblástico - 1
FGF-2: Fator de crescimento fibroblástico - 2
FSH: Hormônio folículo estimulante
GH: Hormônio do crescimento
GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofina
h: horas
HDL: Lipoproteína de alta densidade

hCG: Gonadotrofina coriônica humana
IA: Inseminação artificial
IATF: Inseminação artificial em tempo fixo
ICS: Instituto de Ciências da Saúde
IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina
i.m: intramuscular
IFN-tau: *Interferon tau*
LDL: Lipoproteína de baixa densidade
LH: Hormônio luteinizante
mg: miligramas
Mhz: megahertz
mL: mililitro
mm/dia: milímetros por dia
mm: milímetros
N: número
NO: óxido nítrico
ng/mL: nanograma por mililitro
MOV: momento da ovulação
PBR: receptor benzodiazepínico tipo periférico
P4: progesterona
P450scc: citocromo P450 clivadora da cadeia lateral de colesterol
PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas
PGF2 α : prostaglandina F2 α
P450c17 hidroxilase: citocromo P450 hidroxilase
P4D0: concentração sérica de progesterona no dia zero do protocolo de sincronização
P4D8: concentração sérica de progesterona no dia oito do protocolo de sincronização
P4D10: concentração sérica de progesterona no dia dez do protocolo de sincronização
P4DCL: concentração sérica de progesterona do corpo lúteo no dia 24 do protocolo de sincronização
PMSG: gonadotrofina do soro da égua gestante
PKA: proteína quinase A
PKC: proteína kinase C
PRF: frequência de repetição de pulsos
S: desvio-padrão
SPSS: Statistical Package for Social Science
STAR: proteína de regulação aguda da esteroidogênese
TGF β : fator de crescimento transformante- β
TXFOL: taxa de crescimento do folículo ovulatório
UI: unidades internacionais
US: ultrassonografia transretal
VASFOL: área de vascularização da parede do folículo ovulatório
VCL: volume do corpo lúteo
VEGF-1: receptor do fator de crescimento edotelial vascular - 1
VEGF-2: receptor do fator de crescimento edotelial vascular - 2
VEGF: fator de crescimento edotelial vascular
3 β -HSD: 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase

SUMÁRIO

Efeito da eCG sobre a dinâmica ovariana de vacas mestiças com diferentes concentrações circulantes de progesterona durante a sincronização da ovulação	Página
RESUMO	1
ABSTRACTS	3
INTRODUÇÃO	5
OBJETIVOS	7
HIPÓTESES	8
REVISÃO DE LITERATURA	8
Dinâmica folicular	8
Luteogênese	15
Função Luteal	20
Controle farmacológico do ciclo estral	24
Sincronizando a emergência da onda folicular	24
Terminando a fase luteínica de forma sincronizada	27
Indução e sincronização da ovulação	29
Gonadotrofina coriônica equina (eCG)	31
Uso da eCG nos protocolos de IATF	33
Ultrassonografia modo Doppler colorido em bovinos	37
Ultrassonografia modo Doppler colorido no estudo da dinâmica folicular	38
Ultrassonografia modo Doppler colorido no estudo do corpo lúteo	41
MATERIAL E MÉTODOS	43
Local e manejo dos animais	43
Protocolos de sincronização	44
Avaliações ultrassonográficas	46
Dinâmica e função folicular	47
Mensuração e vascularização do corpo lúteo	48
Coletas de sangue e dosagem hormonal	49
Delineamento experimental e análise estatística	50

RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
Dinâmica e função folicular	51
Características morfofuncionais do corpo lúteo	61
CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

Efeito da eCG sobre a dinâmica ovariana de vacas mestiças com diferentes concentrações circulantes de progesterona durante a sincronização da ovulação

RESUMO

Objetivou-se neste estudo avaliar o efeito do tratamento com gonadotrofina coriônica equina (eCG) sobre a dinâmica e função folicular, e características morfofuncionais do corpo lúteo (CL) em vacas mestiças com diferentes concentrações circulantes de progesterona (P4) durante a sincronização da ovulação em um protocolo de IATF. Foram utilizadas 30 fêmeas mestiças submetidas a um protocolo de pré-sincronização para garantir que todos os animais apresentassem corpo lúteo (CL) no início do protocolo. Em seguida, os animais foram submetidos ao protocolo de sincronização e divididos para receberem ou não 12,5mg de PGF2 α i.m. no D0 no início do protocolo, constituindo os grupos: Baixa-P4 (receberam tratamento com PGF2 α no D0) e grupo Alta-P4 (não receberam tratamento com PGF2 α no D0). No D8, realizou-se a retirada do dispositivo intravaginal de P4 e as fêmeas foram subdivididas aleatoriamente em quatro grupos para receberem a aplicação ou não de 300UI i.m. de eCG de acordo com o tratamento ou não de PGF2 α no D0: Grupo Alta P4-S/eCG (n=6), Grupo Alta P4-C/eCG (n=7), Grupo Baixa P4-S/eCG (n=6) e Grupo Baixa P4-C/eCG (n=7). As vacas foram submetidas a ultrassonografia (US) em modo B e Doppler colorido para avaliação da dinâmica e vascularização folicular e características morfofuncionais do CL. Além disso, foram coletadas amostras de sangue para determinação da concentração sérica de P4 nos dias 0; 8; 10 e 24 do protocolo de sincronização. Os dados foram analisados utilizando o procedimento ANOVA e o teste Tukey no SPSS, $P < 0,05$. Altas concentrações de P4 no momento da sincronização da ovulação impactaram negativamente no diâmetro do folículo no D10, no diâmetro do folículo pré-ovulatório e na área de vascularização da parede do folículo pré-ovulatório. Os animais que tinham uma alta concentração de P4 no momento da sincronização da ovulação e que foram tratadas com eCG apresentaram diâmetro do folículo no D10, diâmetro e a área de vascularização da parede do folículo pré-ovulatório ($P > 0,05$), semelhantes às vacas com baixa concentração de P4. Uma alta concentração de P4 no momento da sincronização da ovulação influenciou negativamente ($P = 0,03$) o diâmetro, volume e a vascularização

do CL subsequente ao protocolo. Vacas tratadas com eCG e com alta concentração circulante de P4 no momento da sincronização da ovulação apresentaram diâmetro do CL ($P>0,05$), semelhante às vacas com baixa concentração de P4. Conclui-se que elevadas concentrações circulantes de P4 na sincronização da ovulação impactaram negativamente no diâmetro e vascularização folicular e luteal, e a administração de eCG pode ser utilizada como uma estratégia para favorecer uma melhor resposta folicular e luteal em fêmeas mestiças bovinas com alta concentração de P4 no momento da sincronização da ovulação.

Palavras-chave: corpo lúteo, doppler, vaca, gonadotrofina coriônica equina, sincronização

Effect of eCG on the ovarian dynamics of crossbred cows with different circulating concentrations of progesterone during ovulation synchronization

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of equine chorionic gonadotrophin (eCG) treatment on follicular dynamics and function, and morphofunctional characteristics of the corpus luteum (CL) in crossbred cows with different circulating concentrations of progesterone (P4) during synchronization of ovulation in an IATF protocol. 30 crossbred females were used and submitted to a pre-synchronization protocol to ensure that all animals presented corpus luteum (CL) at the beginning of the protocol. Afterwards, the animals were submitted to the synchronization protocol and divided to receive or not 12.5mg of PGF2 α i.m. in the D0 at the beginning of the protocol, constituting the groups: Low-P4 (received treatment with PGF2 α) and High-P4 group (did not receive treatment with PGF2 α in D0). In D8, the intravaginal device from P4 was withdrawn and the females were subdivided randomized into four groups to receive 300UI i.m. of eCG according to the treatment or not of PGF2 α in D0: High Group-S/eCG (n = 6), High Group P4-C/eCG (n = 7); Group Low P4-S/eCG Group (n = 6) and Low Group P4-C/eCG n = 7). The cows were submitted to ultrasound (US) in B mode and color Doppler to evaluate the follicular dynamics and vascularization and morphofunctional characteristics of CL. In addition, blood samples were collected to determine serum P4 concentration on days 0; 8; 10 and 24 of the synchronization protocol. Data were analyzed using the ANOVA procedure and the Tukey test in SPSS, P <0.05. High concentrations of P4 at the time of ovulation synchronization negatively impacted the follicular dynamics and vascularization and also the morphofunctional characteristics of the CL of the subsequent diestrus (P <0.05). Animals that had a high concentration of P4 at the time of ovulation synchronization and who were treated with eCG had follicle diameter at D10, diameter and area of vascularization of the preovulatory follicle wall (P > 0.05), similar cows with low P4 concentration. In addition, cows treated with eCG and with a high circulating concentration of P4 at the time of ovulation synchronization presented CL (P > 0.05) diameter, similar to cows

with low P4 concentration. It was concluded that high circulating concentrations of P4 in the synchronization of ovulation had a negative impact on follicular and luteal diameter and vascularization, and the administration of eCG can be used as a strategy to favor a better follicular and luteal response in bovine crossbred females with high concentration of P4 at the time of ovulation treatment.

Keywords: corpus luteum, doppler, cow, equine chorionic gonadotrophin, synchronization

INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira alcançou grandes avanços ao longo dos anos com enorme ganho quantitativo e qualitativo do seu rebanho e a incorporação de biotécnicas contribuiu para que o país alcançasse posição de destaque na pecuária mundial (SARTORI, 2007; BARUSELLI et al., 2012). Neste contexto, as biotecnologias da reprodução animal desempenham papel fundamental para disseminação de genética de alta qualidade, incremento dos índices reprodutivos e melhora na eficiência reprodutiva dos rebanhos bovinos (VIANA et al., 2017; VASCONCELOS et al., 2017).

Dentre as biotecnologias mais utilizadas nacionalmente, destaca-se a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) (FERRAZ et al., 2017; BARUSELLI et al., 2017). Esta biotecnologia permite que as inseminações ocorram em horário pré-determinado, dispensando assim a necessidade de detecção do estro (MENEGETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2010a). Atualmente a IATF é uma biotecnologia bastante difundida e apresenta um nível avançado de desenvolvimento, no entanto, seus índices reprodutivos variam entre 35 a 55% e estes resultados podem ser melhorados por meio do refinamento dos protocolos de sincronização (BÓ, BARUSELLI e MAPLETOFT, 2013).

Diversos protocolos hormonais foram desenvolvidos objetivando a realização da IATF (LAMB et al., 2010; WILTBANK e PURLEY, 2014). No Brasil, os protocolos mais utilizados são a base de uma inserção de um dispositivo intravaginal de progesterona (P4) associado à administração de Benzoato de Estradiol (BE) no início do tratamento (D0), em um dia aleatório do ciclo. No momento da retirada do dispositivo intravaginal de P4 (D8), faz-se a aplicação da prostaglandina (PGF2 α) juntamente com o Cipionato de Estradiol (CE) ou a administração de Benzoato de estradiol (BE) 24 horas após, e a IATF geralmente é realizada até 56h após a remoção do dispositivo (ANDRADE et al., 2012b; RIBEIRO FILHO et al., 2013).

Tem sido reportado que as concentrações circulantes de P4 durante o protocolo de sincronização da ovulação para IATF podem impactar na fertilidade, por meio de alterações nas funções foliculares e luteais (BINELLI et al., 2014; WILTBANK et al., 2014). O tipo racial e o grau de produção de leite dos animais desempenham papel de elevada importância neste contexto (CARVALHO et al., 2008; SARTORI,

MONTEIRO e WILTBANK, 2016). Em vacas de leite de alta produção, uma baixa concentração circulante de P4 no período pré-ovulatório pode influenciar negativamente na qualidade do oócito e no desenvolvimento do embrião, afetando a morfologia e funções secretoras do útero, originando corpo lúteo (CL) de meia vida curta (WILTBANK et al., 2012; BISINOTTO et al., 2013). Por outro lado, em vacas de corte um ambiente hormonal com baixas concentrações de P4 no momento da sincronização da ovulação favorece o crescimento do folículo dominante e ovulatório, e a ovulação de folículos ovulatórios de maior diâmetro resultam em altas taxas de prenhez (DIAS et al., 2009; PERES et al., 2009; DARDAVAL et al., 2013).

O rebanho bovino leiteiro nacional é, composto por 6% de vacas de raças especializadas, que produzem em média, 4.500kg de leite/lactação, 74% de vacas mestiças com produção média de 1.100kg/lactação e 20% de vacas sem qualquer especialização, com produção média de 600kg/lactação (VILELA, 2003). Em relação aos requerimentos de P4 durante a sincronização da ovulação para protocolos de IATF, é de se esperar que vacas mestiças de média produção leiteira criadas em condições de pastagens tropicais sejam fisiologicamente mais similares a vacas de corte do que a vacas de leite de alta produção (BINELLI et al., 2014; WILTBANK et al., 2014). No entanto, ainda não estão elucidados os impactos da concentração circulante de P4 durante a sincronização da ovulação em vacas mestiças.

Algumas estratégias têm sido desenvolvidas para favorecer o desenvolvimento folicular e luteal nos protocolos de sincronização (SÁ FILHO et al., 2010b; TORTORELLA et al., 2013). Estudos demonstraram o efeito positivo da eCG em estimular o crescimento folicular e aumentar a taxa de ovulação, promovendo melhores taxas de concepção nos protocolos de IATF (RENSIS e LÓPEZ-GATIUS, 2014; SALES et al., 2016). A eCG é uma glicoproteína de meia vida longa, produzida nos cálices endometriais da égua prenhe e que se liga aos receptores de FSH e LH dos folículos e aos receptores de LH do corpo lúteo (MURPHY e MARTINUK, 1991; MURPHY, 2012). Alguns estudos indicam que o impacto positivo da eCG sobre as taxas de concepção deve-se a eficiência deste hormônio em promover um aumento na capacidade esteroidogênica do corpo lúteo (RIGOGGLIO et al., 2013) e induzir alterações em nível tecidual, celular e molecular que se relacionam com a elevação da capacidade funcional e síntese de P4 por esta estrutura (FÁTIMA et al., 2012).

Até pouco tempo, a funcionalidade do folículo e do CL eram medidas apenas pela dosagem sérica ou plasmática de esteróides (BICALHO et al., 2008; SIQUEIRA et al., 2012). Com a aplicação recente da ultrassonografia Doppler colorido, foi possível um melhor entendimento da fisiologia ovariana e avaliação da função vascular do folículo e do CL, possibilitando verificar que o fluxo sanguíneo está diretamente associado com o potencial dessas estruturas em produzir hormônios esteróides (ACOSTA et al., 2003; MATSUI e MIYAMOTO, 2009). A presença de um grande folículo e subsequentemente um corpo lúteo funcional, produzindo quantidades adequadas de estradiol e P4, respectivamente, é condição imprescindível para o estabelecimento e manutenção da gestação (MANN e LAMMING, 2001). Honmens et al. (2009) descreveram que a administração da eCG eleva o fluxo sanguíneo luteal em função da ativação da angiogênese e de moléculas vasodilatadoras em resposta a esta gonadotrofina. Neste contexto, o tratamento com eCG pode melhorar a função folicular e luteal de fêmeas bovinas submetidas a IATF e desafiadas a um ambiente hormonal com altas concentrações circulantes de P4 pré-ovulatórias. No entanto, os resultados da aplicação da eCG em protocolo de IATF para vacas mestiças com diferentes concentrações circulantes de P4 ainda são escassos.

OBJETIVOS

Objetivou-se com o presente trabalho avaliar:

- O efeito do tratamento com eCG sobre a dinâmica e vascularização folicular de vacas mestiças com diferentes concentrações circulantes de P4 durante a sincronização da ovulação em protocolos de IATF;
- A influência do tratamento com eCG sobre as características morfológicas e funcionais do corpo lúteo de vacas mestiças com diferentes concentrações circulantes de P4 durante a sincronização da ovulação em protocolos de IATF.

HIPÓTESES

Ao realizar este trabalho hipotetizou-se que:

- Animais com altas concentrações de P4, no início do protocolo de sincronização e no momento da indução da ovulação, apresentam um comprometimento no diâmetro e na vascularização folicular e luteínica;
- Animais com altas concentrações de P4, no início do protocolo de sincronização e no momento da indução da ovulação em um protocolo de IATF, apresentam atraso no momento da ovulação;
- O tratamento com eCG é capaz de compensar os efeitos negativos das altas concentrações circulantes de P4 sobre o diâmetro e função folicular e luteínica, e o momento da ovulação em protocolos de IATF.

REVISÃO DE LITERATURA

Dinâmica Folicular

O processo contínuo de crescimento e regressão dos folículos ovarianos durante o ciclo estral culminando com o desenvolvimento de um único folículo pré-ovulatório é conhecido como dinâmica folicular (LUCY et al., 1992). O desenvolvimento folicular pode ser dividido em duas grandes fases: pré-antral e antral. A formação dos folículos ovarianos ocorre ainda na vida embrionária da fêmea, ao redor de 130 dias de gestação em bovinos. Os folículos continuam seu desenvolvimento e são denominados de folículos primordiais, que se caracterizam por conter um ócito imaturo circundado por uma única camada de células da granulosa achatadas (WEBB et al., 2004).

O processo de desenvolvimento folicular inicia-se com a ativação dos folículos primordiais, esta fase é denominada de fase pré-antral. Essa ativação ocorre pelo aumento progressivo do diâmetro do oócito e com proliferação e diferenciação das

células da granulosa que de achatadas tornam-se cuboídes tendo-se início a formação da zona pelúcida e das células da teca interna com conseqüente evolução para estágio de folículo primário (BINELLI, PORTELA e MURPHY, 2009). A partir deste momento, estas células se multiplicam ocorrendo um número maior de camadas da célula da granulosa, apresentando em torno de 2 a 3 camadas, associado ao término da formação da zona pelúcida e da camada de células da teca interna rodeando o oócito e o folículo passa a ser denominado de secundário (FORTUNE, 2003). Então, cavidades intracelulares desenvolvem-se e ficam repletos de fluido, formando assim, o antro folicular, e inicia-se a formação de uma nova camada de células da teca, constituindo o estágio de folículo terciário (BRAGANÇA, 2007). A formação do antro folicular, uma cavidade central preenchida por fluido folicular e o desenvolvimento do folículo ocorrem com uma intensa proliferação das células da granulosa e da teca caracterizando o início da fase antral (FAIR, 2003).

Assim, Binelli, Portela e Murphy (2009) afirmaram que a ativação dos folículos primordiais ocorre de forma contínua ainda durante a vida fetal da fêmea e os mecanismos que controlam a ativação permanecem pouco compreendidos. Porém, esses mesmos autores citam que mecanismos parácrinos e autócrinos controlam essa ativação. Segundo Webb et al. (2004), durante o desenvolvimento inicial, os folículos primordiais crescem sob a influência de fatores de crescimento, como as ativinas, inibinas, os membros da família dos fatores de crescimento transformantes- β (TGF β), o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1), o fator de crescimento fibroblástico (FGF), a proteína morfogenética óssea (BPM), dentre outros, que são secretados pelas células que circundam o oócito.

O desenvolvimento folicular durante a fase antral é controlado por ações coordenadas por fatores endócrinos (gonadotrofinas e esteroides) e locais (IGF-1, inibina, ativina, folistatina). O hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) são as principais gonadotrofinas hipofisárias envolvidas no crescimento folicular (XU et al., 1995). Uma melhor compreensão da fisiologia reprodutiva dos bovinos, principalmente relacionada à função ovariana, foi possível a partir do advento da ultrassonografia que permitiu caracterizar o desenvolvimento folicular antral pela ocorrência de um padrão em ondas (PIERSON e GINTHER, 1984; SIROIS e FORTUNE, 1988; ADAMS et al., 1992). A partir do uso desta tecnologia foi

possível observar que o crescimento folicular antral é caracterizado pela presença de uma, duas, três e até quatro ondas de desenvolvimento por ciclo estral (SAVIO et al., 1988; GINTHER, KNOPF e KASTELIC, 1989). Esses autores relataram ainda o predomínio do padrão de duas a três ondas de desenvolvimento folicular em animais *Bos taurus taurus*. Borges et al. (2001), observaram que em novilhas mestiças há uma predominância de três ondas de desenvolvimento folicular. Figueiredo et al. (1997) verificaram que vacas *Bos taurus indicus* apresentam um padrão de 2 a 4 ondas de desenvolvimento folicular.

O crescimento folicular antral é caracterizado por cinco fases: recrutamento, seleção, desvio, dominância e atresia folicular, sendo cada uma delas controlada por mecanismos específicos (SAVIO et al., 1988; LUCY et al., 1992; SENGER, 2003). O recrutamento da onda folicular é um processo em que ocorre rápido crescimento de um grupo de pequenos folículos, cerca de 23 a 25, medindo entre 3 a 4mm de diâmetro e que é precedida pelo aumento nas concentrações plasmática de FSH (ADAMS et al., 1992; ADAMS e PIERSON, 1995). No entanto, existe uma diferença entre o número da população folicular antral entre os diferentes grupos genéticos, estudos demonstram maior número de folículos na emergência da onda folicular em *Bos taurus indicus* em comparação com animais *Bos taurus taurus* (WEBB et al. 2016). Bastos et al. (2010) detectaram diferenças significativas no número de folículos antrais entre vacas Nelore e Holstein, sendo o número de folículos presentes no ovário no momento da emergência da onda folicular foi em média de $42,7 \pm 5,9$ para as vacas Nelore (intervalo de 25 a 100) e $19,7 \pm 3,2$ para Holstein (intervalo de 5 a 40).

Resultados para a média da população folicular antral foram descritas por Carvalho et al. (2008) em que verificaram que o número de folículos recrutados em novilhas *Bos taurus taurus* foi em média de $33,4 \pm 3,2$ e para novilhas *Bos taurus indicus* foram recrutados $25,4 \pm 2,5$ folículos por onda de desenvolvimento folicular. Diferenças também entre os grupos genéticos foram verificadas por Sartori et al. (2016) em novilhas Nelore que apresentaram média para população folicular antral de $29,7 \pm 3,1$ folículos na emergência da onda, enquanto as novilhas holandesas tiveram $15,0 \pm 2,8$ folículos. As diferenças significativas na população de folículos ovarianos entre as raças *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* podem estar associadas a maiores concentrações

circulantes de insulina, IGF-I e do hormônio anti-mulleriano (AMH) em fêmeas zebuínas em comparação as taurinas.

De acordo com Fortune (1994), o recrutamento folicular é um processo cíclico e independente do estágio do ciclo estral. Para Wiltbank, Gtimen e Sartori (2002), este processo ocorre mesmo em períodos anovulatórios, como na fase pré-púbere, na gestação e no anestro pós-parto. Além disso, raça, nutrição, parição e lactação podem influenciar o número de folículos recrutados na emergência da onda folicular (PETER et al., 2009).

Diversos estudos descreveram que a emergência da primeira onda folicular ocorre no dia da ovulação, denominado D0 e a emergência da segunda onda ocorre no dia 10 para ciclos com duas ondas de desenvolvimento folicular, com duração do intervalo interovulatório (período entre duas ovulações) de 20 dias (SAVIO et al., 1988; SIROIS e FORTUNE, 1988; ADAMS et al., 2008). Ginther, Knopf e Kastelic (1989) acompanharam a dinâmica folicular de vacas com ciclos com três ondas de desenvolvimento folicular e verificaram que a emergência das ondas ocorre nos dias zero, nove e 16 do ciclo estral com média do intervalo interovulatório de 23 dias. De forma geral o intervalo médio interovulatório, tanto para os bovinos *Bos taurus taurus* quanto *Bos taurus indicus* ocorre em média 21 dias (SARTORI et al., 2001; 2016). Bó, Baruselli e Martinez (2003) estudaram o padrão de desenvolvimento folicular e observaram intervalo interovulatório de $21,9 \pm 0,5$ para *Bos taurus indicus* e de $22,2 \pm 0,5$ para *Bos taurus taurus*.

Segundo Lucy et al. (1992), após a emergência, os folículos continuam a crescer por cerca de dois a três dias. A seleção folicular determina aumento no nível de estradiol no folículo dominante em consequência a maior expressão da enzima aromatase nas células da granulosa deste folículo. ADAMS et al. (2008) relataram que este mecanismo é extremamente complexo e não se encontra totalmente elucidado, mas sabe-se que envolve a participação de hormônios gonadotróficos e gonadais, assim como, a ação de inúmeros fatores de crescimento.

Após a seleção o folículo continua seu crescimento e torna-se o folículo dominante, que consegue continuar a se desenvolver em um ambiente com baixos níveis de FSH enquanto os demais folículos subordinados tornam-se atrésicos e sofrem regressão, sendo este processo denominado de divergência ou desvio folicular

(GINTHER et al. 1996). Gimenes et al. (2005), ao trabalharem com novilhas Nelore observaram que o momento do desvio folicular ocorreu 2,5 dias após a ovulação. Resultados semelhantes foram encontrados por Sartorelli et al. (2005), quando estudaram a influência da categoria animal sobre a dinâmica folicular de fêmeas *Bos taurus indicus* e concluíram que em novilhas o desvio folicular ocorreu em média 2,8 dias após a ovulação e em vacas o desvio folicular surgiu 2,4 dias após a ovulação. Em vacas *Bos taurus taurus*, Ginther et al. (1996) observaram que o desvio folicular ocorreu 2,8 dias posteriormente a ovulação.

A divergência folicular está associada a eventos endócrinos e celulares, como o decréscimo dos níveis de FSH, aumento das concentrações circulantes de 17β -Estradiol e IGF-1, além do aumento na expressão de receptores de LH (SARTORI et al., 2001). No entanto, o mecanismo que rege a seleção folicular é complexo e não está completamente elucidado, porém sabe-se que vários fatores de crescimento estão envolvidos neste contexto e não apenas as gonadotrofinas (SARTORI e BARROS, 2011). O aumento nas concentrações de estradiol coincide com o começo do desvio folicular. De acordo com Ginther et al. (2001), o estradiol promove nas células da granulosa um aumento da atividade da enzima 450 aromatase, elevação de receptores de LH e consequente troca de dependência do FSH para o LH.

Sartori et al. (2001) verificaram que apenas após a seleção, os folículos apresentam responsividade à aplicação exógena de LH, demonstrando que a mudança na dependência de gonadotrofinas é essencial para a continuidade do crescimento folicular e aquisição de capacidade ovulatória. Estes autores descrevem que no momento do desvio folicular as fêmeas taurinas leiteiras apresentam folículo dominante com diâmetro de 8,5 e 9,1mm. Em um estudo posterior Sartori et al. (2016) relataram que o desvio folicular ocorre quando os folículos atingem diâmetro entre 7,0 a 7,4mm em vacas Nelore. Gimenes et al. (2005) verificaram que no momento do desvio folicular em novilhas Nelore, o diâmetro do folículo dominante alcançou $6,2\pm 0,2$ mm e o diâmetro do folículo subordinado foi de $5,8\pm 0,2$ mm. Esses dados foram semelhantes aos encontrados por Sartorelli et al. (2005) que avaliaram o momento do desvio folicular em fêmeas *Bos taurus indicus* e observaram que o folículo dominante alcançou em novilhas diâmetro de 5,7mm e em vacas atingiu diâmetro de 6,1mm.

