

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA VETERINÁRIA

**“DIFERENÇAS FISIOLÓGICAS REPRODUTIVAS
ENTRE *Bos taurus* e *Bos indicus*”**

MICHELE RICIERI BASTOS

BOTUCATU - SP

Junho - 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA VETERINÁRIA

**“DIFERENÇAS FISIOLÓGICAS REPRODUTIVAS ENTRE *Bos taurus*
e *Bos indicus*”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária, Área de concentração
em Reprodução Animal, da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de Estadual Júlio de Mesquita Filho (FMVZ-
UNESP/Botucatu) para a obtenção do título de
Doutor em Medicina Veterinária.

MICHELE RICIERI BASTOS

Orientador: ROBERTO SARTORI FILHO

Botucatu-SP

Junho – 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Bastos, Michele Ricieri.

Diferenças fisiológicas reprodutivas entre *Bos taurus* e *Bos indicus* /
Michele Ricieri Bastos. – Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Roberto Sartori Filho

Capes: 50504002

1. Bovino – Reprodução. 2. Zebu – Reprodução. 3. Hormônios. 4.
Metabolismo.

Palavras-chave: *Bos indicus*; *Bos taurus*; Função ovariana; Hormônios
reprodutivos; Metabolismo.

Nome: BASTOS, Michele Ricieri

Título: **Diferenças fisiológicas reprodutivas entre *Bos taurus* e *Bos indicus*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de Estadual Júlio de Mesquita Filho (FMVZ-UNESP/Botucatu) para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária.

Data: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

“A vocês, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, não bastaria um obrigado. A vocês, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que eu os pudesse trilhar sem medo e cheio de esperança, não bastaria um muito obrigado. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Pela longa espera e compreensão durante minhas longas viagens e longos períodos de ausência, não bastaria um muitíssimo obrigado. A vocês, pais por natureza, por opção e por amor, não bastaria dizer que não tenho palavras para agradecer tudo isso. Mas é o que me acontece agora, quando procuro arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar. Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras. Amo vocês!”

(Autor desconhecido)

Aos meus pais Jair e Fátima...

... Dedico!

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por me dar força e determinação para chegar até aqui!

A toda minha família. Em especial aos meus pais Jair e Fátima e a minha irmã Letícia. Obrigada por todo apoio, incentivo e por entenderem a minha ausência em muitos momentos importantes e em muitas datas especiais. Saibam que mesmo distantes vocês são tudo para mim. Também gostaria de agradecer ao Puppinho que foi e sempre será membro da nossa família. Mesmo ausente você será sempre lembrado e muito amado por todos nós.

Ao Murillo Meschiatti, obrigada por toda ajuda, apoio, companheirismo e, principalmente, por estar sempre presente nos momentos mais difíceis, sempre acreditando em mim, me incentivando e me convencendo a nunca desistir. Patinha de avestruz, você me mostrou que, realmente, **“no matter who you are, no matter where you go in life, in some point, you will need somebody, to stand by you”**

Ao Orientador Prof. Dr. Roberto Sartori Filho o meu sincero muito obrigada por me dar a oportunidade de chegar até aqui.

“Onde quer que nos encontremos, são os nossos amigos que constituem o nosso mundo” (William James). Obrigada por tudo meus queridos amigos: Hení (Vó), Maria Clara e Vicente (Cabeça), Sarah, Martinha, Mariana, Mandinha e Adnan, Fê Zinsly, José (Zói), Xará, Xandão, Pedrinho, Fernanda Lavignia, Rogério Peres, Jeanne, Yara, Tito, Rosiara, Mariana Peres e Marília. E aos meus eternos amigos da saudosa época da “Fazenda Sucupira”, vocês todos fazem muita falta! Serei sempre imensamente grata a todos vocês, meus queridos amigos!

Gostaria de dizer um muito obrigada ao seu Laureano, Dona Eva e família. Vocês são a minha segunda família. Obrigada por sempre nos receber de braços abertos e nos deixar fazer

parte dessa família tão maravilhosa. Saibam que vocês são o refúgio que todos nós temos para os momentos mais difíceis longe da família.

Maria Clara, à você e a toda sua família também quero dizer um muito obrigada, muito especial! Vocês também foram e sempre serão a minha segunda família em Piracicaba (agora em Mogi) e em Tietê. Muito obrigada a todos vocês: Clara, Vicente, Ana Silvia, Isabela, Vó Maria e Roberto.

Aos colegas e companheiros de Pós-Graduação: Maria Clara, José, Amanda (Obrigada por tudo! Sua ajuda com as questões “burocráticas” foi essencial!), Fernanda Zinsly, Ricardo (obrigada por toda ajuda, desde a época das intermináveis reformas do confinamento ... tirar portão e colocar portão todo dia!!!), Alexandre (Obrigada pela ajuda e por sempre nos disponibilizar um cantinho para os nossos momentos de descontração!), Pedro (Obrigada por ajudar nas trabalhosas cateterizações da réplica 1), Fernanda Lavígnia, Monique, Marcão, Delci, Maranhão, Paraíba, Rodrigão e Aníbal. Aos alunos da prática profissionalizante Martinha, Mariana (essas duas foram meus braços direito e esquerdo por muitas e muitas vezes! Vivemos juntas muitas síndromes do “quinto” catéter e dos 1000 kg de milho moídos toda semana!!!) e Tito. Aos alunos de iniciação científica Murillo (também sempre presente desde o início, desde a época das intermináveis e torturantes reformas do confinamento!) e Igor (Strogo). A todos do CPZ que sempre contribuíram direta ou indiretamente, saibam que sempre estarei na torcida pelo CPZ, que continue formando pessoas e excelentes profissionais. Obrigada pela ajuda de todos vocês durante todos esses anos e em todos esses experimentos. Sem ajuda nada disso teria sido concluído.

Aos estagiários: Rafael (não deu tempo de ajudar nos experimentos, mas ajudou a comprar as vacas!), Luis (o rei da gambiarra!), Dênia, Talise, Guilherme, Yara e Larissa. A ajuda de todos vocês sempre foi essencial. Muito obrigada!

Aos professores que direta ou indiretamente contribuíram para a realização de todos esses experimentos: Flávio Portela, Alexandre Pedroso, Ivanete Susin, Gerson Mourão, João Ferreira, Alexandre Pires, Eunice Oba, Guilherme de Paula Nogueira e Marco Antônio Penati.

Aos amigos que fiz no período que passei na Universidade de Wisconsin-Madison. Em primeiro lugar ao grande mestre Milo Wiltbank, ao Jerry Güenther, Alexandre Souza e Carol, Paulo, Gláucio, Robb, Julio, Mary, Kattie, Gulnaz, Osman, Kishore, Guilherme, Sabrina, Cristina e Luiz Palilo.

Ao programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da FMVZ-UNESP, Botucatu, a todos os Professores e Funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária e a todos os Professores e Funcionários do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP Piracicaba.

À FAPESP pelo indispensável apoio financeiro. Fornecendo Bolsa (Processo 2008/ 04118-8) e Auxílio à pesquisa (Processo 2009/05547-2).