A dominância folicular é estabelecida quando o folículo selecionado para ser o folículo dominante inibe o crescimento dos demais folículos e o recrutamento de uma nova onda folicular (LUCY et al., 1992; ADAMS et al., 2008). Em espécies monovulatórias, apenas um folículo é selecionado para continuar o crescimento (folículo dominante) enquanto que os outros folículos se tornam atresícos e regridem (folículos subordinados) (GINTHER et al., 1996).

Neste contexto, o folículo dominante distingue-se dos subordinados, pelo seu crescimento e tamanho como também pela sua grande capacidade de produzir estradiol e pelo aumento na concentração intrafolicular do IGF-I (MORAES et al., 2008). A medida que o folículo cresce há um aumento da expressão de receptores para o LH nas células da teca e a aquisição destes receptores nas células da granulosa, permitindo assim, que ocorra crescimento folicular mesmo na presença de baixas concentrações de FSH. A aquisição desses receptores nas células da granulosa parece ser fundamental para o estabelecimento e manutenção da dominância folicular (XU et al., 1995). De acordo com Fortune (1994) o aumento da produção de estrógeno e inibina pelo folículo dominante promove por mecanismo de feedback negativo na hipófise anterior a redução das concentrações plasmáticas de FSH e o bloqueio no crescimento dos folículos subordinados, determinando a atresia dos mesmos e o surgimento de uma nova onda de crescimento folicular.

Durante a dominância o folículo atinge altos índices de crescimento e alcança seu diâmetro máximo sendo denominado de folículo ovulatório (GINTHER et al., 1996). Segundo Ginther, Knopf e Kastelic (1989), os diâmetros máximos alcançados pelo folículo dominante em vacas *Bos taurus taurus* com duas ondas de desenvolvimento folicular foram de $17,1 \pm 0,5$ e $16,1 \pm 0,4$ mm, respectivamente. Esses autores relataram também que para ciclos com três ondas de desenvolvimento folicular os diâmetros máximos alcançados pelo folículo dominante foram de $16,0 \pm 0,4$; $12,9 \pm 0,7$ e $13,9 \pm 0,4$ mm. Em um estudo de revisão de literatura realizado por Sartori et al. (2016) sobre as diferenças fisiológicas entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, os mesmos verificaram valores máximo para o diâmetro do folículo ovulatório em vacas Holandesas entre $13,0 \pm 0,4$ e $15,4 \pm 0,4$ mm e em vacas Nelore entre $11,8 \pm 0,4$ e $13,9 \pm 0,4$ mm. Resultados semelhantes foram observados por Ribeiro Filho et al. (2013)

em vacas Nelore submetidas a um protocolo de IATF em que o diâmetro máximo alcançado foi de $13,33 \pm 2,40$ mm.

Dias et al. (2009), os quais estudaram a dinâmica folicular em novilhas Nelore submetidas a um protocolo de sincronização e verificaram diâmetro do folículo ovulatório alcançado para novilhas de $10,5 \pm 2,2$ mm. De forma semelhante Carvalho et al. (2008) verificaram que o diâmetro do folículo ovulatório em novilhas *Bos taurus indicus* foi de $11,00 \pm 0,8$ mm e para *Bos taurus taurus* foi de $12,2 \pm 0,5$ mm. Borges et al. (2001) trabalharam com novilhas mestiças *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* e observaram que o folículo ovulatório atingiu em média diâmetro de $13,3 \pm 1,4$ mm para duas ondas de desenvolvimento folicular e $11,8 \pm 1,3$ mm para três ondas de desenvolvimento folicular.

Em relação a taxa de crescimento folicular, Carvalho et al. (2008) evidenciaram que animais zebuínos apresentam índices de crescimento folicular de 0,9mm/dia, significativamente inferior aqueles apresentados por animais *Bos taurus taurus* e seus mestiços que foram de 1,1 e 1,2mm/dia, respectivamente. Em concordância a estes achados Gimenes et al. (2008) observaram taxas de crescimento folicular em vacas Nelore entre 0,8 a 1,2 mm/dia. Já Sartori et al. (2001) em vacas Holandesas, verificaram taxa de crescimento folicular de 1,2 a 1,6mm/dia.

Segundo Adams et al. (1992), após estabelecida a dominância, se os níveis de P4 estiverem altos, inibindo a pulsatilidade do LH, o folículo dominante não irá ovular sofrendo regressão e atresia, iniciando assim uma nova onda de crescimento folicular. Entretanto, quando os níveis de P4 estão baixos pela regressão luteal, há um aumento na frequência de pulsos de LH, neste momento o folículo dominante começa a fase de crescimento pré-ovulatório, resultando no aumento da capacidade de aromatização das células da granulosa e subsequente produção de maiores quantidades de estrógeno (FORTUNE, 1994). O papel do LH no folículo antral envolve a estimulação da formação de androgénos pelas células da teca e conversão de andrógenos em estrógeno pelas células da granulosa. O LH é responsável pelo retorno da meiose no oócito, ativação de enzimas para a ruptura do folículo e estimulação da esteroidogênese (WEBB et al., 2007).

Durante toda a foliculogênese os capilares não penetram a membrana basal do folículo permanecendo restrito apenas à camada das células da teca. Enquanto, que a

camada de células da granulosa permanece avascular e recebe os nutrientes, oxigênio e fatores de crescimento por meio de difusão passiva (HAZZARD e STOUFFER, 2000). O desenvolvimento folicular exige a formação de um plexo vascular ao redor de cada folículo em crescimento que é composto por arteríolas e vênulas que se formam na camada de células da teca (ROBISSON et al., 2009). Durante o desenvolvimento do folículo ovariano forma-se uma complexa rede vascular na camada de células da teca e esta é responsável pelo fornecimento de nutrientes, hormônios e oxigênio para sustentar o crescimento folicular e a esteroidogênese (ACOSTA et al., 2003).

A angiogênese durante o crescimento folicular é regulada por inúmeros fatores sintetizados e secretados pelas células da granulosa e células da teca. Os principais fatores angiogênicos envolvidos na regulação da formação do plexo vascular folicular são o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) que estimulam a proliferação e migração endotelial (FERRARA et al., 1998; ROBINSON et al., 2009). A vascularização do folículo é fundamental para a manutenção do crescimento folicular e está positivamente associada às concentrações de estradiol no fluido folicular, o aumento do fluxo sanguíneo no folículo pré-ovulatório promove uma elevação no aporte de gonadotrofinas necessárias para a ovulação (ACOSTA et al., 2005).

Segundo Sartori e Barros (2011), próximo ao momento do estro, o folículo pré-ovulatório cresce atingindo seu maior tamanho e máxima produção de estradiol. Desta forma, o estradiol é um importante regulador do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e desempenha um papel fundamental no desencadeamento do comportamento de estro (GALINA e ORIHUELA, 2007). A elevação nas concentrações de estradiol que ocorre na maturação final do folículo estimula o aumento na frequência dos pulsos de LH, desencadeando o comportamento de estro, conseqüentemente induzindo o surgimento do pico pré-ovulatório de LH e à ovulação do folículo cerca de 24 a 32h depois (GINTHER et al., 2001). A ovulação é o resultado de uma interação dinâmica entre o pico de LH e determinados fatores locais incluindo os esteroides, as prostaglandinas, peptídeos vasoativos e fatores de crescimento (FORTUNE 1994; BERISHA e SCHAMS, 2005). O pico de LH é responsável pelo processo de mudanças estruturais e bioquímicas que levam a ruptura do folículo ovulatório e a ovulação (SENGER, 2003).

Luteogênese

A presença de um folículo pré-ovulatório no ovário determina um cenário hormonal com altas concentrações plasmáticas de estradiol, sendo uma condição determinante para a ocorrência de um pico pré-ovulatório de LH e culminando com a ovulação (BERTAN et al., 2006). A ovulação caracteriza-se pela ruptura da membrana do folículo ovulatório, resultando na liberação do oócito e consequente formação do CL. Logo em seguida à ovulação, a parede do folículo ovulado é colapsada e a cavidade invadida por linfa e sangue provenientes dos capilares presentes em grande quantidade no folículo ovulatório, células da teca e da granulosa invadem a cavidade folicular, fibroblastos, células musculares lisas e células do sistema imune (REYNOLDS, KILLIEA e REDMER et al., 1992; WEBB et al., 2002). Esta estrutura formada logo após a ovulação é chamada de corpo hemorrágico (SENGER, 2003).

A luteogênese consiste no processo de formação do CL e tem seu início logo após o processo de ovulação (SMITH, MCINTUSHI e SMITH, 1994). Uma série de mudanças morfológicas, endócrinas e bioquímicas nas células da teca interna e da granulosa do folículo pré-ovulatório ocorrem até que se transforme em corpo lúteo funcional capaz de produzir grandes quantidades de P4 e este processo é conhecido como luteinização (NISWENDER et al., 1994; MILVAE, HINCKLEY e CARISON, 1996; BERISHA e SCHAMS, 2005).

O corpo lúteo caracteriza-se por uma estrutura endócrina transitória cuja a função primária consiste na síntese e liberação da P4, essencial para o estabelecimento e manutenção da gestação (SMITH et al., 1994; WEBB et al., 2002). Esta estrutura desenvolve-se 2 a 3 dias após a ovulação e este processo é acompanhado de uma intensa angiogênese, sendo responsável pelo estabelecimento de uma rede de suprimento sanguíneo para o CL (REYNOLDS e REDMER, 1998; NISWENDER et al., 2000), e um aumento da produção de P4 (FRASER e LUNN, 2001). O desenvolvimento do CL é um processo complexo, caracterizado por um intenso crescimento tecidual e proliferação celular semelhante a formação de um tumor (SENGER, 2003), caracterizado por migrações celulares para o interior do folículo, intensa proliferação e diferenciação celular, neovascularização e remodelamento tecidual (SMITH et al., 1994; NISWENDER et al., 2002; ACOSTA e MIYAMOTO, 2004). A luteinização implica

em significativa hiperplasia das células tecais, hipertrofia das células da granulosa e ainda proliferação de células fibroblásticas (NISWENDER et al., 1994).

Esta estrutura é composta por dois tipos de células esteroidogênicas (células luteais pequenas e grandes) que apresentam características morfológicas e funcionais distintas (O'SHEA et al., 1987; MILVAE, HINCKLEY e CARLSON, 1996). As células luteais pequenas são caracterizadas por medirem menos que 20 μ m, originam-se das células da teca do folículo ovulatório e respondem ao LH com aumento na secreção de P4, via ativação da proteína kinase A (PKA) (STOCCO et al., 2007). As células luteais grandes são células que apresentam entre 20 a 30 μ m, são originárias das células da granulosa do folículo ovulatório, contém receptores para PGF2 α e, aparentemente, fazem a mediação das ações luteolíticas deste hormônio, além de serem responsáveis por aproximadamente 80% da produção de P4 secretada (FIELDS e FIELDS, 1996).

O corpo lúteo possui ainda células denominadas não-esteroidogênicas que possuem um papel importante na formação, desenvolvimento e regressão luteal (NISWENDER et al., 1994). Estas células constituem 20% do volume do CL e são compostas por células endoteliais, macrófagos, células de tecido muscular liso, fibroblastos e células do sistema imune (NISWENDER et al., 2002). Estes tipos celulares interagem para promover o crescimento de novos vasos sanguíneos e o estabelecimento do suprimento de sangue necessário à manutenção do CL (SCHAMS e BERISHA, 2004). As células do CL sofrem diferenciação contínua e ocorre modificação na proporção das células luteais grandes e pequenas (HANSEL et al., 1987). As células luteínicas pequenas podem se transformar em células grandes nos estágios avançados do desenvolvimento do CL (O'SHEA et al., 1987). Além disso, ocorre uma grande divisão das células pequenas enquanto que o número das células luteais grandes permanece constante (PARKINSON et al., 1994).

O corpo lúteo é constituído por uma condensada rede vascular sanguínea incluindo vasos sanguíneos, microcapilares e grande quantidade de células endoteliais vasculares e a maioria das células esteroidogênicas estão adjacentes a um ou mais capilares (FARIN, MOELLER e SAWYER, 1986; REYNOLDS, KILLILEA E REDMER, 1992). O desenvolvimento da capacidade do corpo lúteo de produzir P4 é dependente da angiogênese que ocorre durante os primeiros dias após a ovulação (REYNOLDS, GRAZUL-BLISKA e REDMER, 2000). O CL torna-se uma das

estruturas mais vascularizadas e recebe elevado fluxo sanguíneo por unidade de tecido do corpo (MYAMOTO et al., 2005).

Na angiogênese ocorre a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos já existentes em um processo que envolve a migração e proliferação de células endoteliais de vasos pré-existentes, sendo este evento essencial para a formação e função do CL, sendo dependente de um complexo equilíbrio entre fatores estimuladores e inibidores (REYNOLDS, GRAZUL-BLISKA e REDMER, 2000; BERISHA; SCHAMS, 2005). A regulação da angiogênese é complexa e envolve a influência de diversos fatores angiogênicos como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), o fator de crescimento dos fibroblastos (FGF) e angiopoetina-1 e 2 (ANPT-1 e ANPT-2), e também fatores vasoativos como prostaglandinas (PGF2 α), endotelina-1 (EDN1) e óxido nítrico (NO) (NISWENDER, 2002; WEBB et al., 2002). Estes fatores agem diretamente na regulação da secreção de P4 ou de forma indireta na regulação do fluxo sanguíneo para o CL (MIYAMOTO, SHIRASUNA e SAAHARA, 2009).

Dentre os fatores angiogênicos descritos em ruminantes, o principal fator é o VEGF produzido pelas células endoteliais do CL (FERRARA et al., 1997). Este fator é encontrado predominantemente nas células luteínicas e os seus receptores (VEGF-1 e VEGF-2) nas células endoteliais que agem na formação de novos vasos sanguíneos (REDMER e REYNOLDS, 1996; SCHAMS e BERISHA, 2004). A concentração deste fator de crescimento é significativamente alta durante a fase lútea inicial, decrescendo durante as fases média e final do desenvolvimento do CL (BERISHA e SCHAMS, 2005).

O fator de crescimento do fibroblasto (FGF) participa do crescimento, transformação e diferenciação celular (REYNOLDS, GRAZUL-BLISKA e REDMER, 2000). De acordo com Webb, Woad e Armstrong (2002), o FGF está envolvido na participação dos mecanismos na produção de P4. Dentre vários FGF encontrados em bovinos, o fator de crescimento dos fibroblastos-2 (FGF-2) é o mais envolvido com a função luteínica, sua expressão ocorre em maiores quantidades na fase de desenvolvimento do CL e em menores quantidades na fase média, no entanto, na fase de regressão luteínica observa-se o retorno da expressão deste fator em quantidades semelhantes a inicial (BERISHA e SCHAMS, 2005). Estes dois fatores, VEGF e FGF

estimulam a angiogênese e a secreção de P4 durante a fase inicial do CL e apresentam um importante papel na regulação do desenvolvimento do mesmo.

Outros fatores estão envolvidos na regulação da luteogênese, como as angiopoetina (ANPT 1 e 2) que regulam uma variedade de processos biológicos como tônus vascular, angiogênese e crescimento celular e também estão envolvidas no desenvolvimento do CL (MIYAMOTO, SHIRASUNA e SASAHARA, 2009). A ANPT-1 é necessária para manutenção e estabilização dos vasos sanguíneos, enquanto a ANPT-2 age como um antagonista para a ANPT-1, desestabilizando os vasos sanguíneos levando as células endoteliais a sofrer ativa remodelação (SCHAMS e BERISHA, 2004).

O surgimento de novos capilares sanguíneos para apoiar o desenvolvimento das células luteais parece ser localmente potencializado pela angiotensina II (Ang II) e por fatores de crescimento que induzem a angiogênese e o suporte da síntese de P4 nas células luteais (KOBAYASHI et al., 2001). A endotelina-1 é o mais potente vasoconstritor produzido pelas células endoteliais e possui a função de estimular o VEGF e o FGF-2. O óxido nítrico (NO) é um fator vasodilatador e apresenta um papel no controle da fisiologia do ovário, sendo um mediador derivado de células endoteliais e tem como função estimular a produção de VEGF e a angiogênese. O NO está localizado nas células da teca e estão presentes em altas concentrações durante a fase luteal inicial de desenvolvimento do CL (REDMER e REYNOLDS, 1996; ROBINSON et al., 2009).

O CL quando se torna maduro entra em um período estacionário de desenvolvimento que se inicia quando a massa luteal alcança seu diâmetro máximo e caracterizada-se pela manutenção das dimensões luteais e pela elevada da secreção de P4 durante o diestro (VIANA et al., 2000; COUTINHO et al., 2007). Sartori et al (2016) estudaram a dinâmica folicular e luteal em fêmeas *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* e verificaram diferença para o diâmetro e volume do CL entre os dois grupos genéticos, as vacas *Bos taurus taurus* apresentam maior diâmetro e volume do CL (20 a 30mm; 4,0 a 14,0cm³) quando comparada com animais *Bos taurus indicus* (17 a 21mm; 2,5 a 5,0cm³). Carvalho et al. (2008) também estudaram a dinâmica folicular e observaram diferença significativa para o diâmetro do CL no dia 22 do protocolo de

sincronização entre as novilhas *Bos taurus indicus* ($15,3 \pm 0,8$ mm), *Bos taurus taurus* ($17,7 \pm 0,6$ mm) e seus mestiços ($18,4 \pm 1,0$ mm).

O corpo lúteo pode ser formado como uma estrutura compacta ou cavitária, com a presença de uma cavidade repleta de fluido (KASTELIC et al., 1990). Peres e Marin (2009) observaram a incidência de corpos luteus cavitários em 42,9 a 57,1% das vacas holandesas durante a fase de diestro do ciclo estral e a presença de uma cavidade luteal não alterou a produção de P4 do CL. De acordo com Pierson e Ginther (1988), a cavidade luteal não interfere na fisiologia luteal, na duração do ciclo estral ou no estabelecimento da gestação. Contudo, Herzog et al. (2010) estudaram as alterações no fluxo sanguíneo do CL por meio da ultrassonografia Doppler durante o ciclo estral de bovinos e verificaram que as concentrações de P4 foram mais elevadas em animais que tinham CL cavitários ($4,5 \pm 0,3$ ng/mL) do que em animais que apresentavam CL sem cavidade ($2,9 \pm 0,3$ ng/mL). De acordo com Rizzo et al. (2016) a cavidade luteal é um remanescente do *antrum* folicular e por este motivo o fluido da cavidade luteal pode apresentar composição similar ao fluido folicular.

Função luteal

Após a ovulação as células remanescentes da teca e da granulosa do folículo ovulatório, que sintetizavam estradiol, são reorganizadas para formarem o CL e sintetizarem P4 (BERTAN et al., 2006). Essa reorganização acontece com a diminuição na expressão das enzimas responsáveis pela biossíntese de estradiol em 17β -Estradiol (P450 17α -hidroxilase e P450 aromatase) e pelo aumento na expressão das enzimas necessárias para a conversão do colesterol em P4 (complexo enzimático citocromo P450 - P450_{scc} e a 3β hidroxiesteroide desidrogenase - 3β -HSD) (SMITH, MCINTUSHI e SMITH, 1994). Além disso, ocorre um aumento das proteínas transportadoras de colesterol para o interior da membrana mitocondrial (STOCCO, TELLERIA e GIBORI, 2007). O substrato para a produção de P4 pelo CL é o colesterol e este é sintetizado principalmente no fígado e transportado na forma de lipoproteínas para todos os tecidos esteroideogênicos, como o córtex da adrenal, folículos ovarianos e o corpo lúteo (SALLES e ARAÚJO, 2010). As lipoproteínas de alta densidade (HDL) e baixa

densidade (LDL) são as fontes mais comuns de colesterol disponíveis para a síntese de P4 pelo CL (NISWENDER et al., 2002).

A síntese dos esteroides é dependente do transporte do colesterol para dentro da membrana da mitocôndria e este processo ocorre de duas formas: uma forma pode ser pelo processo de captura do LDL pelas células luteias chamado de endocitose, onde esse é englobado pela membrana formando uma estrutura denominada de endossomo, que se localiza no citoplasma da célula e liga-se ao lisossomo e promove uma dissociação do LDL disponibilizando o colesterol a célula (NISWENDER et al., 2000). Já o HDL encontra-se conjugado a proteínas plasmáticas, e este complexo se liga a membrana celular e promove o transporte do HDL para dentro da célula, sendo o colesterol disponibilizado no citosol para ser utilizado na esteroidogênese. O transporte de colesterol do citosol para a membrana mitocondrial interna é o mecanismo chave para a regulação da secreção de P4 (NISWENDER, 2002).

Outra via de disponibilidade do colesterol para a biossíntese de P4 é pela conversão de colesterol éster em colesterol e ácidos graxos, por ação da enzima colesterol esterase. Este processo ocorre pela ligação do LH a receptores específicos nas pequenas células luteais, sendo este hormônio o principal estimulador da produção de P4 (NISWENDER et al., 1994). Quintal-Franco et al. (1999) evidenciaram que a liberação de LH 48h antes do surgimento pré-ovulatório é importante para o desenvolvimento do CL em vacas. O mecanismo pelo qual o LH induz a secreção de P4 envolve a formação da monofosfato cíclico de adenosina (AMP cíclico), PKA e subsequente aumento da produção de P4. Esta ativação estimula a conversão do colesterol éster em colesterol e ácidos graxos, evento que contribui para maior disponibilidade do colesterol no citoplasma e transporte para a membrana mitocondrial interna (NISWENDER, 2002).

Um importante hormônio relacionado em promover o desenvolvimento e função do CL é o hormônio do crescimento (GH) (QUINTAL-FRANCO et al., 1999). Os receptores para o GH estão presentes principalmente nas células luteais grandes, sendo este hormônio considerado um importante fator endócrino estimulador da secreção de P4 e de ocitocina pelo corpo lúteo (SCHAMS e BERISHA, 2004). O GH estimula proteínas quinase que aumentam a expressão gênica das proteínas de transporte do colesterol para o interior da membrana mitocondrial, como a enzima citocromo

P450scc. Além disso, o GH estimula indiretamente o aumento da expressão do IGF-1 no corpo lúteo este processo estimula a secreção da P4 (NISWENDER et al., 2000). O IGF-1 apresenta concentração alta durante a fase luteal inicial mas diminui durante a fase luteal mediana e tardia (FRASER e LUNN, 2001).

Desta forma, seguindo o processo de produção de P4, o colesterol precisa ser transportado do citosol para a membrana mitocondrial por proteínas específicas, como a proteína de regulação aguda da esteroidogênese (STAR), o receptor benzodiazepínico tipo periférico (PBR) e a endozepina, uma ligante natural do PBR (NISWENDER, 2002). Dentre estas proteínas a STAR é o principal elemento transportador de colesterol e este transporte é dependente da fosforilação desta proteína (SALLES e ARAÚJO, 2010) e possui dois sítios de fosforilação, um fosforilado pela PKA e outro pela proteína kinase C (PKC). A ativação da PKA é estimulada pelo LH, o que promove aumento no transporte de colesterol e na esteroidogênese, no entanto, a ativação da PKC apresenta uma ação contrária que resulta na redução do transporte de colesterol e diminuição da secreção de P4. Esta proteína promove a ligação do colesterol no citoplasma e o transporta para a membrana mitocondrial externa, realizando a transferência da molécula de colesterol ao receptor PBR, que o transporta para a membrana mitocondrial interna. A endozepina age mudando a conformação do PBR e capacitando-o para o transporte do colesterol. Na membrana mitocondrial interna o colesterol interage com a enzima citocromo P450scc transformando-o em pregnolona, esta é transportada para o retículo endoplasmático liso e por ação da enzima 3β -HSD é convertida em P4 (NISWENDER, 2002).

De acordo com Borges et al. (2003), a concentração plasmática de P4 apresenta variação cíclica durante o ciclo estral e refletem a funcionalidade do CL entre a fase de crescimento, manutenção e regressão. Durante a fase de crescimento luteal, o CL aumenta em tamanho e em capacidade de secretar progesterona, alcançando o seu máximo diâmetro no dia 10 do ciclo estral (NISWENDER et al., 2000). No entanto, a máxima concentração de P4 foi detectada entre os dias 12 e 14 indicando que o desenvolvimento morfológico do CL ocorre antes da sua maturação funcional (SIQUEIRA et al., 2009; SOUZA et al., 2009). Hergoz et al. (2010) avaliaram a dinâmica e função luteal por ultrassonografia transretal em vacas holandesas durante o ciclo estral e também verificaram que a concentração de P4 aumenta durante as fases de

crescimento do CL, no dia 5 do ciclo estral apresentando concentração de $2,1\pm 0,4\text{ng/mL}$ e na fase estática entre os dias 8 e 14 apresentando concentrações de $4,2\pm 0,4\text{ng/mL}$ e $7,3\pm 0,9\text{ng/mL}$, respectivamente. Além disso, observaram que durante a fase de crescimento houve um aumento no diâmetro luteal de 2,1 a $4,5\text{cm}^2$ e durante a fase estática o diâmetro do CL estabilizou-se em torno de $5,4\text{cm}^2$.

Mann (2009) estudaram a correlação entre o tamanho do CL e a concentração de P4 durante a fase luteal em vacas holandesas e verificaram que entre os dias 5 e 8 ocorre um aumento no tamanho do CL e nos dias 8 a 16 não ocorre diferença no tamanho do CL, no entanto, as concentrações de P4 continuam a aumentar em ambos os intervalos do dia 5 ($2,01\pm 0,21\text{ng/mL}$), dia 8 ($5,82\pm 0,39\text{ng/mL}$) e dia 16 ($7,36\pm 0,30\text{ng/mL}$) do ciclo estral. Resultados semelhantes foram confirmados por Keynon et al. (2012) que estudaram a resposta ovariana de vacas holandesas durante o ciclo estral e encontraram concentrações de P4 para o dia 0, 7 e 14 do ciclo estral de $0,6\text{ng/mL}$, $2,4\pm 0,2\text{ng/mL}$ e $5,3\pm 0,2\text{ng/mL}$, respectivamente. Carvalho et al. (2008) avaliaram a dinâmica folicular e luteal em diferentes grupos genéticos submetidos a um protocolo de sincronização e observaram concentrações de P4 no dia 22 do ciclo estral em *Bos indicus*, *Bos taurus* e *Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus* de $3,8\pm 1,0\text{ng/mL}$, $4,9\pm 1,0\text{ng/mL}$ e $4,6\pm 1,0\text{ng/mL}$, respectivamente.

O desenvolvimento luteal e a capacidade do CL em produzir P4 é acompanhado por uma extensiva angiogênese (ACOSTA e MYAMOTO, 2004). O crescimento de novos vasos é essencial para a formação e funcionamento do CL pois permite que as células produtoras deste hormônio obtenham oxigênio, nutrientes e precursores hormonais que são indispensáveis para a manutenção da secreção de P4 (NISWENDER et al., 1994; WEBB et al., 2002). A progesterona é requerida para a manutenção da gestação e sua concentração durante a prenhez afeta o desenvolvimento do embrião e a sua sobrevivência (LONERGAN, O'HARA e FORDE, 2013), além de ser essencial para o crescimento do concepto, implantação e manutenção da gestação, a P4 desempenha também um papel importante na regulação das secreções endometriais que estimulam e direcionam as mudanças no desenvolvimento e na diferenciação do concepto durante o início da gestação em ruminantes (WILTBANK et al., 2014). Além disso, a P4 é um hormônio chave para a gestação devido ao seu papel em ligar-se ao seu receptor no epitélio uterino e no embrião, promovendo um aumento da capacidade das

glândulas uterinas para secretar histotrófos melhorando a nutrição do embrião e permite aumentar a produção de *interferon-tau* (IFN-tau), que é o principal sinal liberado pelo embrião para o reconhecimento materno da gestação (MANN e LAMMING, 2001; LONERGAN, 2011).

As concentrações de P4 durante o diestro foram verificadas por Gómez-Seco et al. (2017) observaram que em vacas holandesas gestante a concentração de P4 alcançou valores de $9,8 \pm 1,2 \text{ ng/mL}$ e em vacas não gestantes de $6,2 \pm 0,7 \text{ ng/mL}$ no dia 14 do ciclo estral. Além disso, os mesmos verificaram diferença significativa nas concentrações de P4 no dia 22 para fêmeas gestantes e não gestantes sendo de $8,2 \pm 1,1 \text{ ng/mL}$ e $3,2 \pm 0,8 \text{ ng/mL}$, respectivamente. Em um estudo realizado por Rodrigues et al. (2016b) sobre as características morfofuncionais do CL de fêmeas mestiças leiteiras avaliadas por ultrassonografia Doppler verificaram que a concentração de P4 nas fêmeas gestantes foi de $11,04 \pm 4,32 \text{ ng/mL}$ significativamente superior aos animais não gestantes, os quais apresentaram $5,19 \pm 5,70 \text{ ng/mL}$. Arêas et al. (2012) não observaram diferença significativa para concentração de P4 ao longo do ciclo estral entre animais gestantes e não gestantes no dia 12 ($5,44 \pm 0,26$ x $5,45 \pm 0,34 \text{ ng/mL}$) e dia 14 ($6,73 \pm 0,24$ e $6,49 \pm 0,35 \text{ ng/mL}$), no entanto verificaram diferença no dia 20 após a IATF em animais gestantes e não gestantes de $5,77 \pm 0,28 \text{ ng/mL}$ e $2,48 \pm 0,42 \text{ ng/mL}$, respectivamente.

Controle farmacológico do ciclo estral

O melhor entendimento da dinâmica folicular ovariana permitiu o desenvolvimento de diversos protocolos hormonais capazes de controlar induzir e/ou sincronizar o estro e a ovulação, possibilitando assim, a utilização da IATF como ferramenta de melhoramento genético, eficiência reprodutiva e produtividade dos rebanhos bovinos (BARROS e ENERO, 2004). Segundo Ribeiro Filho (2001), os protocolos de sincronização para realização da IATF apresentam como finalidade proporcionar uma fase luteínica em todos os animais, ajustar a emergência de uma nova onda de crescimento folicular, terminar a fase luteínica de forma sincronizada, e sincronizar a ovulação.

Sincronizando a emergência da onda folicular

Os métodos empregados para a sincronização da onda de desenvolvimento folicular objetivam induzir a ovulação ou luteinização do folículo dominante com a utilização de fármacos como o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e a gonadotrofina coriônica humana (hCG) ou causar atresia dos folículos presentes no momento do tratamento por meio de associações de P4 e estrógenos (MACMILLAN e THATCHER, 1991b; RAJAMAHENDRAN e SIANANGAMA, 1992; BÓ et al., 1994). Segundo Buratini et al. (2000), a emergência da onda folicular também pode ser induzida por processos mecânicos conseguidos pela remoção do efeito do folículo dominante. Esses autores utilizaram a aspiração folicular guiada por ultrassonografia do folículo dominante como método de sincronização da onda folicular, realizada cinco dias após a ovulação em novilhas Nelore e verificaram a emergência de uma nova onda folicular $1,9 \pm 0,1$ dias após o tratamento. No entanto Bó, Baruselli e Martinez (2003) afirmaram que apesar deste método ser eficiente na sincronização da emergência da onda folicular é de difícil aplicabilidade em rebanhos bovinos.

Diversas pesquisas foram conduzidas objetivando desenvolver protocolos que empregassem GnRH e PGF2 α na sincronização da emergência folicular (PURSLEY, MEE e WILTBANK, 1995; TWAGIRAMUNGU, GUILBAULT e DUFFOUR, 1995). O primeiro protocolo que realmente possibilitou o uso da IATF e eliminou a necessidade de detecção do estro com satisfatórias taxas de prenhez foi o protocolo Ovsynch, que consiste na administração de GnRH seguido sete dias após a aplicação de PGF2 α , além disso uma segunda aplicação de GnRH é realizada 48h após ao tratamento com PGF2 α e 16h após realiza-se a IA (PURSLEY, MEE e WILTBANK, 1995). Twagiramungu, Guilbault e Dufour (1995) demonstraram que o GnRH induz o pico de LH resultando na ovulação do folículo dominante presente no momento do tratamento e a emergência de uma nova onda em aproximadamente dois dias.

Pursley, Mee e Wiltbank (1995) utilizaram o protocolo Ovsynch para sincronização da emergência da onda folicular em vacas leiteiras e observaram que o intervalo entre a primeira aplicação do GnRH e a emergência da nova onda ocorreu em média de $2,1 \pm 0,31$ dias. Posteriormente, Barros et al. (2000) sincronizando vacas *Bos taurus indicus* com diferentes protocolos verificaram que, quando utilizaram o

protocolo Ovsynch, a emergência da onda foi observada $1,79 \pm 0,34$ dias após a aplicação do GnRH. Martinez et al. (1999) avaliaram a dinâmica folicular em novilhas tratadas com GnRH nos dias três, seis e nove da primeira onda folicular, sendo o dia zero (D0), o dia da ovulação e observaram que o intervalo entre a administração do GnRH e a emergência de uma nova onda ocorreu em média $2,8 \pm 1,4$, $2,1 \pm 0,6$ e $0,9 \pm 1,3$ dias após o tratamento com GnRH nos dias três, seis e nove após a ovulação, respectivamente. Contudo, a emergência somente foi induzida quando ocorreu ovulação em resposta ao tratamento.

De acordo com Cavalieri et al. (2006), o estágio do desenvolvimento do folículo dominante é um fator importante que afeta a probabilidade de ovulação em resposta ao tratamento com GnRH, sendo mais frequente ocorrer a ovulação quando o folículo está em fase final de crescimento ou na fase estática de desenvolvimento. Outro ponto relatado por esses autores é que o GnRH parece ser mais eficiente em induzir a ovulação em vacas do que em novilhas. A ciclicidade constitui fator primordial para resposta à ação do GnRH na sincronização da onda folicular (AMBROSE et al., 2005). Fernandes et al. (2001) observaram que a probabilidade de ovulação com a administração de GnRH em vacas em anestro é menor do que em vacas ciclando.

A associação de progestágenos com estrógenos tem sido amplamente utilizada nos últimos anos em programas de sincronização do estro e ovulação em bovinos de corte e de leite (MACMILLAN e BURKE, 1996; BARUSELLI et al., 2004a; WILTBANK e PURSLEY, 2014). De acordo com Baruselli et al. (2008), os protocolos a base de P4 mostraram-se mais eficientes em vacas de corte lactantes em regiões de clima tropical, devido a um alto percentual de anestro desses animais, o que interfere negativamente na resposta ao protocolo Ovsynch.

Os protocolos de sincronização com progesterona e estradiol induz a atresia folicular seguida da emergência de uma nova onda (BÓ, BARUSELLI e MARTÍNEZ, 2003; BARUSELLI et al., 2004). As fontes exógenas de P4 utilizadas nos protocolos de sincronização são os tratamentos por via oral como o acetato de melengestrol, a inserção de dispositivo intravaginal de P4 ou implantes auriculares de progestágenos (ODDE et al., 1990). Nos protocolos a base de progesterona e estradiol, o papel do estradiol é inibir a liberação de FSH e o desenvolvimento de pequenos folículos os quais entram em regressão, enquanto, a progesterona exógena controla o desenvolvimento dos

folículos maiores, por meio da supressão ao aumento da frequência de liberação de LH, levando a atresia folicular (BÓ et al., 1995).

Segundo Bó et al. (1994), a associação de estrógenos (17β -estradiol) aos tratamentos com P4 induz a atresia do folículo dominante e provoca a emergência de uma nova onda de crescimento folicular em média $4,3\pm 0,3$ dias após a sua aplicação e independente do estágio do folículo dominante no momento em que o tratamento foi iniciado. Sendo assim, Martinez et al. (2005) afirmaram que o intervalo entre a aplicação do estrógeno e o recrutamento da nova onda dependem da dose administrada e da natureza do estrógeno.

Thundathil, Kastelic e Mapletoft (1997) trabalharam com vacas holandesas sincronizadas com dispositivo de P4 e 1mg de cipionato de estradiol (CE) e demonstraram uma menor sincronização da emergência da onda folicular com uso deste fármaco em comparação ao 5mg de 17β -Estradiol. Esses achados concordam com Colazo, Kastelic e Mapletoft (2003), que compararam duas fontes de estrógenos e verificaram que a administração de 1mg de CE em novilhas de corte resultou em uma emergência da onda folicular menos precisa do que o 5mg de 17β -Estradiol ($4,1\pm 0,4$ vs $3,3\pm 0,1$ dias). Para esses autores, a elevada concentração de estradiol em novilhas que receberam CE pode suprimir a liberação endógena de FSH por um longo período comparado com os animais que receberam 17β -Estradiol, levando assim a um atraso na emergência da onda folicular.

Caccia e Bó (1998) estudaram o efeito da administração de 5 ou 2,5mg de BE no momento da inserção do implante de P4 em um estágio aleatório do ciclo estral. Esses autores observaram a emergência de uma nova onda folicular quatro dias após o tratamento. Já quando foi administrado 5mg de valerato de estradiol (VE), a emergência da onda ocorreu em $5,7\pm 0,2$ dias depois da administração. Este fármaco, por apresentar meia vida longa em comparação ao estradiol 17β , possui um efeito prolongado sobre a supressão do FSH, levando um atraso na emergência da nova onda e observaram também que as fêmeas submetidas ao tratamento com 5mg de valerato de estradiol tem um comprometimento na qualidade embrionária (COLAZO et al. (2005).

Desta forma, a associação de BE com o dispositivo intravaginal de P4 tem se mostrado um método mais eficaz para sincronização da onda folicular em um momento aleatório do ciclo estral (BÓ, BARUSELLI E MARTINEZ, 2003; VASCONCELOS et

al., 2011). Este tratamento proporciona a emergência de uma nova onda folicular em média três a quatro dias após a aplicação (CARVALHO et al., 2008).

Terminando a fase luteínica de forma sincronizada

A prostaglandina é um ácido graxo, composto por 20 átomos de carbono, um anel ciclopentano e duas cadeias laterais (GONZÁLEZ, 2002). A PGF₂ α tem sido o tratamento mais empregado para sincronização do estro em bovinos (BARUSELLI et al., 2012; BÓ, BARUSELLI e MAPLETOFT, 2013). A PGF₂ α é o hormônio luteolítico responsável pela regressão do CL nos ruminantes e é produzido pelo endométrio durante todo o ciclo estral, porém sua concentração máxima é atingida no momento da luteólise. Além disso, são sintetizadas em inúmeras células e liberadas somente quando requisitadas, não sendo armazenadas e possuem uma meia-vida biológica muito curta (MORAES et al., 2008).

A partir da descoberta dos efeitos luteolíticos da PGF₂ α , vários análogos sintéticos foram comercializados e amplamente utilizados para controlar o ciclo estral em bovinos (ODDE, 1990). Wiltbank (2000) descreveu três limitações para o emprego somente da PGF₂ α em programas de sincronização do estro. A primeira limitação é a não resposta ao tratamento hormonal do corpo lúteo em estágio inicial de desenvolvimento do CL, para esses autores essa limitação pode ser contornada com a aplicação de duas doses de prostaglandina em intervalo entre as aplicações de 10 a 14 dias, a segunda limitação, é que a PGF₂ α não induz estro em vacas em anestro e a terceira limitação, é que há uma grande variabilidade no período de manifestação do estro nas fêmeas após o tratamento. Os análogos sintéticos e semi-sintéticos da prostaglandina, entre eles o Cloprostenol e o Dinoprost, são mais potentes do que a sua molécula natural (FERNANDES e FIGUEIREDO, 2007; WILTBANK et al., 2014). Em estágios precoces do ciclo estral, a PGF₂ α e seus análogos são ineficientes em causar a luteólise induzindo a regressão do CL somente a partir do quinto dia, devido a aplicação do luteolítico neste período coincidir com o período de desenvolvimento do CL, que não é totalmente responsivo a ação da PGF₂ α neste momento (LUCY, MCDUGALL e NATION, 2004; MAPLETOFT, BÓ e BARUSELLI, 2009).

Kastelic et al. (1990) afirmaram que o intervalo do tratamento com PGF2 α e a manifestação do estro depende do estágio de desenvolvimento do folículo dominante no momento da aplicação. Esses autores observaram que, quando o folículo dominante está em fase final de crescimento ou no início da fase estática, a ovulação ocorrerá em três a quatro dias. Entretanto, quando o tratamento é realizado no momento em que o folículo dominante encontra-se no início da fase de crescimento, este ainda deverá desenvolver-se até atingir um estágio pré-ovulatório e consequente ovulação, o que ocorrerá após cinco a sete dias. Borges et al. (2003) administraram PGF2 α e monitoraram a manifestação do estro após a aplicação do luteolítico em vacas da raça Nelore e Gir. Esses autores observaram que o intervalo entre a aplicação da PGF2 α e a detecção do estro foi bastante variável, apresentaram média de 88,7 \pm 26,1h e 91,6 \pm 28,0h para a raça Nelore e Gir, respectivamente, e o intervalo médio entre a aplicação da PGF2 α e o momento da ovulação foi de 113,1 \pm 30,2h para a raça Gir e 119,5 \pm 31,9h para a raça Nelore.

Cavalieri et al. (1997), em um trabalho com novilhas *Bos taurus indicus*, estudaram diferentes protocolos de sincronização do estro e da ovulação e o efeito de duas aplicações de prostaglandina com intervalo de 14 dias entre as aplicações. Os autores observaram um amplo intervalo entre a aplicação do hormônio e o estro com média de 72,0h; variando entre 41,2 a 155,6h; sugerindo que o tratamento com PGF2 α sincroniza a luteólise, mas não o estágio de desenvolvimento do folículo dominante. Desta forma, a ação luteolítica da prostaglandina junto com a associação com outros fármacos constitui uma terapia hormonal de sucesso empregada pela maioria dos programas de IATF (BARUSELLI et al., 2012).

Indução e sincronização da ovulação

A indução da ovulação pode ser conseguida utilizando hormônios como o hCG ou LH, que agem diretamente nos folículos ou por meio da aplicação de hormônios que induzam o surgimento do pico pré-ovulatório de LH, como o GnRH, os estrógenos e seus ésteres (MENEGHETTI et al., 2009). Entretanto, o intervalo entre a aplicação e a ovulação pode variar para cada tipo de hormônio e a eficiência dos indutores da

ovulação está condicionada a presença de um folículo pré-ovulatório no momento do tratamento (CAVALIERI et al., 2006).

Para o emprego da IATF é muito importante conhecer o momento da ovulação e os programas que utilizam o GnRH como indutor da ovulação sincronizada possuem como finalidade induzir uma onda de LH e conseqüente ovulação (TWAGIRAMUNGU, GUILBAULT e DUFOUR, 1995). Desta forma, Pursley, Mee e Wiltbank (1995), que utilizaram o protocolo Ovsynch e aplicaram o GnRH 48h após a administração de PGF2 α observaram que a ovulação ocorreu entre 24 a 32h depois da aplicação do hormônio. Resultados semelhantes foram obtidos por Fernandes et al. (2001) que utilizaram o protocolo Ovsynch com vacas Nelore e verificaram a ovulação ocorrendo em média 32,8 \pm 1,6h depois do tratamento com GnRH. Da mesma forma, Bodensteiner et al. (1996), ao utilizarem novilhas leiteiras em um protocolo semelhante observaram que o intervalo entre a aplicação do hormônio e a ovulação ocorreu em média 32h.

Uma variação deste protocolo foi descrita por Torres-Junior et al. (2007), que avaliaram a dinâmica folicular em vacas Nelore sincronizadas com implante auricular de Norgestomet e uma aplicação de BE no começo do protocolo. Esses autores administraram o GnRH 48 ou 54h após a retirada do implante e observaram o intervalo médio entre a administração do GnRH e a ovulação de 24,3 \pm 2,27h para GnRH 48h após a retirada do implante e 16,5 \pm 2,20h para GnRH 54h após a retirada do dispositivo de P4.

Vários estudos investigaram o efeito da administração dos estrógenos e seus ésteres como indutores da ovulação em protocolos a base de P4 em substituição ao tratamento com GnRH. Sendo atualmente esta associação um dos tratamentos mais utilizados para sincronização do estro e da ovulação em fêmeas bovinas (MACMILLAN e BURKE, 1996; BARROS et al., 2000; MARTINEZ et al., 2002). Os protocolos de sincronização a base de P4 e estradiol para a indução da ovulação consistem na utilização de uma fonte de estrógeno no momento da retirada do dispositivo de P4 ou 24h após (BÓ et al., 1995; AYRES et al., 2006).

Martínez et al. (2005) trabalharam com vacas de corte e aplicaram 1mg de 17 β -Estradiol ou de BE 24h após a retirada do dispositivo e observaram que o intervalo entre a retirada do dispositivo de P4 a a ovulação ocorreu em média 75,8 \pm 3,0 e 77,3 \pm 1,9h

para os animais que receberam 17β -Estradiol e BE, respectivamente, e ambos os fármacos foram eficientes em induzir a ovulação. No entanto, Hanlon et al. (1997) sincronizaram novilhas leiteiras com um protocolo a base de P4 e verificaram que a administração de 0,5mg de BE 24h após a retirada do dispositivo resultou em um intervalo da retirada do dispositivo de P4 a ovulação em média de 64h. Avaliando a substituição da última aplicação do GnRH no protocolo Ovsynch pelo BE em vacas Nelore, Fernandes et al. (2001) encontraram média da ovulação de $45,38\pm 2,03$ h depois da aplicação do BE. Barros et al. (2000) ao utilizarem um protocolo baseado na aplicação de BE-PGF2 α -BE, sendo a segunda aplicação de BE 24h após a PGF2 α e observaram que a ovulação ocorreu $44,16\pm 2,21$ h, depois da última aplicação do BE.

Estudos foram realizados por diversos grupos de pesquisa com o objetivo de possibilitar a utilização do CE como indutor da ovulação, aplicando-o no momento da retirada do dispositivo de P4. Sendo assim, visando reduzir o número de manejos e aumentar a eficiência dos protocolos de sincronização (MARQUES et al., 2004; COLAZO, KASTELIC e MAPLETOFT, 2003; AYRES et al., 2006). Reis et al. (2004) estudaram o efeito da administração do CE como indutor da ovulação em vacas Nelore e demonstraram que a administração deste fármaco no momento da retirada do dispositivo de P4 promoveu a ovulação em $80,0\pm 4,8$ h após a retirada do dispositivo de P4. Crepaldi (2009) estudou diferentes indutores da ovulação em um protocolo de IATF em vacas de corte e observou que o intervalo entre a retirada do dispositivo de P4 e a ovulação para o CE administrado no momento da retirada do dispositivo de P4 ($72,0\pm 2,0$ h) foi semelhante para o BE ($72,0\pm 0,0$ h) quando este foi aplicado 24h após a retirada do dispositivo e o intervalo entre a retirada do dispositivo e a ovulação ocorreu em média $58,3\pm 2,1$ h nos animais que receberam BE no mesmo momento da retirada do dispositivo de P4. Esse autor observou que não houve variação na dispersão das ovulações e na taxa de ovulação entre os tratamentos.

Resultados similares foram alcançados por Sales et al. (2008), os quais estudaram diferentes fontes de CE ou de BE como indutores da ovulação em vacas Nelore. Esses autores aplicaram o CE no mesmo momento da retirada do dispositivo de P4 e o BE foi administrado 24h após e observaram que o intervalo entre a retirada da fonte de P4 e o momento da ovulação para os animais tratados com BE ocorreu em média $74,5\pm 4,1$ h e para os animais que receberam CE o intervalo foi de $76,0\pm 2,7$ h.

Andrade et al. (2012b) também observaram que ambos os indutores da ovulação foram igualmente eficientes em promover o aumento da frequência dos pulsos de LH e sincronizar as ovulações dos animais tratados com CE ($75,74 \pm 5,75h$) e BE ($74,75 \pm 7,30h$).

Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG)

Os primeiros relatos da descoberta da gonadotrofina coriônica equina (eCG) foram descritos por Cole e Hart (1930), os quais descreveram que a presença desta molécula em soro de éguas prenhes promovia estímulo para o crescimento ovariano em animais de laboratório. Primeiramente o componente bioativo deste soro foi denominado de gonadotrofina do soro de égua gestante (PMSG), por ser considerado de origem materna, no entanto, logo depois foi descoberto que o hormônio procedia das células trofoblásticas dos cálices endometriais da égua prenhe (ALLEN e MOOR, 1972). Devido a esta descoberta houve uma mudança no nome do hormônio passando a ser denominado de gonadotrofina coriônica equina (eCG) (MURPHY e MARTINUK, 1991).

Na égua gestante o anel coriônico começa a se desenvolver no embrião no início da sétima semana de gestação e começa a invadir o endométrio para formar os cálices endometriais (MURPHY, 2012). Estes cálices endometriais são estruturas temporárias formadas por volta de 37º dia de gestação e correspondem a pequenas protuberâncias de tecido altamente compacto, presentes no corno gravídico da égua e que se desenvolvem devido a uma invasão de células trofoblásticas especializadas para dentro do endométrio materno (ALLEN et al., 1993). O aumento na liberação e no pico de produção da gonadotrofina ocorre entre 40 a 60 dias de gestação, no entanto, ela pode ser encontrada na circulação até 130 dias de gestação. Os cálices endometriais apresentam máximo desenvolvimento aos 65 dias de gestação nas éguas e há uma variedade no momento do pico e na quantidade da eCG encontrado no soro da égua prenhe e esta variação pode ser atribuída a fatores genéticos (MURPHY e MARTINUK, 1991).

Em equinos a eCG interage com o receptor de LH e causa a ovulação ou luteinização de folículos com consequente aumento da P4 circulante, sendo assim funcionando como hormônio luteinizante (ALLEN et al., 1993) e ligando ao corpo lúteo

durante o início da gestação e portanto, pode fornecer suporte de gonadotrofina para manter a gestação (MURPHY, 2012). No entanto, em ruminantes esta gonadotrofina possui capacidade de se ligar tanto a receptores de FSH como aos de LH, apresentando assim atividade foliculo estimulante e luteinizante (PAPKOFF, 1974; STEWART e ALLEN, 1979; SOUMANO et al., 1998). Por ser uma glicoproteína, a eCG induz a formação de anticorpos quando administradas em bovinos e outras espécies. Esta característica da molécula deve-se principalmente ao seu alto peso molecular e a presença de uma alta porcentagem de carboidratos. Além disso, esta resposta imunológica apresenta uma grande variação individual e tem indivíduos que não apresentam este tipo de resposta mesmo com repetidas aplicações (DRION et al., 2001).

Esta gonadotrofina apresenta duas cadeias: α e β que são necessárias para sua atividade biológica, sendo a cadeia α , composta por 96 aminoácidos e uma cadeia β , composta por 149 aminoácidos. Uma característica muito marcante desta molécula é a predominância de grande quantidade de carboidratos, cerca de 45% da massa da molécula. A eCG apresenta persistência na circulação de equinos e outras espécies por um longo período em comparação com outros hormônios glicoproteicos. Este fármaco apresenta uma longa meia-vida devido ao ácido siálico presente na molécula da eCG. Além disso, a molécula apresenta carga negativa, o que diminui a filtração glomerular e esta característica determina a meia-vida longa desta glicoproteína de até 3 dias (MURPHY e MARTINUK, 1991). Em um estudo realizado por Souza et al. (2009) foi observado que o perfil das concentrações circulantes da eCG atingidas após o tratamento com 400UI no momento da retirada do dispositivo intravaginal de P4 em vacas holandesas e verificaram que as concentrações da eCG sanguíneo parecem aumentar de maneira constante até 48h após a aplicação deste hormônio e 72h após ao tratamento, os níveis circulantes da eCG se encontravam em níveis basais.

Uso da eCG em programas de IATF

Os efeitos positivos do uso da eCG nos protocolos de sincronização são relatados principalmente em vacas de corte em anestro pós-parto e com baixo escore de condição corporal (BARUSELLI et al., 2004a; TORTORELLA et al., 2013; BARREIROS et al., 2014). Uma importante estratégia utilizada para melhorar os

índices de fertilidade e a eficiência dos protocolos de sincronização para IATF é a utilização da eCG no momento da retirada do dispositivo intravaginal de P4 com o objetivo de melhorar o crescimento folicular, aumentar a taxa de ovulação e de concepção das fêmeas submetidas a estes protocolos (MENEGHETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2010a; NÚÑEZ-OLIVEIRA et al., 2014). Diversos estudos descrevem que a eCG possui a capacidade de estimular o desenvolvimento folicular, aumentar o tamanho e a capacidade esteroidogênica do CL, e elevar as concentrações plasmáticas de P4 durante a fase luteal subsequente (BARUSELLI et al., 2004b; SOUZA et al., 2009; PULLEY et al., 2013). A utilização desta estratégia, aparentemente, proporciona resultados significativos em situações específicas de inadequada modulação de LH como em novilhas e vacas de corte em anestro pós-parto ou com baixa condição corporal (BÓ, BARUSELLI e MARTINEZ, 2003; BARUSELLI et al., 2004; SÁ FILHO et al., 2010a), e alta concentração circulante de P4 no momento da sincronização da ovulação em protocolos de IATF (SÁ FILHO et al., 2010b; CARVALHO et al., 2008; PFEIFER et al., 2009).

No entanto, ainda há controvérsias sobre os efeitos positivos da eCG nos protocolos de IATF em vacas leiteiras e poucos são os estudos realizados com o uso da eCG em vacas mestiças (SOUZA et al., 2009; FERREIRA et al., 2013). A administração da eCG antes da ovulação induz ao aumento no diâmetro folicular e na concentração de P4 no CL subsequente, devido a sua capacidade de se ligar aos receptores de LH e FSH tendo efeito sobre as células da teca e da granulosa do folículo ovulatório e seu efeito luteotrófico em aumentar a secreção de P4 do CL (MURPHY e MARTINUK, 1991; KEYNON et al., 2012).

Sales et al. (2016) avaliaram vacas Nelore multíparas e primíparas sincronizadas com um protocolo a base de P4 e BE e aplicação ou não da eCG no dia da remoção do dispositivo intravaginal de P4 e observaram que o diâmetro máximo do folículo dominante ($13,1 \pm 0,5$ mm) foi maior nas fêmeas que receberam eCG em comparação com as que não receberam eCG ($11,6 \pm 0,6$ mm) e que o efeito da eCG na dinâmica folicular e na fertilidade foi mais evidenciado em vacas primíparas em comparação as multíparas, provavelmente por esta categoria necessitar de um suporte gonadotrófico durante o estágio final do crescimento do folículo dominante.