Aos Profs. Drs. Pietro Baruselli, Guilherme Nogueira, João Ferreira e Nereu Prestes por participarem da banca como membros titulares. E aos Profs. (a) Drs. (a) Maria Denise Lopes, Alexandre Pedroso e Alexandre Pires por participarem como membros suplentes.

À família Ourofino Agronegócio, minha nova “casa”. Obrigada a todos por me receberem de braços abertos e por me darem a chance de encarar novos desafios, me permitindo crescer cada dia mais na profissão que escolhi e muito obrigada pela oportunidade de conhecer e trabalhar com pessoas sensacionais.

Em especial, muito obrigada, às queridas vacas. Tanto as Nelores quanto às Holandesas. Queridas “pé-duro” gostaria de me desculpar por tantas vezes dizer a minha tão tradicional frase: **“Quanto mais eu conheço as Holandesas, mais eu amo as Nelores”** (Bastos, 2009, 2010 e

2011). Eu amo todas vocês, especialmente a 33 (que sempre será a 400) e a Mentirinha (1170), independente da raça!!!

"Sempre me pareceu estranho que todos aqueles que estudam seriamente esta ciência acabam tomados de uma espécie de paixão pela mesma. Em verdade, o que proporciona o máximo de prazer não é o conhecimento e sim a aprendizagem; não é a posse, mas a aquisição; não é a presença, mas o ato de atingir a meta."

Carl Friedrich Gauss (Adaptado)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
CAPÍTULO 1	1
Revisão de literatura	1
1. Fisiologia reprodutiva de fêmeas <i>Bos taurus indicus</i> e <i>Bos taurus taurus</i>	2
1.1 Dinâmica folicular.....	2
1.2 Seleção do folículo dominante	4
1.3 Comportamento estral	6
1.4 Desenvolvimento folicular e luteal	9
1.5 Produção ou concentrações circulantes de hormônios esteróides.....	10
1.6 Produção ou concentrações circulantes de hormônios metabólicos.....	11
2. Influência da nutrição na reprodução.....	13
3. Uso de benzoato de estradiol para sincronização da emergência da onda folicular em <i>bos taurus</i> e <i>bos indicus</i>	20
CAPÍTULO 2	23
Experimento 1	23
“Função ovariana e hormônios circulantes em vacas não lactantes das raças Nelore e Holandês Preto e Branco”.....	23
RESUMO	24
2.1 OBJETIVO.....	25
2.1 MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1.1 Animais.....	25
2.1.2 Dietas tratamento.....	25
2.1.3 Sincronização de estro	26
2.1.4 Exames ultrassonográficos, colheita de sangue e dosagens hormonais	27
2.2 RESULTADOS.....	28
2.3 CONCLUSÃO	31
CAPÍTULO 3	32
Experimento 2	32
“Efeito da dose de benzoato de estradiol em associação à progesterona na sincronização da emergência da onda folicular em vacas <i>Bos indicus</i> e <i>Bos taurus</i> ”.....	32
RESUMO	33
3.1 OBJETIVOS.....	34
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	34

3.1	RESULTADOS	37
3.3	CONCLUSÃO	43
	CAPÍTULO 4	44
	Experimento 3	44
	“Intensidade e duração do estro em vacas não lactante <i>Bos indicus</i> (Nelore) e <i>Bos taurus</i> (Holandês preto e branco)”	44
	RESUMO	45
4.1	OBJETIVO.....	46
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	46
4.3	RESULTADOS	48
4.4	CONCLUSÃO	49
	CAPÍTULO 5	50
	Experimento 4	50
	“Influência da alta e baixa ingestão alimentar na função ovariana em <i>Bos taurus indicus</i> e <i>Bos taurus taurus</i> ”	50
	RESUMO	51
5.1	OBJETIVO.....	52
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	52
5.2.1	Animais.....	52
5.2.2	Dietas tratamento.....	53
5.2.3	Sincronização e observação de estro	54
5.2.4	Ultrassonografia ovariana e colheita de sangue	54
5.2.5	Avaliação da produção ovariana de progesterona e estradiol.....	55
5.3	RESULTADOS	61
5.4	CONCLUSÃO	69
	CAPÍTULO 6	71
	Discussão dos resultados	71
	6.1 Fisiologia reprodutiva de fêmeas <i>Bos taurus indicus</i> e <i>Bos taurus taurus</i> e influência da nutrição na reprodução.....	72
6.1.1	Dinâmica folicular.....	72
6.1.2	Número de folículos recrutados no início da onda folicular	73
6.1.3	Seleção do folículo dominante	74
6.1.4	Desenvolvimento folicular e luteal e concentrações circulantes de hormônios esteróides e metabólicos	76
6.1.5	Comportamento estral.....	80

6.2	Uso de benzoato de estradiol para sincronização da emergência da onda folicular em <i>Bos taurus</i> e <i>Bos indicus</i>	81
	CAPÍTULO 7	87
	Considerações finais	87
	REFERÊNCIAS	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados (média \pm EP) das avaliações ultrassonográficas ovarianas e das dosagens hormonais realizadas durante o ciclo estral de vacas não lactantes das raças NEL e HPB.....	30
Tabela 2. Resultados das variáveis (média dos quadrados mínimos \pm EP) que apresentaram efeito de tratamento, independente da raça em vacas HPB e Nelore não lactantes tratadas com 1, 2 ou 4 mg de benzoato de estradiol.....	39
Tabela 3. Resultados das variáveis (média dos quadrados mínimos \pm EP) que apresentaram efeito de raça, independente do tratamento em vacas HPB e Nelore não lactantes tratadas com 1, 2 ou 4 mg de benzoato de estradiol.....	41
Tabela 4. Resultados (porcentagem ou média \pm EP) das observações do estro e da confirmação da ovulação de vacas não lactantes das raças NEL e HPB.	49
Tabela 5. Média dos quadrados mínimos \pm EPM das variáveis analisadas neste experimento considerando apenas o efeito da raça.....	63
Tabela 6. Média dos quadrados mínimos \pm EPM das variáveis analisadas neste experimento considerando apenas o efeito do tratamento.	65
Tabela 7. Média \pm EPM das concentrações plasmáticas de P4 no cateter e na jugular no dia 7 do ciclo estral em HPB e Nelore, independente do tratamento. Nesta tabela estão apenas os dados dos animais nos quais foi possível a cateterização da veia cava caudal.....	66
Tabela 8. Média \pm EPM das concentrações plasmáticas de P4 no cateter e na jugular no dia 7 do ciclo estral nas fêmeas que receberam dietas de alta ou baixa ingestão alimentar,	

independente da raça. Nesta tabela estão apenas os dados dos animais nos quais foi possível a cateterização da veia cava caudal. 67