O efeito positivo da eCG sobre a resposta ovariana e taxas de prenhez de vacas Nelore lactantes em anestro foi observado por Sá Filho et al. (2010a) e os autores observaram que as fêmeas que receberam eCG foi capaz de aumentar o diâmetro do folículo ovulatório ($11,6\pm 0,7 \times 9,3\pm 0,9$ mm), taxa de crescimento do folículo ($1,56\pm 0,2 \times 0,40\pm 0,2$ mm/dia), a taxa de ovulação (84,6 x 50,0%) e a taxa de prenhez (46,2% x 16,7%) em comparação com a vacas que não foram tratadas. A melhora na fertilidade verificada em fêmeas tratadas com eCG na retirada do dispositivo de P4 pode ser explicada pelo fato deste hormônio melhorar a taxa de ovulação e os níveis de P4 circulantes no diestro subsequente, favorecendo assim o estabelecimento da prenhez (BARUSELLI et al., 2004b).

Barreiros et al. (2014) estudaram o efeito do tratamento com eCG em vacas cíclicas e em anestro submetidas a um protocolo de IATF e verificaram que as vacas em anestro ($10,2\pm 0,3$ mm) apresentaram diâmetro folicular similar as vacas cíclicas ($11,0\pm 0,6$ mm), indicando que o suporte gonadotrófico promovido pelo tratamento com eCG foi eficiente em igualar vacas em anestro e cíclicas.

Doroteu et al. (2015) realizaram um estudo para avaliar a resposta a diferentes doses de eCG (200 ou 300 UI) administradas no dia 8 do protocolo de sincronização para IATF, sobre as taxas de prenhez em vacas Nelore lactantes e não houve efeito ($P>0,05$) dos tratamentos 200UI e 300UI no aumento da taxa de prenhez, 62,1% e 78,4%, respectivamente. Para estes autores ambas dosagens podem ser utilizadas em protocolos de sincronização para IATF. Pessoa et al. (2016) também avaliaram diferentes doses de eCG (300 e 400UI) administradas no momento da remoção do dispositivo de P4 em vacas de corte *Bos taurus taurus* e não observaram diferença na resposta ovariana e na eficiência do protocolo de sincronização quando foram comparadas as diferentes dosagens do hormônio na melhora no crescimento final do folículo (controle: $13,5\pm 0,3$ mm; 300UI: $14,0\pm 0,2$ mm e 400UI: $15,1\pm 0,3$ mm), na ovulação (controle: 53,7%; 300UI: 70,6% e 400UI: 77,0%) e prenhez (controle: 29,7%; 300UI: 44,8% e 400UI: 47,6%).

Um estudo realizado por Tortorela et al. (2013), no qual estudou-se o efeito da administração da eCG no dia da remoção (Dia 8) ou 2 dias antes (Dia 6) da remoção do dispositivo intravaginal de P4, sobre o diâmetro do folículo ovulatório, função luteal e taxa de prenhez em protocolos de IATF em vacas de corte, verificou-se que o diâmetro

do folículo ovulatório ($8,6\pm 0,2 \times 10,0\pm 0,4\text{mm}$), volume do CL ($46,08\pm 0,4 \times 20,29\pm 1,6\text{cm}^3$), a concentração de P4 ($9,4\pm 1,4 \times 2,4\pm 1,7\text{ng/mL}$) do CL subsequente e taxa de concepção (27,3 e 16,0%) foi maior em animais que receberam eCG no dia 6 em comparação as fêmeas que receberam eCG no dia 8 do protocolo. (Os resultados encontrados por estes autores para uma melhor resposta ovariana encontrada para a administração da eCG no dia 6 do protocolo deve-se ao protocolo utilizado por estes autores, pois a aplicação da eCG no dia 8 antes da administração de GnRH parece ser tardia e promove um tempo insuficiente para o crescimento folicular antes da ovulação em comparação com a administração antecipada da eCG.

De acordo com Pulley et al. (2013), a eficácia da eCG pode depender da condição de escore de condição corporal (ECC) e *status* cíclicos dos animais no início do protocolo de sincronização. Baruselli et al. (2004a) observaram uma melhor fertilidade pelo tratamento da eCG somente quando utilizada em vacas com baixo ECC ($\leq 2,5$), sendo observadas taxas de gestação de 40,7% para as que não receberam eCG e de 55,4% para as que receberam este hormônio ($P < 0,05$). Não houve diferença quando aplicada em vacas com bom ECC ($\geq 3,0$), sendo observadas taxas de 56,6% e 54,2% para os animais que receberam ou não aplicação de eCG, respectivamente ($P > 0,05$). De acordo com Baruselli et al. (2004b), o uso da eCG em fêmeas com baixo escore de condição corporal pode compensar a baixa pulsatilidade de LH encontrada nestes animais.

Trabalhando com vacas leiteiras para avaliar o uso da eCG em protocolos de IATF, Souza et al. (2009) observaram que esta glicoproteína proporciona um aumento na taxa de concepção nos animais tratados com eCG em comparação as vacas que não receberam eCG (30,9 e 29,1%), e que o tratamento com eCG tendeu a aumentar o volume do CL (com eCG: $5,3\pm 0,4$ x sem eCG: $6,7\pm 0,4\text{cm}^3$) e elevar as concentrações de P4 (com eCG: $3,5\pm 0,4$ x sem eCG: $4,8\pm 0,2\text{ng/mL}$) no dia 12 após ovulação, sendo este momento crítico para o desenvolvimento embrionário e estabelecimento da concepção. Estes autores verificaram que a melhora na taxa de concepção foi mais evidente em vacas com escore de condição corporal abaixo de 2,75 e que receberam eCG em comparação as que não receberam eCG.

A administração da eCG pode promover mudanças importantes no CL que levam ao aumento na produção de P4 por meio de modificações nas proporções e

função das células da granulosa e da teca depois da ovulação (KEYNON et al., 2012). Há uma elevação na densidade e no formato das mitocôndrias nestas células esteroidogênicas, contribuindo assim para o aumento na produção de P4 no diestro subsequente (RIGOGLIO et al., 2013). Uma elevada concentração de P4 pós-ovulatória é necessária para o adequado desenvolvimento embrionário e capacidade do concepto em secretar *interferon-tau* favorecendo assim o reconhecimento materno da gestação (MANN e LAMMING et al., 2001).

No entanto, em um estudo realizado por Ferreira et al. (2013) sobre a dinâmica folicular e luteal em vacas holandesas, estes autores não verificaram efeito da eCG no folículo pré-ovulatório (controle: $14,9 \pm 0,7$ mm e eCG: $15,4 \pm 0,6$ mm), no volume do CL (controle: $6,4 \pm 0,3$ cm³ e eCG: $8,6 \pm 0,7$ cm³) e na concentração de P4 pós-ovulatória (controle: $3,7 \pm 0,6$ ng/mL e eCG: $4,8 \pm 0,3$ ng/mL), $P > 0,05$. Para estes autores a eCG foi ineficiente em incrementar a dinâmica folicular e luteal em vacas leiteiras de alta produção, e este fato pode ser atribuído a menor proporção de vacas com menor escore de condição corporal e menor incidência de anestro nestes rebanhos.

Os mecanismos responsáveis pelo aumento nas concentrações de P4 plasmáticas e no volume do CL em resposta a eCG podem ser atribuídos ao aumento na densidade mitocondrial esférica e no número das células luteais grandes (FÁTIMA et al., 2012; FIELDS e FIELDS, 1996). Ocorre um aumento da capacidade mitocondrial para a produção de pregnolona após o tratamento com eCG, e estas mudanças abrangem a maior expressão de proteínas e enzimas envolvidas na esteroidogênese folicular e na biossíntese de P4 luteal (SOUMANO et al., 1996), possibilitando o crescimento do folículo dominante, maior taxa de ovulação e melhor desenvolvimento do corpo lúteo (RIGOGLIO et al., 2013).

Ultrassonografia modo Doppler em bovinos

A utilização da ultrassonografia na reprodução animal permitiu importantes avanços no sentido de elucidar diversos eventos reprodutivos dos animais domésticos, como a fisiologia ovariana e a dinâmica folicular e luteal durante o ciclo estral em bovinos (GINTHER et al., 2007). A ultrassonografia é uma técnica de diagnóstico não invasiva, segura, que não provoca modificações biológicas no paciente e que permite a

avaliação em tempo real dos órgãos e tecidos em um animal (MATSUI e MIYAMOTO, 2009).

A tecnologia da ultrassonografia Doppler colorido é uma ferramenta que possibilitou compreender, a arquitetura vascular e aspectos hemodinâmicos dos vasos e avaliar o fluxo sanguíneo das estruturas reprodutivas em fêmeas durante o ciclo estral e gestação (ACOSTA et al., 2002; MIYAMOTO et al., 2005; HERZOG et al., 2010). Na medicina veterinária esta técnica passou a ser utilizada recentemente para diversas áreas e funções, em bovinos pode ser empregada na avaliação da vascularização folicular (MATSUI e MIYAMOTO, 2009), no estudo do corpo lúteo durante a luteogênese e luteólise (ACOSTA et al., 2003), para prever a fertilidade (SIDDIQUI, ALMAMUN e GINTHER, 2009) e na avaliação do fluxo sanguíneo no útero durante diferentes estágios do ciclo estral e durante a gestação (BOLLWEIN et al., 2000; 2002). Além disso, esta tecnologia pode ser incorporada em programas reprodutivos objetivando melhorar a eficiência reprodutiva podendo ser utilizada para estimar a funcionalidade do corpo lúteo (CL) na seleção de receptoras de embriões bovinos e para o diagnóstico precoce da gestação em programas de IATF e TETF (UTT et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2013; PUGLIESI et al., 2017).

O efeito Doppler consiste em um fenômeno caracterizado pela mudança na frequência da onda sonora quando a fonte da mesma se aproxima ou se afasta do receptor, sendo a diferença entre a frequência emitida e recebida (desvio Doppler) proporcional a velocidade de deslocamento. Este efeito também ocorre com as ondas ultrassônicas e a diferença de frequência causada pelo movimento das células sanguíneas permite a detecção e a mensuração do fluxo sanguíneo (GINTHER et al., 2007).

Os equipamentos de ultrassonografia Doppler permitem 3 modos de avaliação da perfusão sanguínea: modo Espectral, modo Color Doppler e modo *Power* Doppler que podem ser divididos em duas funções de avaliação, uma qualitativa, o modo Doppler colorido e outra quantitativa o modo espectral (GHETTI, 2012). Na função qualitativa temos o *color* Doppler e o *power-flow*, o modo Doppler colorido é denominado como um espectro de uma ou duas cores, geralmente vermelho e azul, que representa o sentido do fluxo e a alteração na frequência das ondas refletidas em relação a das ondas emitidas pode ser positiva, quando as células sanguíneas se deslocam na direção ao

transdutor, representada pela cor vermelha ou negativa quando as células se deslocam no sentido contrário, se afastando do transdutor, representado pela cor azul e essas tonalidades de cores podem ser mais ou menos intensas, dependendo da intensidade e amplitude do fluxo sanguíneo (HERZOG e BOLLWEIN, 2007). O *power-flow* utiliza apenas uma cor para representar a intensidade do sinal Doppler, independente do sentido, e as variações nos sinais Doppler se apresentam como diferenças na intensidade dos pontos coloridos e possui maior sensibilidade na avaliação de vasos de menor calibre (VIANA et al., 2013; GINTHER, 2014).

Na função quantitativa, o modo espectral é demonstrado na forma de um gráfico e permite mensurar a velocidade de fluxo sanguíneo de um vaso (velocidade por tempo) (HERZOG e BOLLWEIN, 2007). A pouca utilização do modo espectral na avaliação ovariana em bovinos é devida a dificuldade de contenção do animal e principalmente pelo pequeno tamanho dos vasos, além da necessidade de ajuste do ângulo de avaliação entre o vaso e o transdutor (ACOSTA e MYIAMOTO, 2004).

Uso da ultrassonografia modo Doppler colorido no estudo da dinâmica folicular

A utilização da ultrassonografia Doppler colorido permite avaliar a dinâmica folicular sendo possível observar que juntamente com o desenvolvimento folicular ocorre uma expansão na vascularização do folículo sendo essencial para que o folículo alcance a sua maturidade e a capacidade ovulatória (ACOSTA et al., 2003). A ultrassonografia Doppler representa uma ferramenta promissora na avaliação do desenvolvimento folicular de bovinos e fornece informações importantes sobre a maturidade e vascularização folicular em fêmeas bovinas submetidas a diferentes manejos reprodutivos (ACOSTA, 2007; GINTHER, 2014).

A avaliação da vascularização folicular pode ser realizada utilizando-se metodologia subjetiva ou objetiva (ACOSTA et al., 2005; SILVA et al., 2005). Na abordagem subjetiva é realizada a classificação da vascularização folicular pela visualização das imagens dentro de uma escala de graduação previamente determinada (GHETTI, 2012). A metodologia objetiva é realizada pelo cálculo da área de sinais coloridos observados na parede folicular (ACOSTA et al., 2004). Contudo a utilização desta metodologia na avaliação da vascularização folicular apresenta algumas

limitações devido aos vasos sanguíneos na parede folicular serem pequenos e tortuosos havendo assim uma dificuldade em determinar o ângulo de insonação (ângulo Doppler) entre os vasos e o feixe da onda sonora. Além disso, as características morfológicas dos vasos sanguíneos não são uniformes ao longo da parede folicular, assim a imagem utilizada para a mensuração da área de vascularização pode não ser representativa (ARASHIRO, 2012). No entanto, um estudo realizado por Ghetti (2012), não verificou diferença para as duas metodologias, pela avaliação da área de vascularização e intensidade do fluxo sanguíneo.

O crescimento folicular está intimamente relacionado à formação de uma rede de vasos sanguíneos na camada de células da teca, responsável pelo fornecimento de nutrientes, hormônios e oxigênio para suprir o metabolismo folicular e a esteroidogênese (VIANA et al., 2013). Quando se inicia uma nova onda folicular a emergência dos folículos é acompanhada de um aumento na área de fluxo sanguíneo na parede do folículo que continua durante todo o desenvolvimento (ACOSTA et al., 2005). No desvio folicular ocorre uma diferença morfológica entre as taxas de crescimento do folículo dominante e dos subordinados, e ocorre o aumento no fluxo sanguíneo do folículo durante este período e atinge valores máximos no folículo pré-ovulatório (ARASHIRO et al., 2013). E este aumento da vascularização pode ser quantificado pelo recurso Doppler colorido que permite a visualização e mensuração deste fluxo sanguíneo, que está positivamente correlacionado com a concentração intrafolicular de estradiol (PANCARCI et al., 2002). Após o surgimento de LH ocorrem mudanças no fluxo sanguíneo do folículo com acentuado aumento na vascularização na base do folículo e concomitante diminuição do fluxo sanguíneo no ápice eo folículo pré-ovulatório se distingue de um atrésico pela presença de uma região altamente vascularizada (ACOSTA et al., 2003).

O crescimento de uma rede de capilares nas camadas das células da teca é requerido para a formação do *antrum* folicular e afeta a composição e a concentração de fluido folicular, influenciando no desenvolvimento do oócito (ARASHIRO et al., 2013). Acosta et al. (2003) utilizaram a tecnologia Doppler colorido para promover uma visualização em tempo real das mudanças no fluxo sanguíneo e vascularização da parede do folículo ao redor do momento da ovulação e observaram que a área e a velocidade do fluxo sanguíneo estão correlacionadas com o aumento na concentração

plasmática de estradiol e o surgimento de LH. Esses autores afirmam que existe uma relação entre o fluxo sanguíneo na parede folicular e os níveis plasmáticos de estradiol e LH no folículo pré-ovulatório em torno do momento da ovulação. De acordo com Scully et al. (2014), o aumento significativo que ocorre no fluxo sanguíneo do folículo pré-ovulatório promove uma elevação no suporte de gonadotrofinas e fatores bioquímicos e hormonais necessários para uma completa maturação do folículo e ruptura do mesmo

Durante a ovulação, o pico de LH promove profundas alterações funcionais e estruturais no folículo maduro as quais demonstraram estar associadas com o aumento do fluxo sanguíneo na parede folicular, estas mudanças estão relacionadas ao aumento dos níveis de estradiol, observando-se uma inter-relação entre o diâmetro folicular, a concentração de estradiol e a área de vascularização do folículo (AYRES e MINGOTI, 2012). O fluxo sanguíneo na parede do folículo é positivamente correlacionado com a concentração intrafolicular de estradiol e este aumento coincide com a elevação na vascularização da parede do folículo em bovinos (MATTIOLI et al., 2001). Em um estudo realizado por Siddiqui et al. (2009), os quais avaliaram a relação entre a porcentagem de sinais Doppler coloridos na parede folicular e as taxas de concepção de fêmeas bovinas submetidas a um protocolo de IATF. Estes autores observaram que uma alta vascularização do folículo pré-ovulatório foi associada a uma elevada taxa de concepção.

Rodrigues et al. (2016a) avaliaram a dinâmica folicular por ultrassonografia modo Doppler em fêmeas submetidas a um protocolo de sincronização da ovulação e observaram os parâmetros de vascularização na área da parede folicular de $0,26 \pm 0,09 \text{ cm}^2$ e $40,74 \pm 11,96\%$ para área de vascularização do folículo e o percentual de vascularização do folículo. Ghetti (2012) realizaram uma avaliação subjetiva do padrão vascular dos folículos pré-ovulatórios em vacas mestiças Holandês-Gir utilizando ultrassonografia modo Doppler colorido e observaram valores para área da parede do folículo e área de vascularização da parede do folículo pré-ovulatório de acordo com o cada intervalo de percentual de vascularização de 100-75% ($0,43 \pm 0,25 \text{ cm}^2$ e $0,39 \pm 0,22 \text{ cm}^2$), 79,5-50% ($0,39 \pm 0,09 \text{ cm}^2$ e $0,24 \pm 0,06 \text{ cm}^2$) e 49,9-25% ($0,48 \pm 0,17 \text{ cm}^2$ e $0,17 \pm 0,06 \text{ cm}^2$). Segundo estes autores a classificação do folículo segundo a

vascularização possibilita prever que folículos com alta vascularização tem a capacidade de alcançar a maturação final e adquirir a capacidade ovulatória.

Uso da ultrassonografia modo Doppler colorido na avaliação do corpo lúteo

O corpo lúteo é uma das estruturas mais vascularizadas do organismo e apresenta um dos maiores índices de vascularização por unidade de tecido no corpo (GINTHER et al., 2007). Segundo Herzog et al. (2010), o CL inicia rapidamente seu desenvolvimento no ovário logo após a ovulação sendo esta estrutura responsável pela produção de P4 e o seu desenvolvimento é caracterizado por uma intensa vascularização e aumento gradativo da síntese de P4, posteriormente o CL chega a uma fase estática de desenvolvimento, no entanto, nesse período a concentração plasmática de P4 continua aumentando e também o suprimento sanguíneo (REYNOLDS, GRAZUL-BLISKA e REDMER, 2000).

Durante o desenvolvimento do CL na primeira semana depois da ovulação, a formação de novos vasos sanguíneos é muito intensa. Em um estudo realizado por Acosta et al. (2003), os autores verificaram que durante o desenvolvimento do CL um aumento gradativo do fluxo sanguíneo foi concomitante com o aumento no volume e das concentrações de P4, sugerindo que o fluxo sanguíneo está associado com o potencial de produzir e secretar progesterona. A vascularização adequada desta estrutura é essencial para a biossíntese de P4 e serve como uma rota de entrega de substâncias biológicas ao fornecer nutrientes para as células lúteais, substratos para produção de hormônios e também hormônios estimuladores e/ou reguladores que são indispensáveis para a manutenção da secreção de P4 (ACOSTA e MIYAMOTO, 2004; BOLLWEIN, LUTTEGENAU e HERGOZ, 2013).

O aumento no fluxo sanguíneo e o volume do corpo lúteo está associado com o potencial para produzir P4, refletindo na elevação da concentração plasmática de P4 que indica o desenvolvimento de CL funcional (ACOSTA et al., 2003; HERZOG et al., 2010). Um corpo lúteo com poucos ou inexistentes sinais Doppler pode ser indicativo de ausência de suprimento sanguíneo e assim considerado como um CL não funcional, no entanto, o mesmo CL pode ser considerado de tamanho normal (ACOSTA et al., 2002; ACOSTA et al., 2003; UTT et al., 2009), isto pode ser devido ao fato de quando o

CL atinge o tamanho maduro, o seu diâmetro não reflete a sua capacidade esteroidogênica (MANN, 2009). Bicalho et al. (2008) realizaram um estudo para avaliar a acurácia da detecção do CL funcional pela palpação e por ultrassonografia transretal em vacas holandesas e sugeriram como tamanho adequado para identificar fêmeas com CL funcional seria de 22 a 23mm, que reflete uma concentração de P4 >1ng/mL. Segundo Wiltbank et al. (2014), um CL funcional gera concentrações de progesterona sérica que variam entre 4 a 6ng/ml.

De acordo com Herzog et al. (2010) o fluxo sanguíneo é mais apropriado do que o tamanho do CL para avaliação da funcionalidade. Estes autores acompanharam a dinâmica luteal com auxílio da ultrassonografia Doppler e dosagem hormonal de progesterona e caracterizaram a vascularização do CL durante o ciclo estral de fêmeas bovinas leiteiras e observaram que na fase de crescimento (até dia 7), o fluxo sanguíneo atingiu valores máximos de $0,7 \pm 0,1 \text{cm}^2$ e na fase de manutenção (dia 8 a 16), estes parâmetros alcançaram valores máximos de $1,2 \pm 0,1 \text{cm}^2$.

Pinaffi et al. (2015) avaliaram a vascularização do folículo e corpo lúteo por ultrassonografia Doppler como preditor de fertilidade em fêmeas Nelore submetidas a IATF e os animais foram divididos de acordo com o percentual de vascularização e observaram uma positiva correlação entre o percentual de vascularização do CL e a fertilidade. Estes autores observaram a média do diâmetro do CL nos grupos divididos por percentual de vascularização do CL foi de <40% (17,07mm), 41 a 50% (17,24mm), 51-60% (17,52mm), 61-70% (17,09mm) e >71% (17,60mm). Além disso, os mesmos verificaram os parâmetros morfofuncionais nas fêmeas que ficaram gestantes e não gestantes avaliados 30 dias após a IA e relataram que os animais gestantes apresentavam diâmetro do CL, área de vascularização do CL e percentual de vascularização do CL de $17,52 \pm 0,3 \text{mm}$; $1,49 \pm 0,0 \text{cm}^2$ e $51,99 \pm 1,0\%$ e as fêmeas não gestantes de $17,17 \pm 0,3 \text{mm}$; $1,42 \pm 0,0 \text{cm}^2$ e $51,46 \pm 1,2\%$, respectivamente.

Arêas et al. (2012) avaliaram o padrão vascular luteal ao longo do ciclo estral em fêmeas mestiças submetidas a um protocolo de IATF e para predizer animais não gestantes 20 dias após a IA e verificaram área total, área de vascularização e percentual de vascularização do CL nos dias 12, 14 e 20 do ciclo estral foi de $4,9 \pm 0,21 \text{cm}^2$; $0,54 \pm 0,07 \text{cm}^2$; $14,89 \pm 1,82\%$ em animais gestantes e $4,13 \pm 0,27 \text{cm}^2$; $0,47 \pm 0,05 \text{cm}^2$ e $12,70 \pm 1,11\%$ em animais não gestantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e manejo dos animais

O estudo foi realizado de acordo com preceitos éticos recomendados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), sob protocolo nº 41/2016. O experimento foi realizado entre os meses de maio a agosto de 2016, na fazenda experimental de Entre Rios, pertencente a Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA, localizada no município de Entre Rios, região Nordeste da Bahia, com latitude 11°56'31" sul, longitude 38°05'04" oeste e estando a uma altitude de 162 metros. A região apresenta pluviosidade média anual de 1.251,00mm e possui clima quente e semiúmido. A propriedade adotava um sistema extensivo de criação com os animais mantidos em pastagens de *Brachiária decumbens*, com suplementação mineral e acesso a água *ad libitum*.

Para a realização deste trabalho, foram utilizadas 30 vacas paridas multíparas mestiças Holandês x Zebu. Estes animais encontravam-se em período pós-parto de $77,34 \pm 22,13$ dias, apresentavam duração da lactação de $279,67 \pm 58,67$ dias e produção média diária de leite de $4,85 \pm 0,83$ Kg, além disso, a média para escore de condição corporal (ECC) era de $3,07 \pm 0,38$, utilizando-se uma escala de 1 a 5 (HOUGHTON et al., 1990). A propriedade obedecia ao calendário oficial estadual de vacinação.

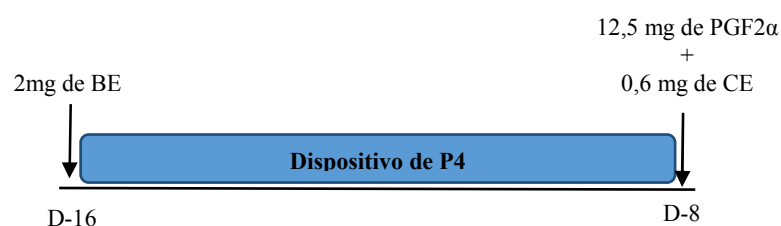
Previamente ao início do experimento os animais foram submetidos ao exame clínico-ginecológico e ultrassonografia transretal, utilizando-se um transdutor linear com frequência de 7,5MHz (MINDRAY Z5, Shenzhen, China), sendo consideradas aptas a participar do experimento, somente fêmeas que apresentavam, no momento da avaliação, ausência de anormalidade no trato reprodutivo.

Protocolos de pré-sincronização

Todas as 30 fêmeas foram submetidas ao mesmo protocolo de pré-sincronização, para garantir que todos os animais apresentassem corpo lúteo (CL) no início do

protocolo, conforme descrito a seguir: Em um dia aleatório do ciclo estral denominado dia menos 16 (D-16) todos os animais receberam um dispositivo intravaginal novo de P4 (CIDR[®], Zoetis, São Paulo, Brasil) contendo 1,9g de P4 associado a 2mg de Benzoato de Estradiol (BE) (GONADIOL[®], Zoetis, São Paulo, Brasil) por via intramuscular (i.m.). No dia menos 8 (D-8) foi removido o dispositivo de P4 e administrado 12,5mg de Dinoprost Trometamina (PGF2 α) (LUTALYSE[®], Zoetis, São Paulo, Brasil) i.m., seguido por 0,6mg de Cipionato de Estradiol (CE) (ECP[®], Zoetis, São Paulo, Brasil) i.m., conforme descrito em Figura 1.

Figura 1 - Representação esquemática do protocolo de pré-sincronização da ovulação.



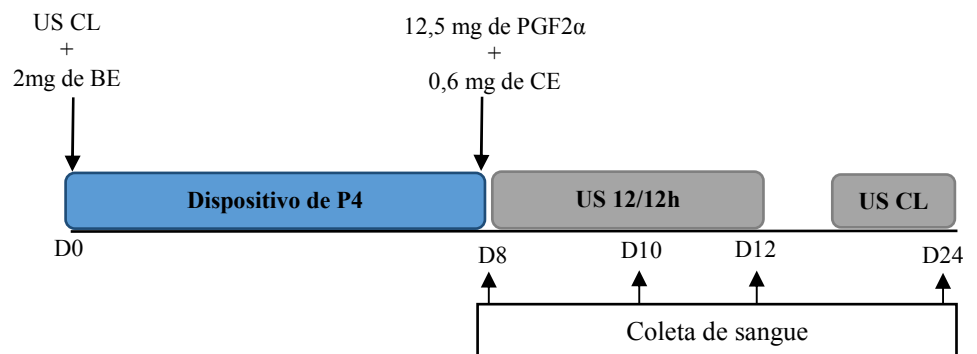
Protocolo de sincronização

Oito dias após a retirada dos dispositivos de P4, no dia 0 (D0), todos os animais foram avaliados por ultrassonografia transretal modo B utilizando-se um transdutor linear com frequência de 7,5MHz (Mindray Z5, Shenzhen, China) para verificar a presença de CL. Após a avaliação ultrassonográfica no Dia 0, 26 fêmeas foram submetidas a um protocolo de sincronização e receberam um dispositivo intravaginal novo de P4 (CIDR[®], Zoetis, São Paulo, Brasil) contendo 1,9g de P4 associado a 2mg de BE (GONADIOL[®], Zoetis, São Paulo, Brasil) i.m. e neste mesmo dia metade dos animais foram tratados com 12,5mg de PGF2 α i.m. (LUTALYSE[®], Zoetis, São Paulo, Brasil) e outra metade com 1,5mL de solução salina à 0,9% i.m., constituindo os grupos: Grupo Alta P4 (não receberam PGF2 α no início do protocolo de sincronização - D0, n=13) e Grupo Baixa P4 (receberam PGF2 α no início do protocolo de sincronização - D0, n=13). No Dia 8 foi removido o dispositivo intravaginal de P4 e administrado

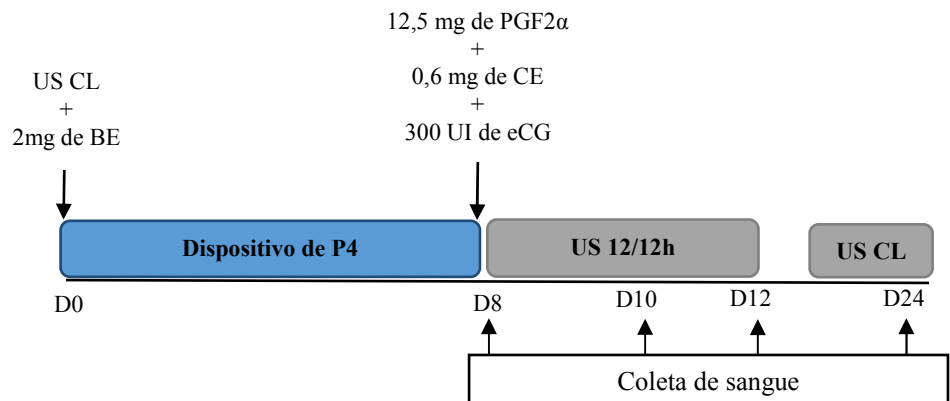
12,5mg de PGF2 α (LUTALYSE[®], Zoetis, São Paulo, Brasil) i.m., seguido por 0,6mg de CE (ECP[®], Zoetis, São Paulo, Brasil) i.m. em todas as vacas. Neste momento, as fêmeas foram aleatoriamente separadas para serem tratadas com 300UI de eCG (FOLLIGON[®], MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil) ou 1,5mL de solução salina à 0,9% i.m. Desta forma, das 13 vacas não tratadas com PGF2 α no Dia 0, seis foram tratadas com solução salina (Grupo Alta P4-S/eCG, n=6) e sete foram tratadas com eCG (Grupo Alta P4-C/eCG, n=7), enquanto que das 13 vacas tratadas com PGF2 α no Dia 0, seis foram tratadas com solução salina (Grupo Baixa P4-S/eCG, n=6) e sete foram tratadas com eCG (Grupo Baixa P4-C/eCG, n=7), conforme demonstrado na Figura 2. Não foram verificadas perdas de dispositivo intravaginal de P4 neste experimento.

Figura 2 - Representação esquemática dos protocolos de sincronização e *design* experimental.

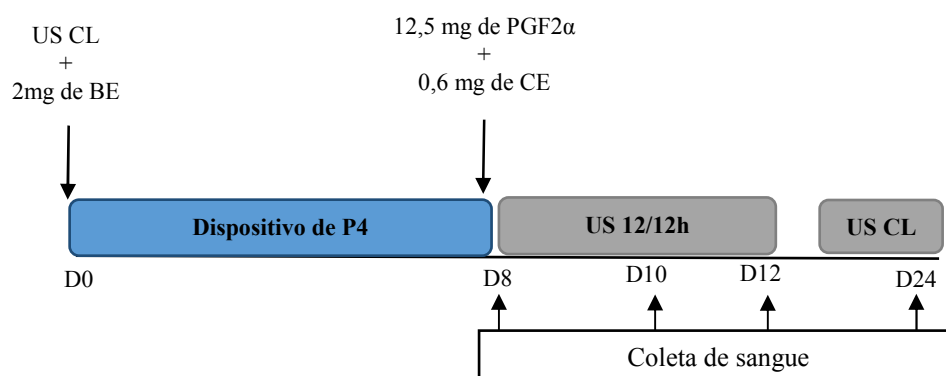
1. Grupo Alta P4 - S/eCG



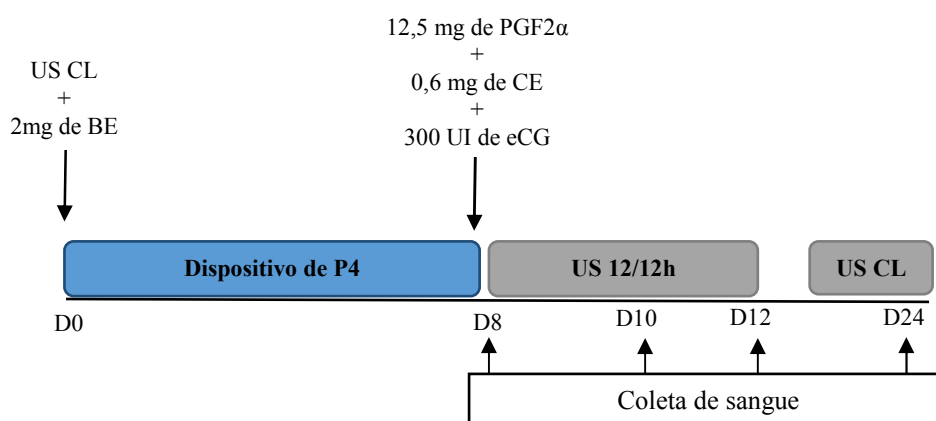
2. Grupo Alta P4 - C/eCG



3. Grupo Baixa P4 - S/eCG



4. Grupo Baixa P4 - C/eCG



BE: Benzoato de estradiol. CE: Cipionato de estradiol. eCG: Gonadotrofina coriônica equina. P4: Progesterona. PGF2 α : Prostaglandina F2 alfa. US CL: Ultrassonografia transretal para detecção de CL

Avaliações ultrassonográficas

Os exames ultrassonográficos foram realizados utilizando um aparelho portátil equipado com as funções modo B e Doppler colorido (MINDRAY Z5, Shenzhen, China), para as avaliações em modo B empregou-se um transdutor transretal com frequência de 7,5Mhz. No modo Doppler colorido as configurações foram ajustadas na faixa de velocidade de 6cm/s para detectar movimento das células sanguíneas em

pequenos vasos, para este efeito utilizou-se o modo *power-flow*, uma frequência de 6,5Mhz, com padrões de ganho de cor de 70%, frequência de repetição de pulsos (PRF) de 0,7KHz e a profundidade de avaliação de 6,0cm, de acordo com a metodologia proposta por Rodrigues (2016a).

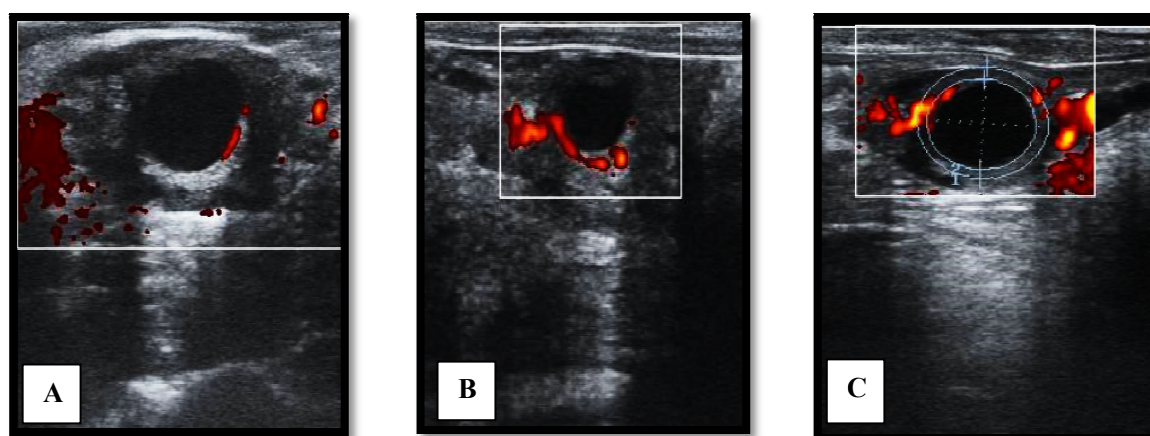
Dinâmica e função folicular

Inicialmente os ovários foram localizados por palpação transretal, seguindo a ordem de avaliação (primeiro ovário direito e depois o ovário esquerdo) e avaliado o desenvolvimento folicular por ultrassonografia em modo B. Logo em seguida, as imagens do folículo dominante e do folículo pré-ovulatório foram gravadas com o recurso Doppler colorido ativado, permitindo assim posterior avaliação do fluxo sanguíneo. Foi considerado folículo atresico aquele com perda da detecção do fluxo sanguíneo e progressiva diminuição no diâmetro ao longo das avaliações. As avaliações ultrassonográficas da dinâmica folicular foram realizadas a cada 12 horas, começando no Dia 8 até a ovulação ou até 108h após a retirada do dispositivo intravaginal de P4 (Figura 1). O momento da ovulação foi definido pelo intervalo entre a retirada do dispositivo intravaginal de P4 e a ovulação. E a ovulação foi caracterizada pelo desaparecimento do maior folículo presente no exame anterior, denominado folículo pré-ovulatório, e com consequente formação do CL. A taxa de crescimento do folículo pré-ovulatório (TXFOL) foi obtida pela diferença entre o diâmetro do folículo pré-ovulatório (DFOL) e o diâmetro do maior folículo na primeira avaliação no Dia 8 (DFOL8) dividido pelo período de crescimento e expresso na unidade de milímetros por dia (mm/d) (ANDRADE, 2012a). Além disso, utilizou-se a ultrassonografia modo B para calcular a área total da parede do folículo dominante de cada animal. Esta medida foi conseguida pela subtração da área da parede interna do folículo e pela área da parede externa do folículo, para determinar a área total da parede do folículo dominante no Dia 8 (APFOL8) e no Dia 10 (APFOL10) do protocolo de sincronização e também a área da parede do folículo pré-ovulatório (APFOL).

As imagens dos folículos foram armazenadas também com recurso Doppler colorido ativado (Figura 2) para quantificar a área de vascularização da parede do folículo dominante no dia oito (VASFOL8), no dia dez (VASFOL10) e a área de

vascularização da parede do folículo pré-ovulatório (VASFOL). Além disso, calculou-se a área total da parede do folículo em cada animal, utilizando uma função do próprio aparelho, conforme Figura 2. Posteriormente, fez-se o cálculo da área de vascularização utilizando o cursor para se determinar a área de vascularização na parede do folículo. O percentual de vascularização na área da parede do folículo dominante no dia oito ((%PVFOL8), no dia dez (%PVFOL10) e do protocolo de sincronização e no folículo pré-ovulatório (%PVFOL) foi obtido pela razão entre a área de vascularização e área total da parede folicular, de acordo com a metodologia proposta por Rodrigues (2016a).

Figura 3 -Imagens ultrassonográficas do folículo dominante: imagem A - folículo com áreas de baixa vascularização com sinais Doppler colorido, imagem B - folículo com áreas de alta vascularização com sinais Doppler colorido e imagem C - folículo com sinais Doppler colorido com área irrigada delimitada.



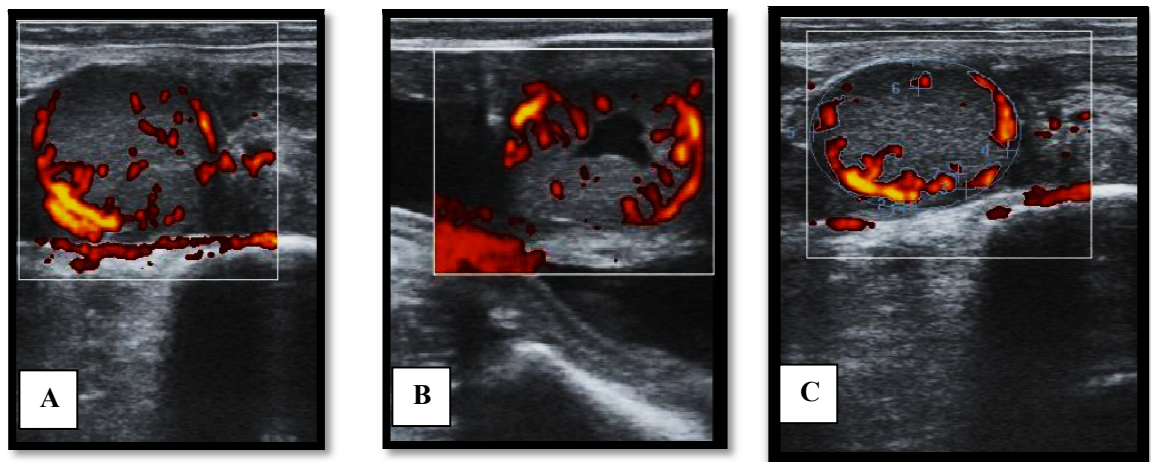
Mensurações e vascularização luteal

As avaliações do corpo lúteo do diestro subsequente foram realizadas pela ultrassonografia modo B e Doppler colorido no Dia 24 do protocolo de sincronização, ou seja, 12 dias após a última avaliação ultrassonográfica do folículo (Figura 3). Após a localização do ovário contendo o CL, o mesmo foi analisado por ultrassonografia em modo B e a imagem do CL foi congelada para mensuração do diâmetro (DCL), área

total (ACL) e volume do CL (VCL). Nos CLs cavitários, foi calculada a área da cavidade luteal e subtraída da área total do CL. O volume da cavidade luteal foi subtraído do volume do corpo lúteo para se determinar o volume do tecido luteal em corpos lúteos cavitários, conforme metodologia descrita por Kastelic et al. (1990).

As imagens luteais foram armazenadas e calculou-se a área de vascularização do corpo lúteo (AVASCL) de cada animal, empregando uma função do próprio aparelho. Para determinação do percentual de vascularização da área do corpo lúteo (%PVASCL) foi realizada a razão entre a área de vascularização e área total do corpo lúteo, de acordo com metodologia proposta por Arêas (2012).

Figura 4 - Imagens ultrassonográficas do corpo lúteo: Imagem A - corpo lúteo compacto com sinais Doppler colorido, imagem B - corpo lúteo cavitário com sinais Doppler colorido e imagem C - corpo lúteo com sinais Doppler colorido com área irrigada delimitada.



Coletas de sangue e dosagem hormonal

As amostras de sangue para dosagem da concentração sérica de P4 foram coletadas em diferentes momentos do protocolo de sincronização nos dias zero, oito, 10 e 24 (D0, D8, D10 e D24), por meio da punção venosa coccígea em tubos a vácuo de 10mL sem anticoagulante (VACUTAINER, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA) e imediatamente refrigerado em isopor contendo gelo e permanecendo

a uma temperatura de 4°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3.000G por 15 minutos para separação do soro, transferidas para microtubos de polietileno, identificadas e armazenadas a -20°C até o momento da análise, no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular da UFBA. As análises da concentração de P4 foram realizadas pela metodologia da quimioluminescência, utilizando o *Imunoensaio access immunoassay systems progesterone* (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), no Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da UFBA. O coeficiente de variação do intra-ensaio e inter-ensaio foi de 6,25% e 8,95%; respectivamente e a sensibilidade do ensaio foi de 0,016ng/mL.

Delineamento experimental e análise estatística

Os quatro grupos experimentais foram analisados em um arranjo fatorial (2x2) com base em um delineamento inteiramente casualizado, sendo o primeiro fator a aplicação de PGF2 α no dia zero (níveis 0 e 12,5 mg), enquanto o segundo fator foi a aplicação de eCG no dia oito do protocolo (níveis 0 e 300 UI). A análise estatística foi realizada utilizando-se o pacote estatístico *Statistical Package for Social Science* (SPSS) versão 19 (SPSS, 2012). Para tanto, realizou-se a seguinte sequência de análises: 1- A média e desvio padrão das variáveis de interesse ao estudo foram obtidas por meio da análise descritiva; 2- As diferenças entre as variáveis de interesse: diâmetro do folículo dominante e pré-ovulatório (DFOL8, DFOL10 e DFOL), taxa de crescimento folicular (TXFOL), área da parede do folículo dominante e pré-ovulatório (APFOLD8, APFOLD10 e APFOL), área de vascularização do folículo dominante e pré-ovulatório (VASFOLD8, VASFOLD10 e VASFOL), percentual da área de vascularização do folículo dominante e pré-ovulatório (%PVFOL8, %PVFOL10 e %PVFOL), diâmetro do corpo lúteo (DCL), área do corpo lúteo (ACL), volume do corpo lúteo (VCL), área de vascularização do corpo lúteo (AVASCL), percentual da área de vascularização do corpo lúteo (%PVASCL) e as análises das concentrações séricas de progesterona (P4D0, P4D8, P4D10 e P4DCL) nos diferentes grupos experimentais foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey. Para todas as análises foram considerados nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dinâmica e função folicular

Do total de 30 animais, quatro não ovularam ao protocolo de pré-sincronização, sendo excluídos desta etapa do estudo. Sendo assim, para a análise das características relacionadas à dinâmica e função folicular foram utilizadas 26 fêmeas distribuídas entre os grupos experimentais da seguinte forma: Alta P4-S/eCG (n=6), Alta P4-C/eCG (n=7), Baixa P4-S/eCG (n=6) e Baixa P4-C/eCG (n=7). Para as variáveis de interesse não foi encontrada interação entre os tratamentos. Neste estudo foi verificado que a presença de um CL no início do protocolo de sincronização para IATF elevou significativamente a concentração circulante de P4 no momento da sincronização da ovulação, este cenário hormonal impactou negativamente no diâmetro do foliculo no Dia 10 ($P=0,01$), no diâmetro do foliculo pré-ovulatório; ($P=0,02$) e na área de vascularização da parede do foliculo pré-ovulatório ($P=0,04$) em comparação as fêmeas com baixa concentração de P4 (Tabela 1 e Figura 5).

Estes achados enfatizam a importância de um adequado ambiente endócrino durante o crescimento e maturação do foliculo ovulatório nos protocolos de sincronização para IATF. Alguns estudos relatam que altas concentrações circulantes de P4 pré-ovulatórias podem diminuir a eficiência dos protocolos de sincronização e podem estar relacionadas com a redução na pulsatilidade de LH, desencadeando diminuição no desenvolvimento folicular e conseqüentemente no diâmetro do foliculo ovulatório (DADARWAL et al., 2013; MARTINS et al., 2014; SALES et al., 2015).

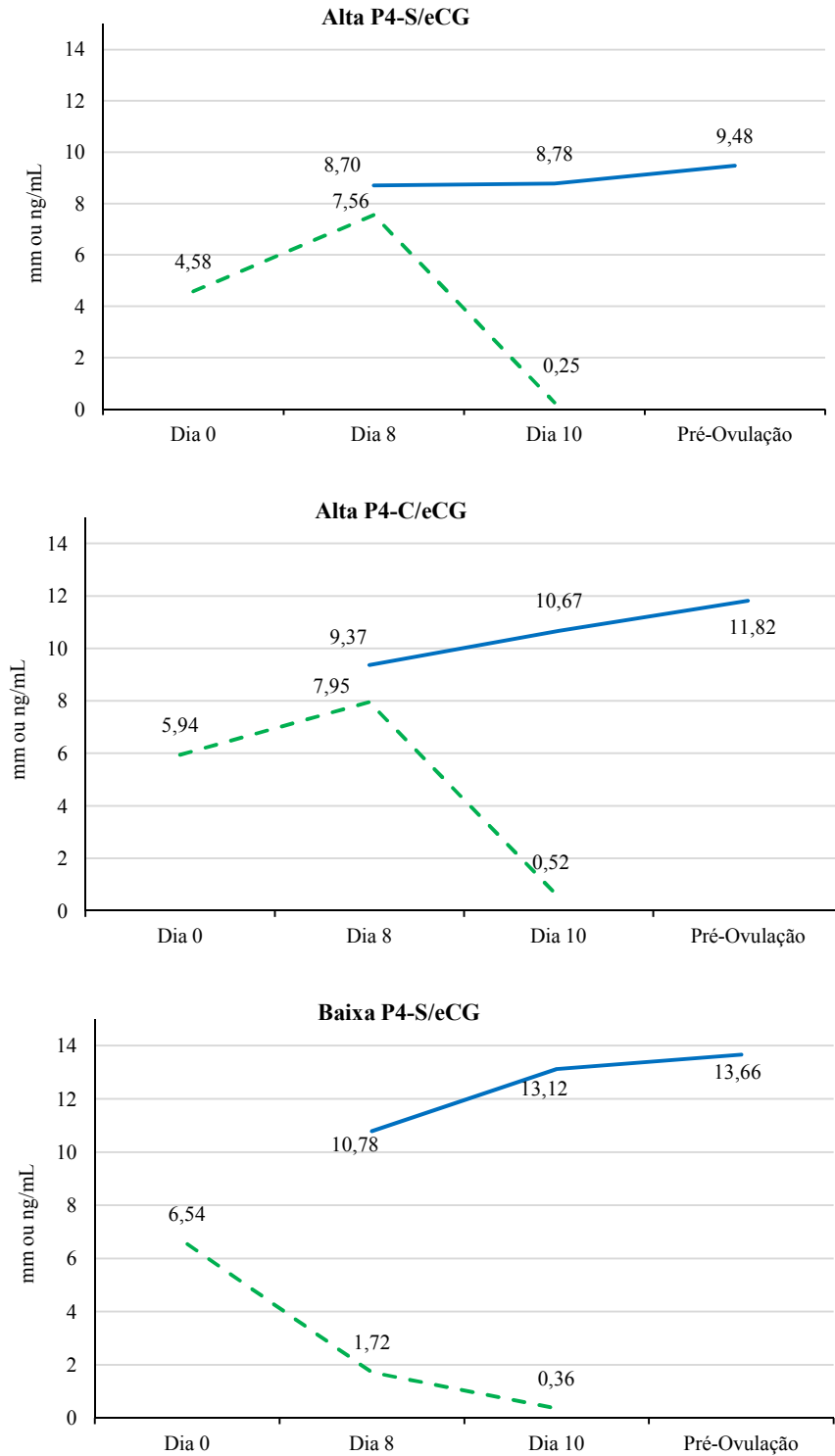
Os resultados desta pesquisa são consistentes com os encontrados por Pegorer et al. (2011), os quais utilizaram a administração ou não de $PGF2\alpha$ no início do protocolo de sincronização para IATF em novilhas Nelore para proporcionar um ambiente hormonal com diferentes concentrações circulante de P4 e observaram que baixas concentrações circulantes de P4 pré-ovulatórias elevaram a frequência de pulsos de LH favorecendo o crescimento folicular e o aumento no diâmetro do foliculo dominante (Alta P4: $10,3\pm 0,22$ mm e Baixa P4: $9,3\pm 0,21$ mm) permitindo assim que este foliculo alcance maior diâmetro ovulatório.

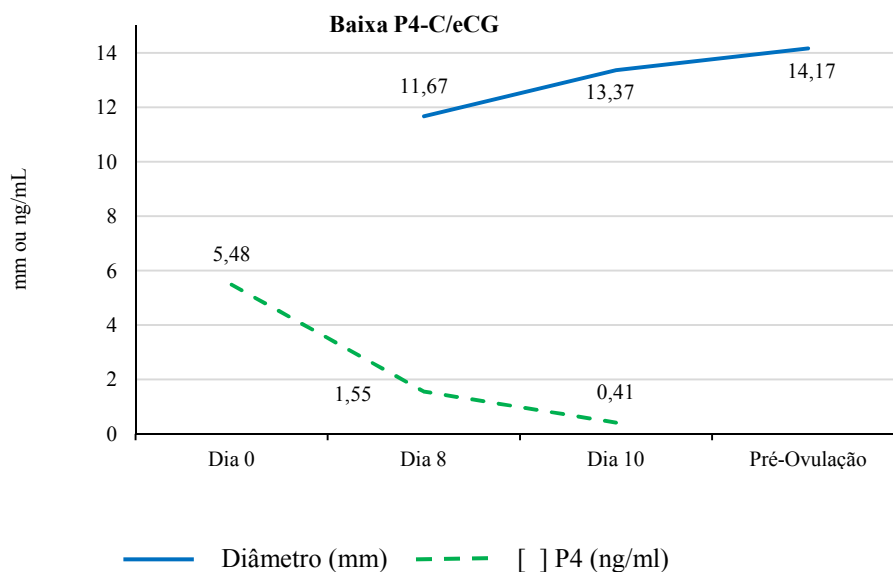
Tabela 1 - Médias e Desvios-padrão dos parâmetros de dinâmica folicular (mm e cm²), taxa de crescimento folicular (mm/d), vascularização folicular (cm² e %), e momento da ovulação (h) avaliados por ultrassonografia modo B e Doppler colorido e as concentrações séricas de progesterona (ng/mL) nos dias 0, 8 e 10 do protocolo de sincronização nos diferentes grupos experimentais nas fêmeas mestiças.