Tabela 9. Média \pm EPM das concentrações de E2 presentes no fluido folicular (FF) do folículo pré-ovulatório de vacas das raças HPB e Nelore, independente do tratamento. 68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo do delineamento experimental, mostrando o protocolo de sincronização do cio, o período dos exames ultrassonográficos e das colheitas de sangue.	26
Figura 2. Esquema ilustrativo do delineamento experimental.	36
Figura 3. Concentrações plasmáticas de FSH durante 9 dias após o tratamento com 1, 2 ou 4 mg de BE em vacas HPB e Nelore não lactantes. Houve interação tratamento/dia (*P<0,05). 40	40
Figura 4. Concentrações plasmáticas de E2 24h após tratamento com 1, 2 ou 4 mg de BE em vacas HPB e Nelore não lactantes. Houve efeito de raça e de tratamento (P<0,05).....	42
Figura 5. Concentrações plasmáticas de FSH durante 9 dias após o tratamento com 1, 2 ou 4 mg de BE em vacas HPB e Nelore não lactantes. Houve interação raça/dia (*P<0,05).	43
Figura 6. Vacas das raças NEL e HPB não lactantes mantidas no mesmo piquete para observação de estro.	47
Figura 7. Esquema representativo do delineamento experimental, mostrando o protocolo de sincronização e observação do cio, o momento do exame ultrassonográfico.....	48
Figura 8. Fotos ilustrativas da cateterização da veia safena lateral.....	58
Figura 9. Peso corporal (Kg) dos animais das raças HPB e Nelore, submetidos a dietas de alta e baixa ingestão alimentar, durante todo o período experimental.....	62

RESUMO

BASTOS, M.R. **Diferenças fisiológicas reprodutivas entre *Bos taurus* e *Bos indicus***, 2012. 107 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – FMVZ – UNESP Botucatu, SP. 2012.

Algumas informações referentes às diferenças do ciclo estral de fêmeas taurinas e zebuínas já são conhecidas. No entanto, a literatura ainda é bastante escassa, uma vez que a grande maioria dos trabalhos não foi desenvolvida nas condições de clima tropical, encontradas no Brasil. Ademais, as bases fisiológicas para o entendimento das diferenças do ciclo estral de *Bos taurus* e *Bos indicus* ainda permanecem pouco conhecidas e pouco estudadas. Repetidamente, em todos os experimentos apresentados nesta tese, as fêmeas *Bos indicus* apresentaram maior número de folículos pequenos presentes nos ovários e ovulam folículos com menor diâmetro quando comparados a *Bos taurus* e conseqüentemente também apresentaram menor corpo lúteo. No entanto, o mesmo não foi observado em relação às concentrações circulantes dos hormônios esteróides e metabólicos. Apesar de terem ovulado folículos menores e terem formado corpos lúteos menores, as fêmeas zebuínas apresentaram maiores concentrações circulantes de progesterona, estradiol, insulina e IGF-I, comparadas às fêmeas taurinas. Além disso, também foram encontradas diferenças substanciais entre *Bos indicus* e *Bos taurus* em relação ao tamanho do folículo no momento do desvio/seleção do folículo dominante. Com base nos resultados obtidos com todos os experimentos, acredita-se que, maiores concentrações circulantes de insulina, além de um metabolismo hepático de hormônios esteróides mais lento em fêmeas *Bos indicus* são os principais fatores responsáveis pelas diferenças na fisiologia ovariana entre taurinos e zebuínos. Além disso, foi mostrado que o nível de ingestão alimentar pode alterar a fisiologia reprodutiva, independente da raça. Entretanto, ainda há necessidade que se façam mais trabalhos que efetivamente avaliem a produção e o metabolismo hepático dos hormônios esteróides, associado ou não a alta ingestão alimentar, que é um fator que sabidamente afeta os parâmetros reprodutivos.

Palavras-chave: *Bos indicus*, *Bos taurus*, estro, hormônio, metabolismo, nutrição, ovário.

ABSTRACT

Some information regarding the differences of the estrous cycle of *Bos indicus* vs *Bos taurus* cattle are already known. However, the literature is scarce, since the majority of studies has not been developed in tropical climate as encountered in Brazil. Furthermore, the physiological basis for understanding the differences of the estrous cycle of *Bos taurus* and *Bos indicus* remain little known and little studied. In general, *Bos indicus* had a higher number of small follicles present in the ovary and ovulate smaller diameter follicles when compared to *Bos taurus* and consequently had smaller corpora lutea. However, although Zebu cows ovulated smaller follicles and had smaller CL, they had higher circulating concentrations of estradiol, progesterone, insulin and IGF-I. In addition, there were also substantial differences between *Bos indicus* and *Bos taurus* in relation to follicle size at the time of deviation/selection of the dominant follicle. Apparently, higher concentrations of circulating insulin, and a slower hepatic metabolism of steroid hormones in *Bos indicus* cows were the main factors responsible for differences in ovarian physiology between European and Zebu cattle. Furthermore, it was shown that the level of feed intake can alter reproductive physiology, in Zebu and Holstein cows. However, still need more studies that effectively evaluate the production and hepatic metabolism of steroid hormones, alone or combined with high feed intake, which is a factor known to affects the reproductive variables

Keywords: *Bos indicus*, *Bos taurus*, estradiol, hormones, metabolism, nutrition, ovary.

CAPÍTULO 1

Revisão de literatura

1. Fisiologia reprodutiva de fêmeas *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*

1.1 Dinâmica folicular

Com o advento da avaliação da atividade ovariana através de ultrassonografia transretal, puderam-se observar padrões de crescimento e regressão de folículos antrais em forma de ondas durante o ciclo estral bovino (PIERSON & GINTHER 1984; SAVIO et al. 1988).

Estudos em *Bos taurus* descreveram a ocorrência de duas a quatro ondas foliculares (GINTHER et al. 1989; KNOPF et al. 1989; KO et al. 1991; WILSON et al. 1998a; WILSON et al. 1998b; KULICK et al. 1999; TOWNSON et al. 2002; SARTORI et al. 2004; WEBB et al. 2004) durante um ciclo estral, sendo que a maioria dos animais apresentou duas ondas, com menor frequência três ondas e, muito raramente, quatro ondas (SIROIS & FORTUNE 1988; PURSLEY et al. 1993; TOWNSON et al. 2002; SARTORI et al. 2004).

Um estudo realizado no Brasil com Nelore (FIGUEIREDO et al. 1997) observou ciclos com duas ou três ondas foliculares, havendo um predomínio de duas ondas nas vacas e de três ondas nas novilhas. Estudos no Brasil com novilhas Nelore confinadas (MOLLO et al. 2007b), vacas Gir (VIANA et al. 2000) e nos EUA com vacas Brahman (ZEITOUN et al. 1996) descreveram a predominância de três ondas foliculares, mas também observaram vacas com duas, quatro ou cinco ondas no ciclo [revisado por Baruselli et al. (2007); Sartori et al. (2010a; 2010b) SARTORI & BARROS (2011)].

Embora, diversos estudos tenham avaliado os padrões do ciclo estral em *Bos taurus* e *Bos indicus*, muito poucos fizeram uma comparação direta e simultânea desses grupos genéticos sob as mesmas condições ambientais e de manejo. Um experimento foi realizado na Flórida durante o verão onde se comparou vacas multíparas em lactação das raças Angus (*Bos taurus* temperado;

n = 12), Brahman (*Bos indicus* tropical; n = 12), e Senepol (*Bos taurus* tropical, n = 12) durante um ciclo estral completo (ALVAREZ et al., 2000). Neste estudo, a maioria das vacas Angus e Brahman teve duas ondas foliculares durante o ciclo estral (72,7% e 55,6%, respectivamente) e em 70% dos ciclos das vacas Senepol houve três ondas.