Variáveis	Grupos Experimentais				P-valor	Geral (n=26)
	Alta P4-S/eCG (n=6)	Alta P4-C/eCG (n=7)	Baixa P4-S/eCG (n=6)	Baixa P4-C/eCG (n=7)		
DFOL8 (mm)	8,70±2,10	9,37±1,40	10,78±2,31	11,67±2,55	0,06	10,19±2,35
DFOL10 (mm)	8,78±2,04a	10,67±1,65ab	13,12±3,52b	13,37±2,34b	0,01	11,46±2,93
DFOLV (mm)	9,48±2,12a	11,82±2,64ab	13,66±2,58b	14,17±2,22b	0,02	12,36±2,91
TXFOL (mm/dia)	0,03±0,02	0,05±0,01	0,07±0,02	0,07±0,03	0,52	0,06±0,02
APFOL8 (cm ²)	0,33±0,13	0,42±0,12	0,51±0,17	0,56±0,17	0,53	0,46±0,17
APFOL10 (cm ²)	0,25±0,14a	0,52±0,25ab	0,58±0,24ab	0,67±0,12b	0,01	0,51±0,23
APFOL (cm ²)	0,33±0,12a	0,47±0,13ab	0,54±0,25ab	0,64±0,17b	0,02	0,50±0,20
VASFOL8 (cm ²)	0,07±0,04	0,08±0,04	0,13±0,06	0,14±0,01	0,23	0,10±0,06
VASFOL10 (cm ²)	0,11±0,04a	0,18±0,10b	0,17±0,04ab	0,17±0,08ab	0,34	0,16±0,07
VASFOL (cm ²)	0,09±0,04a	0,15±0,05ab	0,18±0,09b	0,18±0,04b	0,04	0,15±0,06
%PVFOL8 (%)	16,67±12,37	18,86±6,33	29,00±12,88	21,20±3,49	0,12	21,92±10,68
%PVFOL10 (%)	20,29±10,49	24,83±15,14	22,00±7,98	32,80±2,96	0,59	24,27±5,95
%PVFOL (%)	42,17±15,31	37,29±21,53	25,29±6,10	32,80±12,27	0,26	34,20±15,89
MOV (horas)	96,00±13,14a	94,29±10,79a	74,40±21,46ab	61,50±11,89b	0,03	80,77±20,23
P4D0 (ng/mL)	4,58±1,06	5,94±3,49	6,54±3,21	5,48±3,40	0,38	5,60±2,91
P4D8 (ng/mL)	7,56±3,70a	7,95±2,90a	1,72±1,16b	1,55±0,74b	0,001	4,69±2,87
P4D10 (ng/mL)	0,25±0,51	0,52±0,31	0,36±0,18	0,41±0,16	0,48	0,51±0,47

^{a, b} Médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si, P<0,05. ANOVA, teste Tukey. Grupo Alta P4-S/eCG: não aplicação de PGF2 α no D0 e sem administração de eCG no dia 8 do protocolo de sincronização; Grupo Alta P4-C/eCG: não aplicação de PGF2 α no D0 e com administração de eCG no dia 8 do protocolo; Grupo Baixa P4-S/eCG: aplicação de PGF2 α no D0 e sem administração de eCG no dia 8 do protocolo de sincronização; Grupo Baixa P4-C/eCG: aplicação de PGF2 α no D0 e com administração de eCG no dia 8 do protocolo de sincronização; DFOL8: Diâmetro do foliculo dominante no Dia 8; DFOL10: Diâmetro do foliculo dominante no Dia 10. DFOLV: Diâmetro do foliculo ovulatório. TXFOL: Taxa de crescimento do foliculo ovulatório. APFOL8: Área da parede do foliculo no Dia 8; APFOL10: Área da parede do foliculo no Dia 10. APFOL: Área da parede do foliculo ovulatório. VASFOL8: Área de vascularização da parede do foliculo no Dia 8; VASFOL10: Área de vascularização da parede do foliculo no Dia 10. VASFOL: Área de vascularização da parede do foliculo ovulatório. %PVFOL8: Percentual de vascularização da parede do foliculo no Dia 8; %PVFOL10: Percentual de vascularização da parede do foliculo no Dia 10. %PVFOL: Percentual de vascularização da parede do foliculo ovulatório. MOV: momento da ovulação. P4D0: concentração de progesterona no Dia 0. P4D8: concentração de progesterona no Dia 8. P4D10: concentração de progesterona no Dia 10.

Figura 5 – Diâmetro do folículo dominante (mm) nos dias 8 e 10, diâmetro do folículo pré-ovulatório (mm) e concentração sérica de progesterona (ng/mL) nos dias 0, 8 e 10 do protocolo de sincronização nos diferentes grupos experimentais





Resultados semelhantes foram encontrados por Pfeifer et al. (2009) em que estudaram o efeito da concentração circulante de P4 em um protocolo de sincronização para IATF sobre a dinâmica folicular e o perfil hormonal em vacas de corte *Bos taurus taurus*. Estes autores observaram que as vacas que apresentavam baixa concentração circulante de P4 tiveram maior foliculo dominante ($14,3 \pm 0,51$ mm) e ovulatório ($16,5 \pm 0,52$ mm) em comparação as vacas do grupo alta concentração de P4 (foliculo dominante: $12,3 \pm 0,34$ e ovulatório: $14,2 \pm 0,34$ mm). Carvalho et al. (2008) trabalharam com novilhas mestiças cíclicas e submetidas a aplicação ou não de $PGF2\alpha$ no dia 0 do protocolo de sincronização objetivando alcançar animais com e sem CL no início do protocolo, os mesmos verificaram que altos níveis circulantes de P4 pré-ovulatórios comprometeram o crescimento do diâmetro do foliculo dominante e ovulatório, os animais que apresentaram alta concentração de P4 tiveram menor diâmetro do foliculo dominante e ovulatório ($10,5 \pm 0,4$ e $11,7 \pm 0,5$ mm) em comparação as que tiveram concentração de P4 ($11,9 \pm 0,4$ e $12,6 \pm 0,4$ mm)

De forma geral, os achados deste experimento estão de acordo com a literatura, que descreve que um cenário com baixa concentração de P4 estimula um padrão de liberação de LH de alta frequência e baixa amplitude promovendo um ambiente hormonal para o desenvolvimento e maturação folicular, possibilitando que o foliculo dominante alcance a frequência de pulsos de LH aumenta, o foliculo dominante

continua o seu crescimento possibilitando alcançar um adequado diâmetro e elevadas concentrações de estradiol tornando-se responsivo a indução do pico pré-ovulatório de LH e a ovulação (ROBERSON et al., 1989; CARTER et al., 2008).

Uma estratégia que pode ser utilizada em animais que apresentam limitação na pulsatilidade de LH devido à alta concentração de P4 pré-ovulatórias é a aplicação da eCG (DIAS et al., 2009; PERES et al., 2009). Esta glicoproteína tem impacto positivo no desenvolvimento do folículo dominante, aumento no tamanho do folículo ovulatório, melhora na taxa de ovulação e conseqüentemente na concentração de P4 do CL no diestro subsequente (GARCIA-ISPIERTO et al., 2012). Neste estudo observou-se que a administração da eCG na remoção do dispositivo intravaginal de P4 em fêmeas com alta concentração circulante de P4 no momento da sincronização da ovulação foi capaz de equiparar o diâmetro do folículo no D10 ($P>0,05$), diâmetro do folículo pré-ovulatório ($P>0,05$) e a área de vascularização da parede do folículo pré-ovulatório; ($P>0,05$) dessas vacas com as que apresentavam baixa concentração circulante de P4 (Tabela 1 e Figura 5). Esses resultados estão de acordo com Dias et al. (2009) e Peres et al. (2009), os quais relataram que a aplicação de eCG promove um estímulo na liberação de gonadotrofinas e assim pode fornecer um suporte gonadotrófico adequado para o desenvolvimento do folículo ovulatório. Desta forma, a administração de eCG apresenta-se como uma estratégia para atenuar o impacto negativo das altas concentrações circulantes de P4 no momento da sincronização da ovulação em protocolos de IATF.

Sá Filho et al. (2010b) estudaram a influência da presença ou ausência do CL no início do protocolo de IATF a base de Norgestomet e VE em novilhas Nelore e que receberam ou não 400UI de eCG no momento da sincronização da ovulação. Esses autores verificaram efeito positivo do tratamento com eCG em aumentar o diâmetro do folículo dominante no dia 8 e 10 do protocolo, na taxa de crescimento folicular e taxa de ovulação de novilhas e semelhantemente aos resultados encontrados neste trabalho as fêmeas que tinham CL e não receberam eCG no momento da remoção do dispositivo de P4 apresentaram menor diâmetro do folículo ovulatório no dia 10 ($9,4\pm 0,3$ x $10,6\pm 0,3$ mm) e reduzida taxa de crescimento folicular ($0,68\pm 0,1$ x $1,25\pm 0,1$ mm/dia) em comparação com as fêmeas que apresentavam CL no início do protocolo e que receberam eCG no momento da remoção do dispositivo de P4. Além disso, os autores

observaram que as novilhas, que não tinham CL no início do protocolo e que receberam eCG apresentaram maior diâmetro do folículo ovulatório no dia 10 do protocolo ($10,8\pm 0,4 \times 9,6\pm 0,5\text{mm}$) e taxa de crescimento folicular ($0,86\pm 0,2 \times 0,53\pm 0,1\text{mm/dia}$) em comparação as fêmeas sem CL no início do protocolo e que não receberam eCG. Segundo Rensis e Lópes-Gatius (2014), esse efeito positivo desta glicoproteína pode ser atribuído ao incremento na esteroidogênese nas células da teca e da granulosa do folículo dominante e ovulatório proporcionando melhor crescimento folicular.

Contrariamente aos resultados deste estudo, Souza et al. (2009) estudaram a dinâmica folicular em vacas holandesas submetidas a um protocolo de sincronização a base de P4+BE com aplicação ou não de eCG no momento da retirada dos dispositivo intravaginal de P4 e não verificaram diferença significativa nas características do folículo ovulatório (sem eCG: $14,3\pm 0,5\text{mm}$ e com eCG: $13,6\pm 0,4\text{mm}$) entre as fêmeas que receberam ou não a gonadotrofina, entretanto, estes autores não levaram em consideração as concentrações circulantes de P4 no momento da sincronização da ovulação. Ferreira et al. (2013) desenvolveram um experimento para avaliar o efeito da eCG nos parâmetros foliculares e luteais de vacas leiteiras de alta produção e também não observaram efeito no diâmetro do folículo ovulatório para as fêmeas tratadas com eCG ($15,4\pm 0,6\text{mm}$) ou não ($14,9\pm 0,7\text{mm}$) em um protocolo de sincronização para IATF. Para eles, o efeito da eCG foi evidenciado apenas em fêmeas com baixo escore de condição corporal e no período de anestro pós-parto. De acordo com Shephard (2013), os animais nesta condição fisiológica apresentam insuficiente suporte de LH, um inadequado crescimento do folículo dominante e subsequente falha na ovulação ou formação de um CL com ineficiente produção de P4. Assim o tratamento com eCG pode aumentar o suporte de gonadotrofinas para o folículo, melhorando o desenvolvimento folicular e a probabilidade de ovulação (PRATA et al., 2017).

Apesar de existirem estudos relacionando a dinâmica folicular e o fluxo sanguíneo do folículo (LUTTENAU et al., 2011; GINTHER, 2014; TARSO et al., 2016) e outros investigando o efeito de diferentes concentrações circulantes de P4 sobre os parâmetros foliculares e luteais (PFEIFER et al., 2009; CIPRIANO et al., 2011; CARVALHO et al., 2016) em fêmeas submetidas a um protocolo de IATF, ainda há uma escassez de trabalhos que caracterizem a vascularização folicular e luteal em

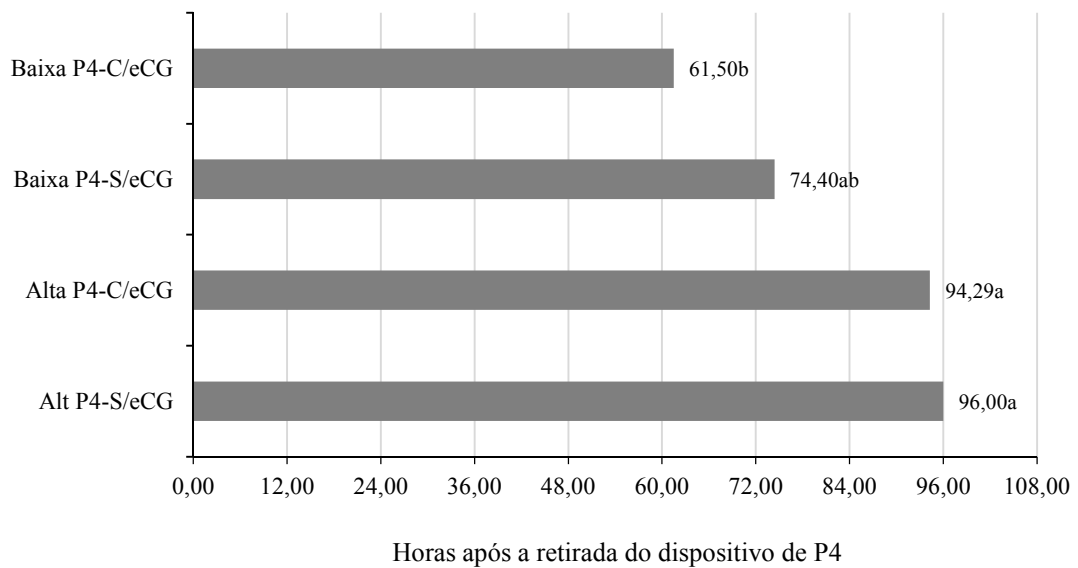
animais com diferentes cenários hormonais e com administração ou não de eCG em um protocolo de sincronização da ovulação.

De acordo com Acosta et al. (2003), a área de vascularização da parede do folículo é um indicador da predição de maturidade folicular e a proximidade da ovulação. Corroborando Acosta e Miyamoto (2004) afirmaram que um adequado fluxo sanguíneo na parede do folículo próximo ao momento da ovulação é essencial para promover um suporte sanguíneo as células foliculares de gonadotrofinas, nutrientes e substratos hormonais necessários para a maturação e a ovulação do folículo

Nesta pesquisa a área de vascularização do folículo pré-ovulatório dos animais com alta concentração de P4 no momento da sincronização da ovulação e que foram tratadas com eCG no dia da remoção do dispositivo de P4 foi semelhante aos das fêmeas com baixa concentração circulante de P4 que receberam ou não eCG. Os resultados encontrados neste trabalho para a área de vascularização do folículo ovulatório corroboram com a literatura que descreve que no período pré-ovulatório juntamente com o aumento do diâmetro do folículo ovulatório ocorre uma elevação no fluxo sanguíneo folicular o que resulta em um acréscimo significativo da área de vascularização do folículo (ACOSTA et al., 2003; SIDDIQUI et al., 2009; TARSO et al., 2016). Neste estudo foi observado que a aplicação da eCG promoveu melhora no desenvolvimento e vascularização do folículo nas fêmeas que apresentavam alta concentração circulante de P4 no início do protocolo, amenizando o impacto negativo destas no momento da sincronização da ovulação. Este aumento pode ser atribuído a esta gonadotrofina agir nas células da teca e da granulosa do folículo e pela ativação de moléculas angiogênicas e vasodilatadoras promovendo incremento no fluxo sanguíneo (HOMNENS et al., 2009).

Em relação ao momento da ovulação, as fêmeas que apresentavam alta concentração circulante de P4, demonstraram um maior intervalo entre a retirada do dispositivo intravaginal e a ovulação, em comparação as fêmeas com baixa concentração ($P < 0,05$). Além disso, observou-se que as vacas que apresentavam baixa concentração circulante de P4 e que foram tratadas com eCG ovularam mais precocemente do que as vacas com baixa concentração de P4 no momento da sincronização da ovulação e que não foram tratadas com eCG ($P = 0,03$; Tabela 1 e Figura 6).

Figura 6 - Momento da ovulação (h) em relação à retirada do dispositivo intravaginal deprogesterona nos diferentes grupos experimentais.



Grupo Alta P4-S/eCG: não aplicação de PGF2 α no D0 e sem administração de eCG no dia 8 do protocolo de sincronização; Grupo Alta P4-C/eCG: não aplicação de PGF2 α no D0 e com administração de eCG no dia 8 do protocolo; Grupo Baixa P4-S/eCG: aplicação de PGF2 α no D0 e sem administração de eCG no dia 8 do protocolo de sincronização; Grupo Baixa P4-C/eCG: aplicação de PGF2 α no D0 e com administração de eCG no dia 8 do protocolo de sincronização.

Uma reduzida concentração circulante de P4 no momento da retirada do dispositivo intravaginal de P4 está associada ao aumento na frequência de pulsos de LH que estimula o crescimento do folículo dominante e a secreção de estradiol, este cenário hormonal possibilita que este folículo alcance maturidade folicular e a capacidade ovulatória, e assim o momento da ovulação ocorre mais precocemente (DIAS et al., 2009; PERES et al., 2009). De forma semelhante a este estudo, Sales et al. (2015) avaliaram o efeito da concentração de P4 durante o protocolo de sincronização da ovulação em um protocolo de IATF em vacas Nelore e verificaram que as fêmeas com baixa concentração de P4 ovularam mais precocemente ($68,4 \pm 2,3$ h) em comparação as vacas com alta concentração de P4 ($73,7 \pm 2,9$ h). Isto ocorre por que os animais com baixa concentração circulante de P4 apresentam elevadas concentrações de LH durante o crescimento do folículo dominante, o que leva a indução prematura dos receptores de LH e competência ovulatória nestas fêmeas (PFEIFER et al., 2009).

No entanto, Carvalho et al. (2008) não observaram diferença no intervalo entre a remoção do dispositivo intravaginal de P4 e o momento da ovulação nas novilhas *Bos taurus indicus* que receberam ou não PGF2 α no início do protocolo e as fêmeas com baixa concentração circulante de P4 (73,9 \pm 0,9h) apresentaram semelhante intervalo entre a remoção do dispositivo intravaginal de P4 e o momento da ovulação em comparação com as fêmeas com alta concentração circulante de P4 no momento da sincronização da ovulação (76,2 \pm 1,3h).

As vacas que não foram tratadas com PGF2 α no início do protocolo de sincronização apresentaram maiores concentrações circulantes de P4 no D8 (P=0,001; Tabela 1), em média, neste momento, esses animais apresentaram uma concentração sérica de P4 de 7,76ng/mL, ressalta-se que a origem desta alta concentração advém de uma fonte endógena (CL) e exógena (dispositivo intravaginal) de P4. As vacas que foram tratadas com PGF2 α no início do protocolo de sincronização apresentaram menores concentrações circulantes de P4 no D8 (P=0,001; Tabela 1, Figura 5), em média, neste momento, esses animais apresentaram uma concentração sérica de P4 de 1,64ng/mL, e esta concentração provém de apenas uma fonte exógena (dispositivo intravaginal) de P4.

Macmillan et al. (1991a) estudaram o perfil hormonal em novilhas *Bos taurus taurus* ovariectomizadas tratadas por 12 dias com um dispositivo intravaginal contendo 1,9g de P4 e observaram que a concentração sanguínea média de P4 neste período foi de 5,6ng/mL. Segundo Rahe et al. (1980) baixas pulsatilidade de LH podem ser encontradas quando as concentrações plasmática de progesterona estão elevadas, entre 5 a 8ng/mL. Sendo assim, os altos níveis circulantes de P4 no momento da sincronização da ovulação observadas nos animais do grupo Alta-P4 estão próximos aos valores encontrados para vacas gestantes de 10,45ng/mL (RODRIGUES et al., 2016b), e este cenário hormonal inviabiliza a maturação folicular e conseqüente ovulação.

Quando a fêmea se encontra em um ambiente hormonal com elevadas concentrações circulantes de P4 pré-ovulatórias ocorre um feedback negativo na secreção de GnRH pelo hipotálamo e diminuição na pulsatilidade de LH, sendo esta condição determinante para o desenvolvimento de folículos de menores diâmetros (CIPRIANO et al., 2011; CARVALHO et al., 2016).

Características morfofuncionais do corpo lúteo

Neste trabalho foi verificado que no protocolo de sincronização seis vacas não ovularam, pertencentes aos seguintes grupos: Alta P4-S/eCG (2), Alta P4-C/eCG (2) e Baixa P4-S/eCG (2), portanto não apresentaram corpo lúteo, sendo assim excluídas desta análise estatística. As fêmeas que apresentavam alta concentração circulante de P4 no momento da sincronização da ovulação e que não receberam eCG apresentaram menor diâmetro ($P=0,03$), volume ($P=0,01$) e área de vascularização do CL no diestro subsequente ao protocolo ($P=0,02$) em comparação as vacas com baixa concentração de P4 que receberam ou não eCG, conforme Tabela 2 e Figura 7. Os níveis circulantes de P4 pré-ovulatórios têm sido relatados como importante fator que interfere na eficiência dos protocolos de sincronização, no desenvolvimento do folículo dominante e consequentemente no diâmetro e função do CL no diestro subsequente (SOUZA et al., 2009; MARTINS et al., 2014; SALES et al., 2015).

Resultados semelhantes aos desta pesquisa foram encontrados por Pfeifer et al. (2009), os quais avaliaram o efeito da aplicação ou não $PGF2\alpha$ em fêmeas de corte *Bos taurus taurus* no início do protocolo de sincronização e observaram que as vacas com baixa concentração de P4 no momento da sincronização da ovulação tiveram maior diâmetro ($24,7\pm 0,69\text{mm}$) e a produção de P4 ($4,0\pm 0,3\text{ng/mL}$) em comparação as fêmeas com alta concentração circulante de P4, $22,2\pm 0,76\text{mm}$ e $3,1\pm 0,2\text{ng/mL}$, respectivamente. Carvalho et al. (2008), estudaram a dinâmica folicular em fêmeas *Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* e seus mestiços e verificaram diferença significativa nos animais com baixa concentração de P4 em comparação as fêmeas com alta concentração de P4 para o diâmetro do CL ($18,3\pm 0,6$ x $16,4\pm 0,8\text{mm}$, $P<0,05$) no entanto, não observaram diferença na produção de P4 ($4,5\pm 0,4$ x $4,6\pm 1,0$ ng/mL, $P=0,70$) do CL no dia 22 do protocolo de sincronização da ovulação.

O desenvolvimento de um CL com condições de manter a prenhez depende de um folículo com adequado número de células da granulosa, da presença de receptores de LH nas células da teca e da granulosa do folículo e posterior capacidade de sintetizar adequadas quantidade de P4 depois da luteinização (PERRY et al., 2005; VASCONCELOS et al., 2013). De acordo com Luttgenu et al. (2011) baixas concentrações de P4 no momento da sincronização da ovulação favorecem o

crescimento folicular e possivelmente folículos com maiores diâmetros desencadeiam a formação de um CL no diestro subsequente de maior tamanho e produção de P4. Uma adequada concentração de P4 durante o diestro é fundamental para o desenvolvimento embrionário, produção de interferon-tau e estabelecimento e manutenção da prenhez em vacas (MANN e LAMMING, 2001).

Tabela 2 - Médias e Desvios-padrão dos parâmetros morfofuncionais do corpo lúteo avaliados por modo B (mm e cm²) e Doppler colorido (cm² e %) e as concentrações séricas de progesterona (ng/mL) no dia 24 do protocolo de sincronização nos diferentes grupos experimentais.

Variáveis	Grupos Experimentais				P-valor	Geral (n=20)
	Alta P4-S/eCG (n=4)	Alta P4-C/eCG (n=5)	Baixa P4-S/eCG (n=4)	Baixa P4-C/eCG (n=7)		
DCL (mm)	17,66±1,89a	19,28±1,90ab	23,25±4,46b	22,57±4,13b	0,03	20,78±3,91
ACL (cm ²)	2,54±0,31	2,54±0,70	3,68±1,04	3,49±1,29	0,09	3,07±1,01
VCL (cm ³)	2,78±0,91a	3,35±1,16ab	5,22±2,12b	5,94±2,27b	0,01	4,38±2,12
AVASCL (cm ²)	0,82±0,29a	1,05±0,37ab	1,21±0,27b	1,54±0,39b	0,02	1,14±0,39
%PVASCL (%)	26,20±13,75	33,17±14,02	42,00±23,31	26,86±5,90	0,32	31,18±14,35
P4D24 (ng/mL)	4,92±3,34	9,30±7,74	8,97±2,24	13,01±3,88	0,08	9,42±5,53

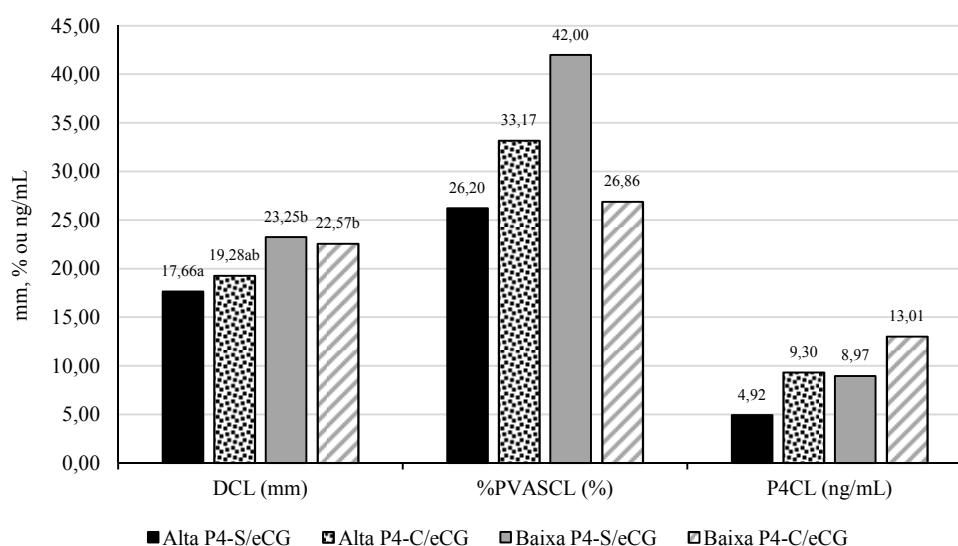
^{a, b} Médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si, P<0,05. ANOVA, teste Tukey.

Grupo Alta P4-S/eCG: não aplicação de PGF2 α no D0 e sem administração de eCG no dia 8 do protocolo de sincronização; Grupo Alta P4-C/eCG: não aplicação de PGF2 α no D0 e com administração de eCG no dia 8 do protocolo; Grupo Baixa P4-S/eCG: aplicação de PGF2 α no D0 e sem administração de eCG no dia 8 do protocolo de sincronização; Grupo Baixa P4-C/eCG: aplicação de PGF2 α no D0 e com administração de eCG no dia 8 do protocolo de sincronização; DCL: Diâmetro do corpo lúteo. ACL: Área do corpo lúteo. VCL: Volume do corpo lúteo. AVASCL: Área de vascularização do corpo lúteo. %PVASCL: Percentual de vascularização do corpo lúteo; P4D24: Concentração de progesterona do corpo lúteo.

Em relação a administração da eCG e as características morfofuncionais do CL subsequente ao protocolo de sincronização, os resultados deste estudo demonstraram que nas fêmeas com alta concentração circulante de P4 no momento da sincronização da ovulação e que receberam eCG, ocorreu o desenvolvimento de um corpo lúteo com diâmetro (19,28±1,90mm; P=0,03) semelhante em comparação as fêmeas com baixa concentração circulante de P4 e que receberam ou não eCG (Baixa P4-S/eCG: 23,25±4,46mm e Baixa P4-C/eCG: 22,57±4,13mm) no momento da sincronização da ovulação, conforme Tabela 1 e Figura 6. Além disso, uma baixa concentração circulante de P4 no início do protocolo de sincronização associada ou não ao tratamento com eCG

produziu um CL subsequente ao protocolo com maior volume (Baixa P4-S/eCG: $5,22 \pm 2,12$ e Baixa P4-C/eCG: $5,94 \pm 2,27 \text{cm}^2$; $P=0,01$), quando comparado ao volume luteínico dos animais que apresentavam alta concentração circulante de P4 e que não receberam eCG ($3,35 \pm 1,16 \text{cm}^2$; Tabela 1, Figura 7).

Figura 7 - Diâmetro (mm) e percentual da área de vascularização do corpo lúteo (%), e concentração sérica de progesterona (ng/mL) no dia 24 do protocolo de sincronização nos diferentes grupos experimentais.



Grupo Alta P4-S/eCG: não aplicação de $\text{PGF2}\alpha$ no D0 e sem administração de eCG no dia 8 do protocolo de sincronização; Grupo Alta P4-C/eCG: não aplicação de $\text{PGF2}\alpha$ no D0 e com administração de eCG no dia 8 do protocolo; Grupo Baixa P4-S/eCG: aplicação de $\text{PGF2}\alpha$ no D0 e sem administração de eCG no dia 8 do protocolo de sincronização; Grupo Baixa P4-C/eCG: aplicação de $\text{PGF2}\alpha$ no D0 e com administração de eCG no dia 8 do protocolo de sincronização; DCL: Diâmetro do corpo lúteo; %PVASCL: Percentual de vascularização do corpo lúteo; P4D24: Concentração de progesterona do corpo lúteo subsequente ao protocolo.

Sá Filho et al. (2010b) estudaram o efeito da eCG em novilhas Nelore com a presença ou ausência de CL no início do protocolo hormonal para IATF. Estes autores verificaram que as fêmeas que receberam eCG apresentaram maior diâmetro do CL (sem eCG: $13,8 \pm 0,3 \text{mm}$ e com eCG: $15,5 \pm 0,3 \text{mm}$) no diestro subsequente e produção de P4 (sem eCG: $3,6 \pm 0,7$ e com eCG: $6,6 \pm 1,0 \text{mm}$) no 15 do protocolo de sincronização em comparação as que não receberam eCG. Além disso, os mesmos observaram que o diâmetro do CL no diestro subsequente e a concentração circulante de P4 no diestro

foram maiores em fêmeas com CL e que foram tratadas com eCG ($15,8\pm 0,4\text{mm}$) em comparação aos animais que tinham CL e que não receberam eCG ($14,1\pm 0,3\text{mm}$).

No presente estudo, os CLs do diestro subsequente das vacas com alta concentração de P4 no momento da indução da ovulação e que não foram tratadas com eCG produziram $4,92\pm 3,34\text{ng/mL}$ de P4, já os CLs do diestro subsequente das vacas com baixa concentração de P4 no momento da indução da ovulação e que foram tratadas com esta glicoproteína produziram $13,01\pm 3,88\text{ng}$ de P4/mL, apesar do CL do diestro subsequente das vacas com baixa concentração de P4 no momento da sincronização da ovulação e tratadas com eCG produzir 2,65 vezes mais P4 que as vacas com alta concentração de P4 no momento da sincronização da ovulação e que não receberam este tratamento, não se observou diferença estatística entre esses grupos ($P=0,08$).

Corroborando com esses resultados, Ferreira et al. (2013) verificaram que o tratamento com eCG no momento da retirada do dispositivo de P4 provocou uma tendência em aumentar o volume (controle: $7,4\pm 0,5\text{cm}^3$ e eCG: $9,8\pm 0,3\text{cm}^3$) e as concentrações plasmáticas de P4 (controle: $3,7\pm 0,6\text{ng/mL}$ e eCG: $4,7\pm 0,5\text{ng/mL}$) após 12 dias da ovulação em vacas holandesas de alta produção de leite sincronizadas a um protocolo de IATF. De forma semelhante, Souza et al. (2009) trabalharam também com vacas holandesas e observaram uma tendência de aumento no volume do CL (sem eCG: $5,6\pm 0,4\text{cm}^3$ e com eCG: $6,7\pm 0,4\text{cm}^3$) e na concentração de P4 (sem eCG: $3,5\pm 0,4\text{ng/mL}$ e com eCG: $5,8\pm 0,7\text{ng/mL}$) 12 dias após a ovulação.

Pulley et al. (2013) realizaram um estudo sobre o efeito da eCG na dinâmica folicular e luteal em vacas holandesas submetidas ao protocolo ao Ovsynch e também observaram aumento no volume luteal ($8,3\pm 0,5\text{cm}^3$) em vacas que receberam este tratamento em comparação as que não receberam ($7,1\pm 0,5\text{cm}^3$), contudo, semelhante a este trabalho não verificaram efeito desta glicoproteína no acréscimo das concentrações de P4 (controle: $5,2\pm 0,5\text{ng/mL}$ e com eCG: $5,4\pm 0,6\text{ng/mL}$) no dia 9 após o tratamento. Para estes autores a eCG falhou em induzir acréscimo nas concentrações de P4 pela adequada nutrição dos animais. Keynon et al. (2012) também relataram que a aplicação deste fármaco no momento da retirada do dispositivo de P4 promoveu um aumento no volume total (controle: $6,8\pm 0,5\text{cm}^3$ e com eCG: $9,1\pm 0,6\text{cm}^3$), no entanto, falhou em

elevar as concentrações de P4 (controle: $4,2 \pm 0,3$ ng/mL e com eCG: $5,6 \pm 0,2$ ng/mL) no dia 14 do protocolo de sincronização em vacas holandesas.

Esses resultados podem ser atribuídos a influência da eCG em induzir alterações ao nível tecidual, celular e molecular no CL, as quais estão relacionadas com a capacidade funcional e a síntese de P4 (MOURA et al., 2015). O maior volume do CL em resposta ao tratamento com eCG no grupo alta concentração de P4 podem ser explicados pelo efeito da gonadotrofina na população de células da teca e da granulosa, induzindo hiperplasia das pequenas e hipertrofia das grandes células luteais, além de promover aumento no volume de mitocôndrias destas células (FÁTIMA et al., 2012). Ao nível molecular esta glicoproteína promove regulação do metabolismo lipídico e alteração na expressão de proteínas envolvidas na esteroidogênese, como a STAR, elevando a produção de P4 (RIGIOLIO et al., 2013; SOUZA et al., 2016).

Sabe-se que o fluxo sanguíneo aumenta paralelamente com a concentração circulante de P4 e este determina o *status* funcional do CL (ACOSTA et al., 2003; MATSUI e MYAMOTO, 2009). Nesta pesquisa, as fêmeas com alta concentração circulante de P4 e tratadas com eCG no momento da sincronização da ovulação apresentaram área de vascularização do CL subsequente ao protocolo ($1,05 \pm 0,37$ cm³) semelhante às vacas com baixa concentração de P4 ($1,21 \pm 0,27$ e $1,54 \pm 0,39$ cm³; $P > 0,05$; Tabela 1, Figura 6). Este resultado pode ser explicado devido ao efeito luteotrófico da eCG em promover aumento no diâmetro e fluxo sanguíneo do CL (O'HARA et al., 2014). Segundo Moura et al. (2015), a eCG promove aumento na densidade vascular, que é essencial para proporcionar melhor função luteal ao CL. De acordo com Fátima et al. (2012), esta glicoproteína pode modular a síntese luteal de citocinas, fatores de crescimento como o VEGF e precursores hormonais relacionados com a angiogênese influenciando no suprimento sanguíneo para a produção de P4. O aumento no fluxo sanguíneo ovariano promovido pela administração de eCG no grupo alta concentração de P4 pode ser devido a ativação de moléculas vasodilatadoras e angiogênicas em resposta a esta gonadotrofina (HONMES et al., 2009).

A utilização da eCG corresponde a aproximadamente 50% dos custos de aquisição dos fármacos usados nos protocolos de sincronização para IATF no Brasil. Atualmente, verifica-se uma aplicação indiscriminada desta glicoproteína como suporte gonadotrófico. Neste experimento o tratamento com eCG nas vacas com baixas

concentrações de P4 no momento da ovulação da sincronização não impactou na dinâmica e função folicular e tão pouco na melhora das características morfofuncionais do CL, evidenciando que o tratamento com eCG nos animais nesta condição fisiológica demonstra-se desnecessário.

CONCLUSÕES

Diante das condições que foram realizadas este experimento pode se concluir que o tratamento com eCG nas vacas com baixas concentrações de P4 no momento da sincronização ovulação não impactou a dinâmica e função folicular e tão pouco melhorou as características morfofuncionais do CL desses animais. Observou-se que um ambiente endócrino com alta concentração circulante de progesterona no momento da sincronização da ovulação no protocolo de IATF impactou negativamente o diâmetro e a vascularização folicular e luteínica. A administração da eCG no momento da remoção do dispositivo de P4 pode ser utilizada como uma estratégia para favorecer uma melhor resposta folicular e luteal em fêmeas que apresentam elevados níveis circulantes de progesterona no momento da sincronização da ovulação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, T. J. Studies of follicular vascularity associated with follicle selection and ovulation in cattle. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, n. 1, p. 39-44, 2007.
- ACOSTA, T. J.; HAYASHI, K. G.; MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Changes in follicular vascularity during the first follicular wave in lactating cows. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n. 2, p. 273-280, 2005.
- ACOSTA T. J.; MIYAMOTO A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 127-140, 2004.
- ACOSTA T. J.; HAYASHIK. G.; OHTANI M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows **Reproduction**, v. 125, p.759-767, 2003.
- ACOSTA, T.; YOSHIZAWA, N.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F2 α injection in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 3, p. 651-658, 2002.
- ADAMS, G. P.; JAISWAL, R.; SINGH, J. MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 69, p. 72-80, 2008.
- ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Bovine model for study ovarian follicle dynamics in humans. **Theriogenology**, v. 43, p. 113-120, 1995.
- ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; KASTELIC, J. P.; KO, J. C. H.; GINTHER, O. J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular wave in heifers. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 94, p. 177-188, 1992.
- ALLEN W. R.; SKIDMORE J. A.; STEWART F.; ANTEZAK D. F. Effects of fetal genotype and uterin environment on placental development in equids. **Journal Reproduction Fertility**, v. 97, p. 55-60, 1993.
- ALLEN, W. R.; MOOR, R. M. The origin of the equine endometrial cups. I. Production of PMSG by fetal trophoblast cells. **Journal Reproduction Fertility**, v. 29, p. 313, 1972.
- AMBROSE, J. D.; KASTELIC, J. P.; RAJAMAHENDRAN, R.; AALI, M.; DINN, N. Progesterone (CIDR)-based timed AI protocols using GnRH, porcine LH or estradiol cypionate for dairy heifers: Ovarian and endocrine responses and pregnancy rates. **Theriogenology**, v. 64, p. 1457-1474, 2005.
- ANDRADE, B. H. A. **Comparação entre diferentes indutores da ovulação e do momento da inseminação artificial sobre a taxa de concepção de vacas inseminadas em tempo fixo.** 2012a. 82p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia,

Salvador.

ANDRADE, B. H. A.; FERRAZ, P. A.; RODRIGUES, A. S.; LOIOLA, M. V. G.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A. L. Eficiência do cipionato de estradiol e do benzoato de estradiol em protocolos de indução da ovulação sobre a dinâmica ovariana e taxa de concepção de fêmeas nelore inseminadas em diferentes momentos. **Archives of Veterinary Science**, v. 17, p. 70-82, 2012b.

ARASHIRO, E. K. N.; PALHAO, M. P.; SANTOS, J. R. L.; FONTES, R. C.; SIQUEIRA, L. G. B.; HENRY, M.; VIANA, J. H. M. Three-dimensional modeling of color Doppler images: a new approach to study follicular vascularization in cattle. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 4, p. 662-669, 2013.

ARASHIRO, E. K. N. **Adequação de metodologias para o estudo in vitro da vascularização e da caracterização do fluido follicular e células da granulosa**. 2012. 65f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais.

ARÊAS, V. S. **Uso de Doppler colorido na avaliação funcional do corpo lúteo em bovinos**. 2012. 78 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo.

AYRES, H.; MINGOTI, G.Z. Angiogênese, vascularização e uso do ultrassom Doppler colorido na avaliação de estruturas ovarianas. **Revista Brasileira de reprodução animal**, v. 36, p. 174-180, 2012.

AYRES, H.; PENTEADO, L.; TORRES-JUNIOR, J. R. S.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Taxa de concepção de vacas Nelore lactantes sincronizadas com implante auricular de progestágeno associado ao benzoato ou cipionato de estradiol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34 (Suplemento 1), p. 410, 2006.

BARREIROS, T. R. R.; BLASCHI, W.; SANTOS, G. M. G.; MOROTTI, F.; ANDRADE, E. R.; BARUSELLI, P. S.; SENEDA, M. M. Dynamics of follicular growth and progesterone concentration in cyclic and anestrus suckling Nelore cows (*Bos indicus*) treated with progesterone, equine chorionic gonadotropin, or temporary calf removal. **Theriogenology**, v. 81, p. 651-656, 2014.

BARROS, C. M.; ERENO, R. L. Avanços em tratamentos hormonais para a inseminação artificial com tempo fixo (IATF) em bovinos de corte. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 23-34, 2004.

BARROS, C. M.; MOREIRA, M. B. P.; FIGUEIREDO, R. A.; TEIXEIRA, A. B.; TRINCA, L. A. Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using GnRH, PGF2 α and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 53, p. 1121-1134, 2000.

BARUSELLI, P. S.; FERREIRA R. M.; COLLI M. H. A.; ELLIFF F. M.; SÁ FILHO M. F.; VIEIRA L.; FREITAS, B. G. Timed artificial insemination: current challenges and recent advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. **Animal Reproduction**, v.14, n.3, p.558-571, 2017.

BARUSELLI, P. S.; SALES, J. N. S.; SALA, R. V.; VIEIRA, L. M.; SÁ FILHO, M. F.

History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 139-152, 2012.

BARUSELLI, P. S.; JACOMINI J. O.; SALES, J. N. S.; CREPALDI, G. A. Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2., 2008, Londrina. **Anais...** Londrina: Biotecnologia da Reprodução em Bovinos, 2008.

BARUSELLI, P. S.; BÓ G. A.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O. Inseminação artificial em tempo fixo em bovino de corte. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2., 2004, Londrina. **Anais...** Londrina: Biotecnologia da Reprodução em Bovinos, 2004a.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BÓ, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 479-486, 2004b.

BASTOS, M. R., MATTOS, M. C. C.; MESCHIATTI, M. A. P.; SURJUS, R. S.; GUARDIEIRO, M. M.; MOURÃO, G. B.; PIRES, A. V.; PEDROSO, A. M.; SANTOS, F. A. P.; SARTORI, R. Ovarian function and circulating hormones in nonlactating Nelore versus Holstein cows. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, p. 776, 2010.

BERISHA, B.; SCHAMS, D. Ovarian function in ruminants Domestic. **Animal Endocrinology**, v. 29, 305-317, 2005.

BERTAN, C. M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E. H.; TRALDI, A. S. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise - Revisão de Literatura. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 6, p. 824-840, 2006.

BICALHO, R. C.; GALVÃO, K. N.; GUARD, C. L.; SANTOS, J. E. P. Optimizing the accuracy of detecting a functional corpus luteum in dairy cows. **Theriogenology**, v. 70, p. 199-207, 2008.

BINELLI, M.; PUGLIESI, V. V.; HOECK, M.; SPONCHIADO, M.; RAMOS, R. S.; OLIVEIRA, M. L.; FRANÇA, M. R.; ALEXANDRI, F. L.D.; MESQUITA, F. S.; MEMBRIVE, C. M. B. The role of proestrus on fertility and oostovulatory uterine function in the cow. **Animal Reproduction**, v. 11, n. 3, p. 246-253, 2014.

BINELLI, M.; PORTELA, V. M.; MURPHY, B. D. Dinâmica ovariana e eficiência reprodutiva: estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 6, p. 134-139, 2009.

BISINOTTO, R. S.; RIBEIRO, E. S.; LIMA F. S.; MARTINEZ, N.; GRECO, L. F.; BARBOSAM L.; BUENO, P. P.; SCAGION, L. F. S.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. P. Targetes progesterone supplementation improves fertility in lactating dairy cows without a corpus luteum at the initiation of the timed artificial insemination protocol. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 224-225, 2013.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MAPLETOFT, R. J.; Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. **Animal Reproduction**, v. 10, p. 137-142, 2013.

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

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 39, p. 193-204, 1995.

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

BODENSTEINER, K. J.; KOT, K.; WILTBANK M. C.; GINTHER O. J. Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v. 45, p. 1115-1126, 1996.

BOLLWEIN, H.; LUTTGENAU, J.; HERZOG, K.; Bovine luteal blood flow: basic mechanism and clinical relevance. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, p. 71-79, 2013.

BOLLWEIN, H.; BAUMGARTNER, U.; STOLLA, R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in cows during pregnancy. **Theriogenology**, v. 57, p. 2053-2061, 2002.

BOLLWEIN, H.; MEYER, H. H. D.; MAIERL, J.; WEBER, F.; BAUMGARTNER, U.; STOLLA, R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in cows during the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 53, p. 1541-1552, 2000.

BORGES, A. M.; TORRES, C. A. A.; RUAS, J. R. M.; ROCHA JUNIOR, V. R.; CARVALHO, G. R. Desenvolvimento luteal e concentrações plasmáticas de progesterone em vacas das raças Gir e Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 276-283, 2003.

BORGES, A. M.; TORRES, C. A. A.; RUAS, J. R. M.; ROCHA JUNIOR, V. R.; CARVALHO, G. R. Dinâmica folicular ovariana em novilhas mestiças holandês-zebu. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n. 5, p. 1-3, 2001.

BRAGANÇA, J. F. M. **Estratégias hormonais de Indução/sincronização de estro em novilhas de corte entre 12 e 14 meses de idade**. 2007. 123 f. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. BRASÍLIA/DF.

BURATINI, J.; PRICE, C. A.; VISITINI, J. A.; BÓ, G. A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, v. 54, p. 421-431, 2000.

- CACCIA, M.; BÓ, G. A. Follicle wave emergence following treatment of CIDR-B implanted beef cows with estradiol benzoate and progesterone. **Theriogenology**, v. 49, n. 1, p. 341, 1998.
- CARTER, F.; FORDE N.; DUFFY P.; WADE M.; FAIR T.; CROWE M. A. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. **Reproduction Fertility and Development**, v. 20, p. 368-375, 2008.
- CARVALHO, E. R.; MARTINS, T.; LAMB, G. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Ovulation time in suckled beef cows is anticipated by use of low doses of progesterone and temporary calve removal on fixed timed AI protocol. **Theriogenology**, v. 86, p. 2238-2243, 2016.
- CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, N. A. T.; REIS, E. L.; NICHI, M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus x Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 167-175, 2008.
- CAVALIERI, J.; HEPWORTH, G.; FITZPATRICK, L. A.; SHEPHARD, R. W.; MACMILLAN, K. L. Manipulation and control of the estrous cycle in pasture-based dairy cows. **Theriogenology**, v. 65, p. 45-64, 2006.
- CAVALIERI, J.; RUBIO, J.; KINDER, J. E.; ENTWISTLE, K. W.; FITZPATRICK, L. A. Synchronization of estrus and ovulation and associated endocrine changes in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 47, p. 801-814, 1997.
- CIPRIANO, R. S.; CARVALHO, B. A. MARANGONI, N. R.; NOGUEIRA, G. P. LH and FSH concentration and follicular development in Nellore heifers submitted to fixed-time artificial insemination protocols with different progesterone concentrations. **Animal Reproduction Science**, v. 127, p. 16-22, 2011.
- COLAZO, M. G.; MARTINEZ, M. F.; SMALL, J. A.; KASTELIC, J. P.; BURNLEY, C. A.; WARD, D. R.; MAPLETOFT, R. J. Effect of estradiol valerate on ovarian follicle dynamics and superovulatory response in progestin-treated cattle. **Theriogenology**, v. 63, p. 1454-1468, 2005.
- COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. **Theriogenology**, v. 60, p. 855-865, 2003.
- COLE H. H.; HART G. H. The potency of blood serum of mares in progressive stage of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat. **American Journal Physiology**, v. 83, p. 57-68, 1930.
- COUTINHO, G. T. R. M.; VIANA, J. H. M.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S.; FERREIRA, A. M.; PALHÃO, P. M.; NOGUEIRA, L. A. G. Avaliação ultra-

sonográfica da dinâmica folicular e lútea em vacas da raça Guzerá. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 1089-1096, 2007.

CREPALDI, G. A. **Eficácia de diferentes protocolos de indução da ovulação e de intervalos de inseminação em vacas de corte submetidas à IATF**. 2009. 87f. Tese (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

DADARWAL, D.; MAPLTOFT, R. J.; ADAMS, G. P.; PFEIFER, L. F. M.; CREELMAN, C.; SINGH, J. Effect of progesterone concentration and duration of proestrus on fertility in beef cattle after fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v. 79, p. 859-866, 2013.

DIAS, C. C.; WECHSLER, F. S.; DAY, M. L.; VASCONCELOS, J. L. M. Progesterone concentrations, exogenous equine chorionic gonadotropin and timing of prostaglandin F2 α treatment affect fertility in postpuberal Nelore heifers. **Theriogenology**, v. 72, p. 378-385.2009.

DOROTEU, E. M.; OLIVEIRA, R. A.; PIVATO, I. Avaliação de diferentes doses de eCG na resincronização da ovulação em vacas Nelore lactantes submetidas à IATF. **Revista Brasileira de Produção Animal**, v. 16, n. 2, p. 449-457, 2015.

DRION P. V.; DE ROOVER R.; HOUTAIN J.; MCNAMARA E. M.; REMY B., SULON J. Increase of plasma eCG binding rate after administration of repeated high dose of eCG to cows. **Reproduction Nutrition Development**, v. 41, p. 207-215, 2001.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 203-216, 2003.

FARIN C. E.; MOELLER, C. L.; SAWYER, H. R. Morphometric analysis of cells type in the ovine corpus luteum throughout the estrus cycle. **Biology Reproduction**, v. 35, p. 1299-1308, 1986.

FÁTIMA L. A.; BINELLI M.; BARUSELLI P. S.; BONFIM NETO A. P.; PAPA P.C. Angiogenic and steroidogenic responses of the corpus luteum after superovulatory and stimulatory treatments using eCG and FSH. **Animal Reproduction**, v. 9, n.3, p.273-280, 2012.

FERNANDES, C. A. C.; FIGUEIREDO, A. C. S. Avanços na utilização de prostaglandinas na reprodução de bovinos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 31, n.3, p. 406-414, 2007.

FERNANDES, P.; TEIXEIRA, A. B.; CROCCI, A. J.; BARROS, C. M. Timed artificial insemination in beef cattle using GnRH agonist, PGF2 α and estradiol benzoate (EB). **Theriogenology**, v. 55, p. 1521-1532, 2001.

FERRARA, N.; CHEN H.; DAVIS-SMYTH T.; GERBER H. P.; NGUYEN T. N.; PEERS D., CHISHOLM V., HILLAN K. J.; SCHWALL R. H. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. **Nature Medicine**, v. 3, p. 336-340, 1998.

FERRARA, N.; DAVIS- SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth facto. **Endocrine reviews**, v. 18, n. 1, p. 4-19, 1997.

FERRAZ, P. A.; LOIOLA, M. V. G.; RODRIGUES, A. S.; CHALHOUB, M.; BITTENCOURT, T. C. B. S. C.; RIBEIRO FILHO, A. L.; The effect of the intensity of estrus expression n the follicular diameter and fertility of Nellore cows managed under a FTAI program. **Ciência Animal Brasileira**, v. 18, p. 1-9, 2017.

FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; SALES, J. N. S.; SOUZA, A. H.; RODRIGUES, C. A.; BARUSELLI, P. S. Effect of diferente doses of equine chorionic gonadotropin on follicular and luteal dynamics and P/AI of high-producing Holteins cows. **Animal Reproduction Science**, v. 140, p. 26-33, 2013.

FIELDS M. J.; FIELDS P. A. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. **Theriogenology**, v. 45, p. 1295-1325, 1996.

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

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 135–163, 2003.

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

FRASER, H. M.; LUNN, S. F. Regulation and manipulation of angiogenesis in the primate corpus luteum. **Reproduction**, v. 121, p. 355-362, 2001.

GALINA, C. S.; ORIHUELA, A. The detection of estrus in cattle raised under tropical conditions: What we know and what we need to know? **Hormones and Behavior**, v. 52 p. 32-38, 2007.

GARCIA-ISPIERTO, I.; LÓPEZ-HELGUERA, I.; MARTINS, A.; LÓPEZ-GATIUS, F. Reproductive performace of anoestrous high-producing dairy cows Improved by adding equine Chorionic Gonadotrophin to a progesterone-based oestrous. **Reproduction Domestic Animal**, v. 47, p. 752-758, 2012.

GHETTI, A. M. Caracterização por Doppler colorido do padrão vascular em folículos dominantes pré e pós aspiração e efeito do benzoato de estradiol nos folículos residuais subsequentes. 100f. 2012. **Tese (doutorado)**. Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro.

GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; CARVALHO, N. A. T.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; SOUZA, A. H.; MADUREIRA, E. H.; TRINCA, L. A.; SARTORELLI, E. S.; BARROS, C. M.; CARVALHO, J. B. P.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 852-859, 2008.

GIMENES, L. U.; CARVALHO, N. A. T.; SÁ FILHO, M. F.; SANTIAGO, L. L.; CARVALHO, J. B. P.; MAPLETOFT, R. J.; BARROS, C. M.; BARUSELLI, P. S. Capacidade ovulatória em novilhas Nelore *Bos indicus*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 209, 2005.

GINTHER, O. J. How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. **Theriogenology**, v. 81, p. 112-125, 2014.

GINTHER, O. J.; SILVA, L. A.; ARAUJO, R. R.; BEG, M. A. Temporal associations among pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂alpha, luteal blood flow, and luteolysis in cattle. **Biology of reproduction**, v. 76, p. 506-513, 2007.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; DONADEU, F. X.; KOT, K. Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 638-647, 2001.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1187-1194, 1996.

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 87, p. 223-230, 1989.

GONZÁLEZ, F. H. D. **Introdução à endocrinologia reprodutiva veterinária**. 1.ed., Porto Alegre: UFRGS, p. 1-53, 2002.

HANLON, D. W.; WILLIAMSON, N. B.; WICHTEL, J. J.; STEFFERT, I. J.; CRAIGIE, A. L. Ovulatory responses and plasma luteinizing hormone concentrations in dairy heifers after treatment with exogenous progesterone and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 47, p. 963-975, 1997.

HANSEL W.; ALIA H. W.; DOWD J. P.; YANG X. Control of steroidogenesis in small and large bovine luteal cells. **Australian Journal Biology Science**, v. 1987, p. 40, 331-47, 1987.

HAZZARD, T. M.; STOUFFER, R. L. Angiogenesis in ovarian follicular and luteal development. **Bailliere's Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 14, n. 6, p. 883-900, 2000.

HERZOG, K.; BROCKHAN-LUDEMANN; KASKE, M.; BEINDORFF, N.; PAUL V.; NIEMANN, H.; BOLLWEIN, H. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. **Theriogenology**, v. 73, p. 691-697, 2010.

HERZOG, K.; BOLLWEIN, H. Application of Doppler ultrasonography in cattle reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. s2, p. 51-58, 2007.