Ao compararem Angus a Brahman, Segerson et al. (1984) observaram maiores concentrações séricas de E2 e P4 nas fêmeas taurinas. Como se espera uma correlação positiva entre tamanho das estruturas ovarianas e concentrações séricas dos hormônios esteróides (VASCONCELOS et al. 2001; SARTORI et al. 2002), esses dados corroboram relatos de literatura em que fêmeas zebuínas geralmente apresentaram um menor tamanho máximo do folículo dominante e menor tamanho de CL comparado às taurinas (BÓ et al. 2003; SARTORI et al. 2010a)

Com relação à população folicular nos ovários, diferenças na população de folículos antrais entre os grupos genéticos estão bem documentadas. No início de cada onda folicular, aproximadamente 24 folículos pequenos (2-5 mm) foram detectados em fêmeas *Bos taurus* (GINTHER et al. 1996), no entanto, em fêmeas zebuínas, observou-se um maior número de folículos pequenos durante a emergência da onda folicular. Buratini Jr. et al. (2000) descreveram a ocorrência de cerca de 50 folículos pequenos nos ovários de novilhas da raça Nelore. Um elevado número de folículos pequenos também foi observado nos ovários de novilhas ($49,0 \pm 6,4$, n = 14) e vacas em lactação ($64,0 \pm 5,1$, n = 34) da raça Sindi (*Bos indicus*) (MATTOS et al. 2011). Ao compararem diretamente o número de folículos pequenos (3 a 5 mm) nos ovários de *Bos taurus* e *Bos indicus*, Alvarez et al. (2000) observaram um maior número de folículos em vacas múltiparas em lactação da raça Brahman (39 ± 4) do que Senepol (33 ± 4), ou Angus (21 ± 4). Estudos recentes realizados com ambos os grupos genéticos em condições ambientais e

nutricionais contemporâneas mostrou que animais *Bos indicus* apresentaram maior número de folículos no dia da emergência da onda em relação aos *Bos taurus* (CARVALHO et al. 2008; GIMENES et al. 2008). Carvalho et al. (2008) sincronizaram a ovulação de novilhas das raças Nelore, Angus, Gir e HPB. Neste estudo, as fêmeas *Bos indicus* (Nelore e Gir, combinadas) apresentaram $33,4 \pm 3,2$ folículos ao início da onda folicular, enquanto novilhas *Bos taurus* (Angus e HPB combinadas) tiveram $25,4 \pm 2,5$ folículos ($P = 0,09$). Similarmente, Gimenes et al. (2008), observaram que novilhas da raça Nelore tiveram $29,7 \pm 3,1$ folículos no momento da emergência da onda e que, novilhas da raça HPB apresentaram $15,0 \pm 2,8$ folículos ($P < 0,01$). Segerson et al. (1984) também descreveram um maior número de folículos menores do que 5 mm em diâmetro no dia 17 do ciclo estral em novilhas zebuínas comparadas às taurinas. Essas diferenças também podem estar relacionadas a diferenças nas concentrações circulantes de hormônios ou metabólicos. Por exemplo, estudos realizados em *Bos indicus* mostram maiores concentrações plasmáticas de IGF-I e menores concentrações de FSH quando comparadas a vacas *Bos taurus* (SIMPSON et al. 1994; ALVAREZ et al. 2000).

1.2 Seleção do folículo dominante

Os mecanismos envolvidos no processo de seleção do folículo dominante são complexos e não compreendidos completamente. Sabe-se, entretanto, que diversos fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos estão associados ao processo de desvio folicular e/ou seleção do folículo dominante. Células ovarianas da teca expressam receptores de LH (LHR) em folículos pré-antrais a pré-ovulatórios (XU et al. 1995). Embora esteja claro que a expressão de LHR ocorre em células da granulosa de folículos dominantes (XU et al. 1995; BAO et al. 1997), há alguma controvérsia sobre o momento em que essas células começam a expressar receptores funcionais

de LH e se estes são necessários para dar suporte ao crescimento do folículo dominante no momento do desvio, quando os níveis de FSH estão em declínio ou muito baixos. Abundância de RNAm de LHR, medida por PCR em tempo real foi maior em células da granulosa do maior folículo da onda em comparação com o segundo maior folículo antes do desvio morfológico, sugerindo que a aquisição de responsividade ao LH pelas células da granulosa é parte do processo de desvio (BEG et al. 2001). Outros estudos utilizando hibridização *in situ*, não conseguiram detectar RNAm de LHR em células da granulosa no momento esperado do desvio folicular (EVANS & FORTUNE 1997; FORTUNE et al. 2001; GARVERICK et al. 2002), o que corrobora resultados de estudos anteriores, que mostraram ligação de LH às células da granulosa apenas nos folículos com dominância estabelecida (IRELAND & ROCHE 1982; WEBB & ENGLAND 1982).

Em bovinos, no momento do início da onda folicular, o qual coincide com um pico nas concentrações sanguíneas de FSH, observa-se a emergência de um grupo de folículos com tamanho antral similar (4,0 mm de diâmetro). Dentre esses folículos, somente alguns continuam a crescer, enquanto que os demais sofrem atresia. Geralmente, quando o maior folículo em crescimento atinge um diâmetro de 8,3 a 9,0 mm (GINTHER et al. 1996; SARTORI et al. 2001), ocorre um fenômeno denominado desvio folicular, caracterizando a seleção do folículo dominante. O desvio folicular caracteriza-se pela variação da taxa de crescimento do maior folículo subordinado em relação ao folículo dominante, no caso de animais com apenas um folículo dominante na onda folicular. A partir desse momento, o folículo dominante continua a crescer e o(s) subordinado(s) sofre(m) atresia. Devido ao fato da espécie bovina ser monovulatória, a presença de apenas um folículo dominante é o achado mais comum ao exame ultrassonográfico, embora a codominância (dois ou mais folículos dominantes) possa ser

observada, principalmente em vacas leiteiras de alta produção (SARTORI et al. 2002; LOPEZ et al. 2005).

Diferentemente dos valores descritos na literatura para taurinos, em gado zebu, como, por exemplo, a raça Nelore, o desvio folicular ocorre quando o maior folículo em crescimento atinge de 5 a 6,5 mm (FIGUEIREDO et al. 1997; SARTORELLI et al. 2003; SARTORELLI et al. 2005; CASTILHO et al. 2007; ERENO 2008; GIMENES et al. 2008). Embora o tamanho do folículo ao desvio possa diferir substancialmente entre as raças taurinas e zebuínas, o momento do desvio durante a primeira onda folicular em relação à ovulação anterior em *Bos indicus* (2,3-2,8 d) (SARTORELLI et al. 2003; SARTORELLI et al. 2005; ERENO 2008; GIMENES et al. 2008) foi semelhante ao relatado em *Bos taurus* (GINTHER et al. 1996; SARTORI et al. 2001).

Como existem poucos estudos de dinâmica folicular em vacas ou novilhas HPB nos trópicos, além da escassez de trabalhos contemporâneos e simultâneos com fêmeas taurinas e zebuínas, torna-se difícil traçar qualquer tipo de comparação entre raças.