HONNENS A.; NIEMANN H.; HERZOG K.; PAUL V., MEYER, H. H. D.,

BOLLWEIN H. Relationships between ovarian blood flow and ovarian response to eCG-treatment of dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 113, p. 1-10, 2009.

HOUGHTON, P. L.; LEMENAGER, R. P.; MOSS, G. E.; HENDRIX, K. S. Prediction of postpartum beef cow body composition using weight to height ratio and visual body condition score. **Jornal Animal Science**, v. 68, p. 1428-1437, 1990.

KASTELIC, J. P.; PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonic morphology of corpora luteal and central luteal cavities during the estrous cycle and early pregnancy in heifers. **Theriogenology**, v. 34, n. 3, 1990.

KENYON A. G.; LOPES JR. G.; MENDONÇA L. G. D.; LIMA J. R., BRUNO R. G. S.; DENICOL A. C.; CHEBEL R. C. Ovarian responses and embryo survival in recipient lactating Holstein cows treated with equine chorionic gonadotropin. **Theriogenology**, v. 77, p. 400-411, 2012.

KOBAYASHI, S.; MIYAMOTO, A.; BERISHA, B.; SCHAM, D. Growth hormone, but not luteinizing hormone, acts with luteal peptides on prostaglandin F2 a and progesterone secretion by bovine corpora lutea in vitro. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v. 63 p. 79-92, 2001.

LAMB, G. C.; DAHLEN, C. R.; LARSON, J. E.; MARQUEZINI, G. STEVENSON, J. S. Control of the estrous cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle: A review. **Journal Animal Science**, v. 88, p. 181-192, 2010.

LONERGAN, P. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. **Theriogenology**, v. 76, p. 1594-1601, 2011.

LONERGAN, P.; O'HARA, L.; FORDE, N. Role of diestrus progesterone on endometrial function and conceptus development in cattle. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 223-227, 2013.

LUCY, M. C.; MCDUGALL, S.; NATION, D. P. The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 495-512, 2004.

LUCY, M. C.; SAVIO, J. D.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3615-3626, 1992.

LUTTGENAU, J.; BEINDORFF, N.; ULBRICH, S. E.; KASTELIC, J. P.; BOLLWEIN, H. Low plasma progesterone concentrations are accompanied by reduced luteal blood flow and increased size of the dominant follicle in dairy cows. **Theriogenology**, v. 76, p. 12-22, 2011.

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

MACMILLAN, K. L., TAUFA, V. K., BARNES, D. R.; DAY A. M. Plasma

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

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

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.

MANN, G. E. Corpus luteum size and plasma progesterone concentration in cows. **Animal reproduction science**, v. 115, n. 1, p. 296-299, 2009. MAPLETOFT R. J., BÓ G. A., BARUSELLI P. S. Control of ovarian function for assisted reproductive technologies in cattle. **Animal Reproduction**, v. 6, n. 1, p. 114-124, 2009.

MARQUES, M. O.; AYRES, H.; REIS, E. L.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Efeito do cipionato e do benzoato de estradiol na taxa de prenhez de vacas Nelore inseminadas em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32 (Suplemento), p. 222, 2004.

MARTINEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; BÓ, G. A.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R. J. Effect of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 86, p. 37-52, 2005.

MARTINEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; ADAMS, G. P.; MAPLETOFT, R. J. The use of a progesterone-releasing device (CIDR-B) or melengestrol acetate with GnRH, LH or estradiol benzoate for fixed-time AI in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 1746-1751, 2002.

MARTINEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; ADAMS, G. P.; JANZEN, E.; McCARTNEY, D. H.; MAPLETOFT, R. J. Estrus synchronization and pregnancy rates in beef cattle given CIDR-B, prostaglandin and estradiol, or GnRH. **Canadian Veterinary Journal**, v. 41, p. 786-790, 2000.

MARTINEZ, M. F.; ADAMS, G. P.; BERGFELT, D. R.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. 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.

MARTINS, T.; PERES, R. F. G.; RODRIGUES, A. D. P.; POHLER, K. G.; PEREIRA, M. H. C.; DAY, M. L.; VASCONCELOS, J. L. M. Effect of progesterone concentrations, follicle diameter, timing of artificial insemination, and ovulatory stimulus on pregnancy rate to synchronized artificial insemination in postpubertal Nelore heifers. **Theriogenology**, v. 81, p. 446-453, 2014.

MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Evaluation of ovarian blood flow by colour Doppler ultrasound: Practical use for reproductive management in the cow. **The Veterinary Journal**, v. 18, p. 232-240, 2009.

MATTIOLI, M.; BARBONI, B.; TURRIANI, M.; GALEATI, G.; ZANNONI, A.; CASTELLANI, G.; BERARDINELLI, P.; SCAPOLO, P. A. Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. **Biology Reproduction**, v. 65, p. 1014-1019, 2001.

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

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

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; SAAHARA, K. Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: Impact of angiogenic and vasoactive factors. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 37, p. 159-169, 2009.

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; WIJAYAGUNAWARDANE, M. P. B.; WATANABE, S.; HAYASHI, M.; YAMAMOTO, D.; MATSUI, M.; ACOSTA, T. J. Blood flow: a key regulatory component of corpus luteum function in the cow. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, n. 2, p. 329-339, 2005.

MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H.; GONÇALVES, D.; FREITAS, V. J.; JUNIOR, E. S. L. Controle do estro e da ovulação em ruminantes. In: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEREDO J. R.; FREITAS V. J. DE F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 33-55.

MOURA, C. E. B.; RIGOGGIO, N. N.; BRAZ, J. K. F. S.; MACHADO, M.; BARUSELLI, P. S.; PAPA, P. C. Microvascularization of Corpus Luteum of Bovine Treated With Equine Chorionic Gonadotropin. **Microscopy Research and Technique**, v. 78, p. 747-753, 2015.

MURPHY, B. D. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 223-230, 2012.

MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine Chorionic Gonadotropin. **Endocrine Reviews**, v. 12, n. 1, p. 27-44, 1991.

NISWENDER, G. D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. **Reproduction**, v. 123, p. 333-339, 2002.

NISWENDER G. D.; JUENGEL J. L.; SILVA P. J.; ROLLYSON M. K.; MCINTUSH E. W. Mechanisms Controlling the Function and Life Span of the Corpus Luteum. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 1, 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.

NÚÑEZ-OLIVEIRA, R.; CATRO, T.; GARCÍA-PINTOS; BÓ, G.; PIAGGIO, J.;

MENCHACA, A. Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol based treatment in postpartum anestrous beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 146, p. 111-146, 2014.

O'HARA, L.; FORDE, N.; DUFFY, P.; RANDI, F.; KELLY, A. K.; VALENZA, A.; O'SHEA, J. D.; RODGERS, R. J.; D'OCCHI, M. J. Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. **Journal Reproduction Fertility**, v. 85, p. 483-487. 1987.

ODDE, K. G. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. **Journal of Animal Science**. v. 68, p. 817-830, 1990.

PANCARCI, S. M.; JORDAN, E. R.; RISCO, C. A.; SCHOUTEN, M. J.; LOPES, F. L.; MOREIRA, F.; THATCHER, W.W. Use of Estradiol Cypionate in a Presynchronized Timed Artificial Insemination Program for Lactating Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 122-131, 2002.

PARKINSON T. J.; TURVEY A.; JENNER L. J. A morphometric analysis of the corpus luteum of the cow during the estrous cycle and early pregnancy. **Theriogenology**, v. 41, p.1115-1126, 1994.

PAPKOFF, H. Chemical and biological properties of the subunits of pregnant mare serum gonadotropin. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 58, p. 397-404, 1974.

PEGORER, M. F.; ERENO, R. L.; SATRAPA, R. A.; PINHEIRO, V. G.; TRINCA, L. A.; BARROS, C. M. Neither plasma progesterone concentrations nor exogenous eCG affects rates of ovulation or pregnancy in fixed-time artificial insemination (FTAI) protocols for puberal Nelore heifers. **Theriogenology**, v. 75, p. 17-23, 2011.

PERES, R. F. G.; CLARO JUNIOR, I.; SÁ FILHO, O. G.; NOGUEIRA, G. P.; VASCONCELOS, J. L. M. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v. 72, p. 681-689, 2009.

PERES-MARIN, C. Formation of corpora lutea and central luteal cavities and their relationship with plasma progesterone levels and other metabolic parameters in dairy cattle. **Reproduction Domestic Animal**, v. 44, p. 384-389, 2009.

PERRY, G. A.; SMITH M. F.; LUCY, M. C.; GREEN J. A.; PARKS T. E.; MACNEIL, M. D.; ROBERTS A. J.; GEARY T. W. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. **PNSA**, v. 102, n. 14, p. 5268–5273, 2005.

PESSOA, G. A.; MARTINI, A. P.; CARLOTTO, G. W.; RODRIGUES, M. C. C.; CLARO JUNIOR, I.; BARUSELLI, P. S.; BRAUNER, C. C.; RUBIN, M. I. B.; CORRÊA, M. N.; LEIVAS, F. G.; SÁ FILHO, M. F. Different doses of equine chorionic gonadotropin on ovarian follicular growth and pregnancy rate of suckled *Bos Taurus* beef cows subjected to timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 85, p.792-799, 2016.

PETER, A. T.; LEVINE, H.; DROST, M.; BERGFELT, D. R. Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian

dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 7, p. 1343-1357, 2009.

PFEIFER, L. F. M.; MAPLETOFT, R. J.; KASTELIC, J. P.; SMALL, J. A.; ADAMS, G. P.; DIONELLO, N. J.; SINGH, J. Effects of low versus physiologic plasma progesterone concentrations on ovarian follicular development and fertility in beef cattle. **Theriogenology**, v. 72, p. 237-1250. 2009.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonography of the bovine ovary. **Theriogenology**, v. 21, p. 495-504. 1984.

PINAFFI, F. L.V.; SANTOS, É. S.; SILVA, M. G.; FILHO, M. M.; MADUREIRA, E H.; SILVA, L. A. Follicle and corpus luteum size and vascularity as predictors of fertility at the time of artificial insemination and embryo transfer in beef cattle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, p. 470-476, 2015.

PRATA, A. B.; PONTES, G. C. S.; MONTEIRO JR, P. L.; DRUM, J. N.; WILTBANK, M. C.; SARTORI, R. Equine chorionic gonadotropin increase fertility of grazing dairy cows that receive fixed-time artificial insemination in the early but not later postpartum period. **Theriogenology**, v. 98, p. 36-40, 2017.

PUGLIESI, G.; REZENDE, R. G.; SILVA, J. C. B.; LOPES, E.; NISHIMURA, T; K.; BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; BINELLI, M. Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.41, n.1, p. 140-150, 2017.

PULLEY S. L.; WALLACE, L. D.; MELLIEON JR. H. I.; STEVENSON J. S. Ovarian characteristics, serum concentrations of progesterone and estradiol, and fertility in lactating dairy cows in response to equine chorionic gonadotropin. **Theriogenology**, v. 79, p.127-134, 2013.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF_{2α} and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, p. 915-923, 1995.

QUINTAL-FRANCO J. A.; KOJIMA F. N.; MELVIN E. J.; LINDSEY, B. R.; ZANELLA, E.; FIKE, K. E.; WEHRMAN, M. E.; CLOPTON, D. T.; KINDER, J. E. Corpus Luteum Development and Function in Cattle with Episodic Release of Luteinizing Hormone Pulses Inhibited in the Follicular and Early Luteal Phases of the Estrous Cycle. **Biology of Reproduction**, v. 61, p.921-926, 1999.

RAJAMAHENDRAN, R.; SIANANGAMA, P. C. Effect of human chorionic gonadotrophin on dominant follicles in cows: formation of accessory corpora lutea, progesterone production and pregnancy rates. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 95, p. 577-584, 1992.

RAHE, C. H.; OWENS, R. E.; FLEEGER, J. L.; NEWTON, H. J.; HARMS, P. G.; Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: Dependence upon the period of the cycle. **Endocrinology**, v. 107, p.498-503, 1980.

REDMER D. A.; REYNOLDS L. P. Angiogenesis in the ovary. **Reviews of Reproduction**, v. 1, p.182-192, 1996.

REIS, E. L.; GIMENES, L. U.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, J. B. P.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Efeitos do cipionato e do benzoato de estradiol na dinâmica folicular e luteínica de vacas Nelore. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32 (Suplemento), p. 236, 2004.

RENSIS, F. De.; LÓPEZ-GATIUS, F. Equine Chorionic Gonadotropin to Control Reproduction of the Dairy Cows: A Review. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 177-182, 2014.

REYNOLD L. P.; KILLILEA S. D.; REDMER D. A. Angiogenesis in the female reproductive system. **Faseb Journal**, v. 6, p. 886-892, 1992.

REYNOLDS L. P.; GRAZUL-BLISKA A. T.; REDMER, D. A. Angiogenesis in the corpus luteum. **Endocrine**, v. 12, p. 1-9, 2000.

REYNOLDS L. P.; REDMER, D. A. Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in the ovary. **Journal Animal Science**, v. 76, p. 1671-1681, 1998.

RIBEIRO FILHO, A. L. **Indução, sincronização e resincronização do estro e da ovulação em vacas zebuínas**. 2001. 133f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

RIBEIRO FILHO, A. L.; FERRAZ, P. A. RODRIGUES, A. S., BITTENCOURT, T. C. B. S. C.; LOIOLA, M. V. G., CHALHOUB, M. Diâmetro do folículo no momento da Inseminação Artificial em Tempo Fixo e taxa de concepção em vacas Nelore. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 4, p. 501-507, 2013.

RIGOGLIO, N. N.; FÁTIMA, L. A.; HANASSAKA, J. Y.; PINTO, G. L.; MACHADO, A. S. D.; GIMENES, L. U.; BARUSELLI, P. S.; RENNÓ, F. P.; MOURA, C. E.B; WATANABE, IL-S.; PAPA, P. C. Equine chorionic gonadotropin alters luteal cell morphologic features related to progesterone synthesis. **Theriogenology**, v. 79, p. 673-679, 2013.

ROBERSON M. S.; WOLFE, M. W.; STUMPF, T. T.; KITTOCK, R. J.; KINDER, J. E. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. **Biology Reproduction**, v. 41, p. 997-1003, 1989.

ROBINSON R. S.; WOAD K. J.; HAMMOND A. J; LAIRD M., HUNTER M. G.; MANN G. E. Focus on Vascular Function in Female Reproduction Angiogenesis and vascular function in the ovary. **Society for Reproduction and Fertility**, v. 138, 869-881, 2009.

RODRIGUES, A. S. **Capacidade da dupla dose de PGF2 α associada ao eCG em ajustar o proestro de vacas mestiças leiteiras submetidas a um protocolo de IATF**. 2016a. 116f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Salvador.

RODRIGUES, A. S.; SILVA, M. A. A.; BRANDÃO, T. O.; SANTOS, E. S.; MAGGITT JR., L. D. P.; FLORES, E. R.; SILVA, J. B. R.; BITTENCOURT, R. F.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A. L. Avaliação Morfofuncional do Corpo lúteo e

utilização da ultrassonografia Doppler como ferramenta para predição de gestação 20 dias após IATF em vacas. **Animal Reproduction**, p. 222, 2016b.

RIZZO, A.; STEFANI, A. L.; PICCINNO, M. RONCETTI, M.; D'ONGHIA, G.; SCIORSCI, R. L.; Dynamics of the progesterone and cholesterol concentrations within the bovine corpus luteum cavity. **Research in Veterinary Science**, v. 109, p. 56-58, 2016.

SÁ FILHO, O. G.; DIAS, C. C.; LAMB, G. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Progesterone-based estrous synchronization protocols in non-suckled and suckled primiparous *Bos indicus* beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 119, p. 9-16, 2010a.

SÁ FILHO, M. F.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; PENTEADO, L.; GIMENES, L. U.; FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; CASTRO E PAULA, L. A.; SALES, J. N. S.; BARUSELLI, P. S. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 182-187, 2010b.

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

SALES, J. N. S.; BOTTINO, M. P.; SILVA, L. A. C. L.; GIROTTO, R. W.; MASSONETO, J. P. M.; SOUZA, J. C.; BARUSELLI, P. S. Effects of eCG are more pronounced in primiparous than multiparous *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 86, n.9, p. 2290-2295, 2016.

SALES, J. N. S.; CARVALHO, J. B.P.; CREPALDI, G. A.; SOARES, J. G.; GIROTTO, R. W.; MAIO, J. R. G.; SOUZA, J. C.; BARUSELLI, P. S. Effect of circulating progesterone concentration during synchronization for fixed-time artificial insemination on ovulation and fertility in *Bos indicus* (Nelore) beef cows. **Theriogenology**, v. 83, p. 1093-1100, 2015.

SALLES M. G. F.; ARAÚJO, A. A. Corpo lúteo cíclico e gestacional: Revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 3, p. 185-194, 2010.

SALES, J. N. S.; CREPALDI, G. A.; CARVALHO, J. B. P.; GIROTTO, R. W.; MAIO, J. R. G.; RODRIGUES, M. P.; CARVALHO, C. A. B.; FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; BARUSELLI, P. S. Momento da ovulação e taxa de concepção de vacas Nelore tratadas com diferentes fontes de cipionato ou de benzoato de estradiol para induzir a ovulação em protocolos de IATF. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36 (Supl. 2): p. 486, 2008.

SARTORELLI, E. S.; CARVALHO, L. M.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J.; BARROS, C. M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos taurus indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, p. 2382-2394, 2005.

- SARTORI, R.; MONTEIRO, P.L.J.; WILTBANK, M. C. Endocrine and metabolic differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* cows and implications for reproductive management. **Animal Reproduction**, v. 13, n.3, p. 168-181, 2016.
- SARTORI, R.; BARROS, C. M. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 124, p. 244-250, 2011.
- SARTORI, R. Manejo reprodutivo da fêmea leiteira. **Reproduction Animal**, v. 31, n. 2, p. 153-159, 2007.
- SARTORI, R.; FRICKE, P. M.; FERREIRA, J. C. P.; GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicle. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1403-1409, 2001.
- SAVIO, J. D.; KEENAN L.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 83, p. 663-671, 1988.
- SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of Corpus Luteum Function in Cattle – an Overview. **Reproduction Domestic Animal**, v. 39, p. 241-251, 2004.
- SCULLY, S.; EVANS, A. C. O.; CARTER, F., DUFFY, P; LONERGAN, P.; CROWE, M. A. Ultrassound monitoring of blood flow and echotexture of the corpus luteum and uterus during early pregnancy of beef heifers. **Theriogenology**, v. 83, p. 449-458, 2014.
- SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2. ed., Pullman, WA: Current Conceptions. 2003. p. 81-187.
- SHEPHARD, R. W. Efficacy of inclusion of equine chroric gonadotrophin into a treatment protocol for anoestrous dairy cows. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 61, n. 6, p. 330-336, 2013.
- SIDDIQUI, M. A. R.; ALMAMUN, M.; GINTHER, O. J. Blood flow in the wall of the preovulatory follicle and its relationship to pregnancy establishment in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 113, p. 287-292, 2009.
- SILVA, L. A.; GASTAL, E. L.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. **Biology of reproduction**, v. 72, n. 3, p. 755-761, 2005.
- SIQUEIRA, L. G. B.; AREAS, V. S.; GHETTI, A. M.; FONSECA, J. F.; PALHAO, M. P.; FERNANDES, C. A. C.; VIANA, J. H. M.; Color Doppler flow imaging for the early detection of nonpregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. **Journal Dairy Science**, v. 96, p. 6461-6472, 2013.
- SIQUEIRA, L. G. B.; CAMARGO, L. S. A.; FONSECA, J. F.; VIANA, J. H. M. Evaluación de morfología, ecotextura y función del cuerpo luteo em programas de transferencia de embriones. **Spernova**, v. 2, p. 26-31, 2012.

SIQUEIRA, L. G.; TORRES, C. A. A.; AMORIM, L. S.; SOUZA, E. D.; CAMARGO, S. A.; FERNANDES, C. A. C.; VIANA, J. H. M. Interrelationships among morphology, echotexture, and function of the bovine corpus luteum during the estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 115, p. 18-28, 2009.

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

SMITH M. F.; MCINTUSHI, E. W.; SMITH G. W. Mechanism associated with corpus luteum development. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 1857-1872, 1994.

SOUMANO, K.; LUSSIER, J. G.; PRICE, C. A. Levels of messenger RNA encoding ovarian receptors for FSH and LH in cattle during superovulation with equine chorionic gonadotrophin versus FSH. **Journal of Endocrinology**, v. 156, p. 373-378, 1996.

SOUZA, L. M. M. C.; MENDES, G.P.; CAMPOS, D. B.; BARUSELLI, P. S.; PAPA, P. C. Equine Chorionic Gonadotropin Modulates the Expression of Genes Related to the Structure and Function of the Bovine Corpus Luteum. **Plos One**, v. 11, n. 10, p. 1-24, 2016.

SOUZA, A. H.; VIECHNIESKI, S.; LIMA, F. A.; SILVA, F. F.; ARAÚJO, R.; BÓ, G. A.; WILTBAANK, M. C.; BARUSELLI, P. S. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocolo in reproductive responses in dairy cows. **Theriogenology**, v. 72, p. 10-21, 2009.

SPSS, Statistical Package for Social Science. **Introduction to SPSS for windows version 19**, Chicago, EUA, 2012. 85p.

STEWART, F.; ALLEN, W. R. The binding of FSH, LH and PMSG to equine gonadal tissues. **Journal Reproduction Fertility**, v. 27, p. 431-440, 1979.

STOCCO, C.; TELLERIA, C.; GIBORI, G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. **Endocrine Reviews**, v. 28, n. 1, p. 117-149, 2007.

TARSO, S. G. S.; APGAR, G. A.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L. Relationship between follicle and corpus luteum diameter, blood flow, and progesterone roduction in beef cows and heifers: preliminary results. **Animal Reproduction**, v. 13, n. 2, p. 81-92, 2016.

THUNDATHIL, J.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. The effect of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular development and ovulation in dairy cattle. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 61, p. 314-316, 1997.

TORRES-JUNIOR, J. R. S.; AYRES, H.; ARAUJO, R. L.; MAGALHÃES, D. M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Dinâmica folicular de vacas Nelore (*Bos indicus*) tratadas com implante auricular de norgestomet associado ao cipionato de estradiol e submetidas a administração de GnRH 48 ou 54 horas após a retirada do implante. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35 (Supl. 3), p. 1111, 2007.

TORTORELLA, R. D.; FERREIRA, R.; SANTOS, J. T.; ANDRADE NETO, O. S.; BARRETA, M. H.; OLIVEIRA, J. F.; GONÇALVES, P. B.; NEVES, J. P. The effect of equine chorionic gonadotropin on follicular size, luteal volume, circulating progesterone concentrations, and pregnancy rates in anestrous beef cows treated with a novel fixed-time artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 79, p. 1204-1209, 2013.

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

UTT, M. D.; JOHNSON, G. L.; BEAL, W. E. The evaluation of corpus luteum blood flow using color-flow Doppler ultrasound for early pregnancy diagnosis in bovine embryo recipients. **Theriogenology**, v. 71, p. 707-715, 2009.

VASCONCELOS J. L. M.; CARVALHO R., PERES, R. F.G., RODRIGUES, A. D.P.; JUNIOR, I. C.; MENEGHETTI, M.; AONO, F. H.; COSTA, W. M.; LOPES, C. N., COOKE, R. F., POHLER, K. G. Reproductive programs for beef cattle: incorporating management and reproductive techniques for better fertility. **Animal Reproduction**, v.14, n.3, p.547-557, 2017.

VASCONCELOS, J. L. M.; PEREIRA, M. H. C.; MENEGHETTI, M.; DIAS, C. C.; FILHO, O. G. S.; PERES, R. F.G.; RODRIGUES, A. D. P.; WILTBANK, M. C. Relationships between growth of the preovulatory follicle and gestation success in lactating dairy cows. **Animal Reproduction**, v. 10, p. 206-214, 2013.

VASCONCELOS, J. L. M.; JARDINA, D. T. G.; FILHO, O. G. S.; ARAGON, F. L.; VERAS, M. B. Comparison of progesterone-based protocols with gonadotropin-releasing hormone or estradiol benzoate for timed artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 75, p. 1153-1160, 2011.

VIANA J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C. S.; SIQUEIRA, L. G. B. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction**, v.14, n.3, p.476-481, 2017.

VIANA, J. H. M.; ARASHIRO, E. K. N.; SIQUEIRA, L. G. B.; GHETTI, A. M.; AREAS, V. S.; GUIMARÃES, C. R. B.; PALHAO, M. P.; CAMARGO, L. S. A.; FERNANDES, C. A. C. Doppler ultrasonography as a tool for ovarian management. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 215-222, 2013.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 35, p. 2501-2509, 2000.

VILELA, M. S.; FERREIRA, M. A., VÉRAS, A. S. C.; SANTOS, M. V. F.; FARIAS I.; MELO A. A. S., RAMALHO, R. P.; ARAÚJO, P. R. B. Avaliação de Diferentes Suplementos para Vacas Mestiças em Lactação Alimentadas com Cana-de-Açúcar: Desempenho e Digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 3, p. 768-777, 2003.

WEBB, B.; BURATINI, J.; HERNANDEZ-MEDRANO, J. H.; GUTIERREZ, C. G.; CAMPBELL, B. K. Follicle development and selection: past, present and future. **Animal Reproduction**, v. 13, n. 3, p. 234-249, 2016.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; CAMPBELL, B. K.; HUNTER, M. G. Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. **Theriogenology**, v. 68, p. 22-29, 2007.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J. G.; ARMSTRONG, D. G. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influence. **Journal of Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 63-74, 2004.

WEBB, R.; WOAD, K. J., ARMSTRONG, D. G. Corpus luteum (CL) function: local control mechanisms. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, 277-285, 2002.

WILTBANK, M. C.; PURSLEY, J. R. The cow as an induced ovulator: Timed AI after synchronization of ovulation. **Theriogenology**, v. 81, p. 170-185, 2014.

WILTBANK, M. C.; SOUZA, A. H.; CARVALHO, P. D.; CUNHA, P.; GIORDANO, J. O.; FRICKE, P. M.; BAEZ, G. M.; DISKIN, M. G. Physiological and practical effects of progesterone on reproduction in dairy cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 8, p. 70-81, 2014.

WILTBANK, M. C.; SALIH, S. M.; ALTLI, M. O.; LUO, W.; BORMANN, C. L.; OTTOBRE, J. S.; VEZINA, C. M.; MEHTA, V.; DIAZ, F. J.; TSAI, S. J.; SARTORI, R. Comparação dos mecanismos endócrino e celulares que regulam o corpo lúteo de primatas e ruminantes. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 242-259, 2012

WILTBANK, M. C.; GTIMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 21-52, 2002.

WILTBANK, M. C. Uso eficaz de hormônio de reprodução: II Programas de Reprodução. In: NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS. 3, 2000, Uberlândia. **Anais...** local: editora, v.1, p. 71-85.

XU, Z.; GARVERICK, H. A.; SMITH, G. W.; SIMITH, M. F.; HAMILTON, S. A.; YOUNGQUIST, R. S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicle during the first follicular wave. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 951-957, 1995.