1.3 Comportamento estral

Após a luteólise, as concentrações sanguíneas de P4 diminuem e as concentrações de E2 aumentam em consequência do crescimento do folículo pré-ovulatório. A queda nas concentrações de P4 e o aumento em E2 são responsáveis pelo comportamento de estro e pelo pico pré-ovulatório de GnRH/LH (ALLRICH 1994). Estro é um evento de receptividade sexual que dura entre 30 minutos e 27 horas em vacas leiteiras taurinas (LOPEZ et al. 2004) e entre 1,3 e 20 horas em vacas zebuínas [revisado por Bó et al. (2002)] e é influenciado pela idade, produção de leite, fatores ambientais e hierarquia [revisado por LANDAETA-HERNÁNDEZ et

al.(2004)]. Adicionalmente, diferenças no comportamento estral podem ser notadas entre raças (RAE et al. 1999), ou entre diferentes grupos genéticos (*Bos indicus* vs *Bos taurus*).

Sugere-se que fêmeas *Bos indicus* apresentem estro de duração mais curta (em média de 10 horas), o que dificulta sua detecção [GALINA & ARTHUR, 1990 - revisado em (BÓ et al. 2003)]. Somado a este fator, mais de 50% dos animais desse grupo genético iniciam a manifestação de cio no período noturno (entre 18:00 e 6:00 h) (PINHEIRO et al. 1998; Membrive 2000), sendo que cerca de 30% iniciam e encerram o estro durante a noite (PINHEIRO et al. 1998), dificultando o manejo e a eficácia da detecção de cio. Em condições brasileiras de manejo, foi avaliado o comportamento reprodutivo de vacas de corte com auxílio de radiotelemetria (Heat-Watch). Verificou-se que a duração do estro em *Bos indicus* foi menor do que em *Bos taurus* ($12,9 \pm 2,9$ horas em Nelore vs. $16,3 \pm 4,8$ horas em Angus) (MIZUTA 2003). Apesar disso, o intervalo entre o estro e a ovulação não apresentou diferença entre estas duas raças (Nelore, $27,1 \pm 3,3$ horas vs. Angus, $26,1 \pm 6,3$ horas).

Dados agrupados de dois outros estudos, em que o estro foi sincronizado em 90 novilhas Nelore cíclicas, e a ovulação confirmada por ultrassonografia, foram analisados. Embora a maioria (76,7%) das novilhas tenha ovulado dentro de 7 d após tratamento com PGF2 α , 50% delas não foram observadas em estro, mesmo com monitoramento visual contínuo (24 h por d) associado a ferramentas auxiliares de detecção de estro, tais como o Kamar (R. Sartori; não publicado). Além disso, das 45 novilhas que não foram detectadas em estro 25 (55,6%) ovularam, e apenas uma novilha (2,2%) que foi vista em estro não ovulou. Algumas das possíveis razões para a falta de comportamento de estro nesses estudos, além de um efeito inerente à raça, foi o manejo excessivo dos animais para avaliação ultrassonográfica transretal e

colheitas de sangue por venopunção diários e/ou uma queda relativa na temperatura ambiente durante algumas das noites dos ensaios referidos.

Estudos recentes indicam que vacas HPB de alta produção também apresentam estro de curta duração. Existem relatos de que há uma relação negativa entre a produção de leite e a duração do estro (WILTBANK et al. 2006). Esses autores especulam que vacas de alta produção apresentam diminuição das concentrações circulantes de E2, decorrente do aumento do metabolismo deste esteróide (WILTBANK et al. 2006).

Dados brasileiros em novilhas Nelore submetidas à alta ingestão alimentar também demonstraram menor intensidade e duração de estro quando comparadas a novilhas com baixa ingestão (MOLLO et al. 2007b).

Em um estudo que avaliou a associação entre níveis de produção de leite e comportamento de estro, Lopez et al. (2004) observaram menor duração (6,2 vs 10,9 h) e intensidade (6,3 vs 8,8 aceites de monta) de estro nas vacas de maior produção (>39,5 Kg/d) comparado às de menor produção (<39,5 Kg/d) de leite. Essas diferenças de comportamento estral entre categorias distintas de animais dentro da mesma raça, parecem estar relacionadas aos menores níveis circulantes de E2 em vacas lactantes comparado às novilhas (SARTORI et al. 2002; SARTORI et al. 2004) e menor E2 em vacas de maior produção de leite comparado a vacas de menor produtividade (LOPEZ et al. 2004). Outros pesquisadores sugeriram que fatores tais como idade, peso e saúde dos cascos são os maiores contribuintes para diferenças em expressão de estro entre os animais. Entretanto, aparentemente, nenhum estudo havia avaliado as características de estro em vacas HPB adultas não lactantes, as quais têm idade e peso similares às lactantes, porém tendem a ter concentrações circulantes de E2 mais elevados (SARTORI et al. 2002).

Esses dados são indicativos de que é necessário conhecer as características do estro comportamental e da ovulação para implantar eficientes programas de detecção de cio, levando em consideração as diferenças entre *Bos indicus* e *Bos taurus*.

1.4 Desenvolvimento folicular e luteal

Relatos de literatura em fêmeas *Bos taurus* com duas ondas de crescimento folicular apresentam folículos ovulatórios com diâmetros de 17,1 e 16,5 mm para a primeira e segunda onda, respectivamente (GINTHER et al. 1989). Porém em vacas *Bos indicus*, os diâmetros relatados foram de 11,3 e 12,3 mm, respectivamente (FIGUEIREDO et al. 1997; SARTORELLI et al. 2005). A partir desses relatos poder-se-ia concluir que o diâmetro do folículo ovulatório em zebuínos é sempre menor do que em taurinos. Entretanto, outros relatos, dependendo da categoria animal e nível nutricional, descreveram folículos ovulatórios não tão diferentes entre novilhas Nelore (14,0 mm) (MOLLO et al. 2007b) e HPB (14,9 mm) (SARTORI et al. 2004).

O diâmetro do CL parece ser menor em *Bos indicus* do que em *Bos taurus*. Corpos lúteos de zebuínos variam de 17 a 21 mm de diâmetro (SEGERSON et al. 1984; RHODES et al. 1995; FIGUEIREDO et al. 1997), ao passo que em taurinos são relatados diâmetros entre 20 e 30 mm (GINTHER et al. 1989). Da mesma maneira, há relatos de que a concentração de P4 no CL também é inferior em zebuínos em relação aos taurinos (SEGERSON et al. 1984). Entretanto, esta última informação precisa ser confirmada, pois não necessariamente concentrações circulantes mais elevadas de P4 em *Bos taurus* sejam consequência de maior produção pelo CL. Pode, simplesmente, ser devido a um maior metabolismo desse hormônio.

1.5 Produção ou concentrações circulantes de hormônios esteróides

As baixas concentrações séricas de esteróides têm, potencialmente, numerosas conseqüências fisiológicas que podem comprometer a reprodução das vacas lactantes (SARTORI et al., 2004). A redução no pico de E2 circulante pode ser uma causa da menor duração do estro ou menor intensidade de comportamento estral em vacas lactantes (NEBEL et al., 1997; LOPEZ et al., 2004) ou da baixa taxa de detecção do estro, em vacas lactantes (Senger, 1994). Além disso, pode contribuir para falhas na fecundação e de desenvolvimento embrionário precoce (KING et al., 1994; DESOUZA & MURRAY, 1995) e pode influenciar em alguns tipos de anestro em vacas lactantes (WILTBANK et al., 2002).

Nolan et al. (1998) descreveram uma maior concentração sérica de P4 em novilhas com alimentação restrita comparadas às superalimentadas. Estas alterações nas concentrações sanguíneas de P4 e E2 podem afetar padrões de desenvolvimento folicular e a viabilidade de ovócitos e embriões (revisado por SARTORI et al., 2007).

Sangsitavong et al. (2002) ao comparar o metabolismo de hormônios esteróides em vacas lactantes e não-lactantes em dietas de baixa e alta ingestão alimentar observaram que animais em alta dieta apresentaram maior fluxo sanguíneo hepático e conseqüentemente maior metabolização de P4 e E2. Essa maior metabolização de esteróides em vacas lactantes favorece a ocorrência de duplas ovulações, menores taxas de fecundação e redução na expressão de estro.

Estudos têm relatado que vacas lactantes desenvolvem maior folículo ovulatório, mas têm menor concentração sérica de estradiol do que novilhas (SARTORI et al., 2004) ou vacas secas (DE LA SOTA et al., 1993). De fato, estudos que compararam novilhas a vacas lactantes (WOLFENSON et al., 2004); e vacas secas a vacas lactantes (DE LA SOTA et al., 1993) observaram concentrações séricas de hormônios esteróides inferiores nas vacas lactantes.

O maior metabolismo de E2 nas vacas lactantes leva o folículo a crescer mais antes que se alcance uma concentração suficiente de E2 para ser iniciada a cascata luteolítica ou para induzir o pico de GnRH/LH e conseqüente ovulação (SARTORI et al., 2004), o que explica o fato de vacas lactantes terem um maior tamanho do folículo ovulatório.

Murphy et al. (1991) ao estudar novilhas Friesian e Hereford sob diferentes dietas relataram que não houve diferença nas concentrações séricas de P4 entre os grupos, porém animais com baixa dieta apresentaram menor liberação de LH além de redução no diâmetro do folículo ovulatório e persistência do folículo dominante durante o estro e tendência a aumentar a proporção de ciclos estrais com três ondas de crescimento folicular.

Bergfeld et al. (1994) relataram também que novilhas alimentadas com baixa energia apresentaram menores folículos dominantes e menores concentrações periféricas de E2 que novilhas alimentadas com alta energia.

Novamente, há a necessidade de se confirmar se diferenças na P4 e E2 circulantes entre taurinos e zebrúinos são efetivamente devido a uma menor produção pelos ovários ou maior metabolismo. Além disso, deve-se estudar se essa diminuição nos níveis circulantes se exacerba com o aumento da ingestão de matéria seca/energia.

1.6 Produção ou concentrações circulantes de hormônios metabólicos

Existem muitas evidências de que os hormônios metabólicos interferem na liberação de GH, insulina, IGF-I e leptina, hormônios estes responsáveis pelo controle do desenvolvimento folicular (DISKIN et al., 2003).

O metabolismo de nutrientes das dietas difere totalmente entre vacas holandesas de alta produção e vacas de corte (SHINGU et al., 2002). Vacas holandesas apresentam balanço energético negativo no início da lactação devido ao aumento da mobilização de energia.

Conseqüentemente, apresentam aumento nos níveis séricos de GH e queda nos níveis de IGF-I e insulina no período pós-parto. Em contraste, vacas de corte (Japanese Black) tanto lactantes, como não-lactantes permanecem com as mesmas concentrações séricas de GH e insulina ao longo do ciclo estral (KAWASHIMA et al., 2007).

As concentrações plasmáticas de IGF-I durante o ciclo estral são superiores em zebuínos. Sartorelli et al. (comunicação pessoal 2007) relatam que zebuínos apresentam 129% maior nível de IGF-I quando comparados a taurinos. Alvarez et al. (2000) também observaram maiores níveis circulantes desse hormônio em Brahman quando compararam a Angus e Senepol. Estes aumentos dos níveis séricos de IGF-I em animais zebuínos explicam também porque os animais da raça Brahman apresentaram maiores concentrações plasmáticas de GH e insulina. O aumento de GH e IGF-I em Brahman também foi observado por Simpson (1994).

Kawashima et al. (2007) ao compararem vacas taurinas a zebuínas observaram que as vacas zebuínas lactantes e não lactantes apresentaram as mesmas concentrações de hormônios metabólicos durante o ciclo estral. Em contraste, vacas taurinas lactantes apresentaram mudanças no metabolismo de hormônios metabólicos. Estes autores verificaram que as concentrações de insulina modificaram-se ao longo do ciclo estral em zebuínos, mas esta alteração não foi observada em taurinos. Isto demonstra que os níveis de insulina acompanham as concentrações de E2 durante o desenvolvimento folicular. Dessa forma, a secreção de E2 pelos folículos aumenta a secreção de insulina pelo pâncreas. Neste mesmo estudo, Kawashima et al. (2007) relataram que as concentrações de IGF-I aumentaram durante a fase folicular e diminuíram

durante a fase luteal, tanto em fêmeas zebuínas como taurinas. Estes resultados sugerem que os esteróides ovarianos sofrem ação da ciclicidade de IGF-I, mais do que do estado nutricional (KAWASHIMA et al., 2007).

Esses dados são indicativos de que é necessário conhecer a produção de hormônios metabólicos em dietas de alta e baixa ingestão de matéria seca em *Bos indicus* e *Bos taurus*.

2. Influência da nutrição na reprodução

O Brasil é um dos países que mais geram produtos utilizando biotecnologias da reprodução (VIANA & CAMARGO, 2007), porém com resultados muito variáveis. Uma das razões para isso está no fato de haver pouco conhecimento da fisiologia reprodutiva e da influência nutricional nas raças taurinas e zebuínas manejadas nas condições de clima tropical.

A nutrição está entre os fatores que mais afetam o desempenho reprodutivo de fêmeas bovinas. Por isso, as fêmeas de elevado mérito genético que são utilizadas como doadoras de embriões devem estar sob um manejo nutricional adequado. Neste sentido, existem particularidades entre a fisiologia reprodutiva de *Bos indicus* e *Bos taurus* que devem ser levadas em conta no emprego do manejo alimentar, inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE) e de aspiração guiada por ultrassom juntamente à produção in vitro de embriões.

A suplementação energética é uma prática comum em gado de leite, principalmente pelo seu papel no aumento da densidade energética da dieta. Devido às diferenças na ingestão de matéria seca (IMS) e no nível de produção de leite, os resultados das pesquisas com gado de leite não são aplicáveis na produção de carne (SINCLAIR et al. 2000).

A densidade energética da dieta é o fator nutricional que, em curto prazo, provoca maiores alterações na reprodução. Associado à energia contida na dieta, a quantidade e tipo de proteína também são importantes. Para um bom aproveitamento tanto de energia quanto de proteína é importante que haja um correto balanceamento entre eles, além de sincronia na taxa de degradação entre as fontes de proteína e energia da dieta (SINCLAIR et al. 2000). Além disso, o consumo excessivo ou deficiente de outros nutrientes, como vitaminas, macro e micro minerais tem sido relacionado ao baixo desempenho reprodutivo dos bovinos (SANTOS & AMSTALDEN 1998).

Por isso, as estratégias nutricionais utilizadas no rebanho podem resultar em melhora significativa nas taxas reprodutivas. Animais que recebem dieta muito acima das necessidades de manutenção associada a um alto ECC têm a produção de embriões prejudicada, e quando associada a um baixo ECC o efeito da dieta pode ser positivo na produção de embriões (ADAMIAK et al. 2005). Mudanças agudas na dieta, com níveis abaixo ou acima da manutenção, não parecem estar associadas às mudanças nas concentrações de gonadotrofinas. Estão relacionadas principalmente às alterações em hormônios metabólicos, como hormônio do crescimento (GH), insulina, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), ou leptina (WEBB et al. 2004).

Além disso, já foi observado que animais com maior ingestão alimentar têm um maior metabolismo hepático levando à queda nas concentrações circulantes de hormônios esteróides [estradiol (E2) e progesterona (P4)], apesar de ovularem folículos maiores (SARTORI et al. 2002; SARTORI et al. 2004). Esta queda se deve a um aumento na taxa de degradação hepática desses hormônios (PARR et al. 1993a, b; SANGSRITAVONG et al. 2002; VASCONCELOS et al. 2003). Em zebuínos, esse fenômeno também foi observado, onde vacas da raça Nelore não

lactantes submetidas à alta IMS, tiveram um pico pré-ovulatório de E2 inferior do que aquelas com baixa IMS, apesar de não ter havido diferença no tamanho máximo do folículo ovulatório (MARTINS et al. 2008; SARTORI & BARROS 2011).

As baixas concentrações séricas de esteróides têm, potencialmente, numerosas consequências fisiológicas que podem comprometer a reprodução das vacas lactantes (Sartori et al. 2004). A redução no pico de E2 circulante pode ser uma causa da menor duração do estro ou menor intensidade de comportamento estral em vacas lactantes (NEBEL et al. 1997; LOPEZ et al. 2004) ou da baixa taxa de detecção do estro, em vacas lactantes. Além disso, pode contribuir para falhas na fecundação e no desenvolvimento embrionário precoce (DESOUZA & MURRAY 1995) e pode influenciar em alguns tipos de anestro em vacas lactantes (WILTBANK et al. 2002). Nolan et al.(1998) descreveram uma maior concentração sérica de P4 em novilhas com alimentação restrita comparadas às superalimentadas. Estas alterações nas concentrações sanguíneas de P4 e E2 podem afetar padrões de desenvolvimento folicular e a viabilidade de ovócitos e embriões [revisado por SARTORI et al. (2007)].

A nutrição pode afetar a reprodução através do eixo hipotálamo-hipófise-gônada. Isto se deve à participação da nutrição na foliculogênese, principalmente através de mecanismos de sinalização metabólica (SCARAMUZZI et al. 2006) além de alteração no metabolismo de alguns hormônios por mudanças no fluxo sanguíneo hepático.

Quando a mudança na dieta aconteceu por um período curto, não foram observadas grandes alterações no eixo hipotálamo-hipófise-gônada. No entanto, a redução de glicose associada à dieta restrita pode influenciar a função hipotalâmica e hipofisária. A restrição energética parece promover efeitos inibitórios no eixo hipotálamo-hipófise, por diminuição da

pulsatilidade de secreção de LH, acarretando na diminuição da taxa de crescimento folicular (BOSSIS et al. 1999; DISKIN et al. 2003).

Os mecanismos de sinalização e regulação da liberação de GnRH que podem ser influenciados pela nutrição ainda são pouco entendidos. Acredita-se que opióides endógenos atuem como neuromoduladores da liberação de GnRH. E neste mecanismo de peptídeos opióides, a restrição alimentar pode alterar a pulsatilidade de GnRH, possivelmente mediado pelo neuropeptídeo Y (NPY), o qual parece desempenhar uma função na regulação da ingestão alimentar e conseqüentemente no balanço energético dos ruminantes (MCSHANE et al. 1993). O NPY é um potente inibidor da liberação de LH além de estimular a ingestão alimentar, ao contrário da leptina. Além disso, a glicose aparentemente também age no sistema nervoso central, modulando a liberação de GnRH, conseqüentemente a liberação de LH (DISKIN et al. 2003). No entanto, este processo de controle da liberação de GnRH parece influenciar apenas a liberação de LH sem grandes alterações nas concentrações de FSH. Esta informação baseia-se em estudos que examinaram os efeitos da nutrição na secreção de FSH e indicaram claramente que a restrição alimentar crônica ou aguda não interferiu precisamente na síntese ou secreção de FSH, e que a carência de FSH não impediu a ovulação em novilhas submetidas à restrição alimentar (DISKIN et al. 2003).

Bossis et al. (1999) induziram nutricionalmente novilhas de corte a condições anovulatórias restringindo a dieta e observaram falha na ovulação apenas por volta de 32 semanas após o início da restrição alimentar. Estes relataram redução nas concentrações de LH acompanhada de decréscimo nas concentrações de estradiol e falência na ovulação no último ciclo estral antes de entrarem em anestro.

A interação entre a liberação de gonadotrofinas e fatores intrafoliculares interfere no desenvolvimento folicular e está intimamente ligada ao estado nutricional (WEBB et al. 2004). Animais submetidos a altos planos nutricionais por um curto período apresentam um menor recrutamento de folículos por onda folicular, maior taxa de crescimento do folículo ovulatório e maiores taxas de ovulação (BOSSIS et al. 1999).

Mudanças na dieta por um curto período são capazes de alterar o metabolismo dos ruminantes, alterando alguns hormônios metabólicos, dentre eles o GH, a insulina, o IGF (principalmente o IGF-I) e a leptina, que tem grande participação na função ovariana (WEBB et al. 2004). Porém, estas modificações e suas consequências podem variar de acordo com a condição corporal dos animais (ADAMIAK et al. 2005).

Alguns trabalhos têm sido desenvolvidos observando aumento no número de folículos recrutados na onda através do aumento dos níveis ingeridos de energia por um período curto de tempo (GUTIÉRREZ et al. 1997; GONG et al. 2002; FRERET et al. 2006). A aplicabilidade desta prática seria aumentar a resposta superovulatória para coleta de embriões in vivo e também para aumentar o número de folículos aspirados para produção de embriões in vitro. Entretanto, outros trabalhos observaram efeitos contrários (SARTORI & MOLLO 2007; SARTORI & GUARDIEIRO 2010). Há uma possibilidade de que essa contradição entre os estudos seja, pelo menos parcialmente, devido a diferenças raciais dos animais utilizados.

Em um dos nossos primeiros trabalhos com fêmeas da raça Nelore (MOLLO et al. 2007a) observou-se que novilhas submetidas à alta ingestão alimentar apresentaram menor resposta superovulatória, refletida tanto pela menor quantidade de ovulações quanto pelo menor número de embriões colhidos. Esta observação é conflitante com relatos de estudos de outras raças, principalmente taurinas, em que a alta ingestão de matéria seca/energia influenciou de forma

positiva a população de folículos emergentes na onda e a resposta superovulatória dos animais, apesar de potencialmente reduzir a qualidade embrionária.

A ingestão de diferentes níveis nutricionais por um período curto de tempo pode influenciar o recrutamento de pequenos folículos, sem afetar as concentrações de FSH (GUTIÉRREZ et al. 1997; ARMSTRONG et al. 2001; GONG et al. 2002), resultando em maior número de folículos ovulados após tratamento superovulatório em animais com alta ingestão alimentar (GONG et al. 2002). Este aumento tem sido associado à maior concentração plasmática de IGF-I e insulina (FRERET et al. 2006). Isto acontece porque na fase em que os folículos não são dependentes de gonadotrofinas, mas sim de fatores de crescimento (pré-antral), existe uma grande influência de fatores de crescimento na estimulação folicular, sobretudo de IGF (WEBB et al. 2004).

As concentrações de IGF estão altamente relacionadas com a dieta ingerida, portanto, o recrutamento folicular pode potencialmente ser alterado de acordo com a nutrição fornecida. Além do IGF, outros hormônios como a insulina, GH e leptina podem estar mediando o efeito da nutrição na função ovariana, no entanto os mecanismos e interação entre estes hormônios ainda não estão bem estabelecidos.

Dietas que modulam a produção de acetato e propionato no rúmen direcionam a produção de glicose, pois o propionato é um importante precursor para a gliconeogênese no fígado, aumentando assim a disponibilidade de energia. As concentrações de glicose, por sua vez, estão relacionadas à produção de insulina e IGF-I, modulados pelo GH (THOMAS et al. 1997). Novilhas com alta ingestão de energia tiveram níveis circulantes de glicose, insulina e IGF-I aumentados (FRERET et al. 2006).

Insulina e IGF-I possuem efeito esteroidogênico nos folículos, além de atuar aumentando a responsividade às gonadotrofinas (GONG et al. 2002). No entanto, a leptina inibe a esteroidogênese induzida por gonadotrofinas e/ou insulina in vitro, porém, em níveis fisiológicos, parece não ser capaz de alterar a proliferação das células da granulosa.

Quando novilhas de corte foram alimentadas com altos níveis energéticos, foi observado um aumento na taxa de crescimento folicular comparadas às novilhas ingerindo baixo nível de energia (ARMSTRONG et al. 2001; MOLLO et al. 2007b; SARTORI & BARROS 2011, MOLLO et al.2007). A estimulação folicular através de IGF-I e insulina fazem com que a taxa de crescimento folicular aumente, determinando assim, maior diâmetro do folículo dominante em animais que recebem dietas com altos níveis energéticos (MURPHY et al. 1991; ARMSTRONG et al. 2001; MOLLO et al. 2007b; SARTORI & BARROS 2011). Ao contrário, animais em restrição demonstraram diminuição na taxa de crescimento folicular e diminuição do tamanho do folículo dominante em relação a animais recebendo dieta de manutenção ou de alta IMS (BOSSIS et al. 1999; MOLLO et al. 2007b; SARTORI & BARROS 2011).

O tamanho do folículo dominante também é influenciado pela concentração circulante de E2, que controla a liberação de FSH e LH através de retroalimentação positiva e negativa, podendo estar mais baixa em animais com alto nível dietético devido ao seu maior metabolismo hepático (SARTORI et al. 2004).

Alterações na dieta também mudaram o número de ondas durante o ciclo estral em novilhas, sendo predominantemente três em animais com 70% e duas em animais com 180% da dieta de manutenção (MURPHY et al. 1991). Estudos recentes no Brasil com um número maior de unidades experimentais, entretanto, não confirmaram esses resultados (MOLLO et al. 2007b).

3. Uso de benzoato de estradiol para sincronização da emergência da onda folicular em *bos taurus* e *bos indicus*

A pecuária brasileira, principalmente a de corte, ocupa hoje uma posição de destaque na economia do país. Atualmente, o Brasil é o primeiro exportador de carne in natura, sendo seguido pela Austrália e Estados Unidos. O rebanho bovino no Brasil, em 2010, atingiu 176,6 milhões de cabeças, sendo que desse total, 40% é representado por fêmeas acima de 2 anos (aproximadamente 70 milhões). Além disso, é importante destacar que, 80% é constituído de bovinos de corte com origem predominantemente *Bos indicus* (ANUALPEC 2010).

Atualmente, muitos países utilizam a IA em quase a totalidade de seus rebanhos bovinos. Calcula-se que mais de 106 milhões de fêmeas sejam anualmente inseminadas em todo o mundo. No entanto, no Brasil, apesar de a venda de sêmen ter crescido 50% nos últimos 10 anos ainda existe a necessidade de se investir em biotecnologias que visam eficiência reprodutiva e melhoramento genético a fim de promover o crescimento da pecuária nacional. No ano de 2011, a ASBIA (Associação Brasileira de Inseminação Artificial) apresentou um aumento na comercialização de sêmen de 23,5% com 11,9 milhões de doses, em relação a 2010. Para se ter uma idéia da dimensão desse número, em 2006 foi de 6,7 milhões de doses, mostrando que em cinco anos houve uma evolução de 76,7% (ASBIA 2010). No entanto, esse número ainda é baixo, pois com todo esse volume de sêmen comercializado, estima-se que tenhamos pouco mais de 9,4 milhões de vacas inseminadas, representando pouco mais de 13% do total do rebanho (ANUALPEC 2010).

Sabe-se que o uso da IA é o principal responsável pelo progresso genético da indústria leiteira. No entanto, esta biotécnica ainda não é largamente utilizada na indústria de carne. Em

contrapartida, a necessidade do uso da IA vem crescendo devido à pressão pelo melhoramento genético visando aumento da produtividade (MAPLETOFT et al. 2008).

Através da IA convencional, é possível promover o melhoramento genético. No entanto, o seu desenvolvimento sempre foi dificultado, principalmente, pelos problemas relacionados à detecção de cio, duração do anestro pós-parto e puberdade tardia (BARUSELLI et al. 2006). Dessa forma, nos programas de IA que requerem a observação de cio, os resultados são lentos e o custo é elevado, o que faz com que a técnica se torne ineficiente (MAPLETOFT et al. 2008).

Na atualidade, os métodos de sincronização da ovulação para IA em tempo fixo (IATF) possibilitam contornar esses problemas. Com o advento da IATF tornou-se possível obter melhoramento genético associado à eficiência reprodutiva.

No entanto, o sucesso da IATF depende de um controle preciso do crescimento folicular, o qual envolve induzir a emergência de uma nova onda folicular, controlar a duração do crescimento folicular até o estágio pré-ovulatório, sincronizar a inserção e a retirada da fonte de P4 exógena e endógena e induzir a ovulação sincronizada em todos os animais simultaneamente (BARUSELLI et al. 2006).

Estradiol é um hormônio utilizado com grande sucesso na sincronização da emergência da onda folicular em bovinos [Revisado por BÓ et al. (2002)]. BO et al. (1994b) concluíram que o E2 foi mais efetivo em suprimir o crescimento folicular quando estava associado à P4. Além disso, levantaram a hipótese de que o efeito supressivo do E2 juntamente com a P4 é devido ao efeito inibitório na liberação de FSH e LH e que tais gonadotrofinas necessitam permanecer suprimidas por, no mínimo, 24 h para que o crescimento folicular seja efetivamente interrompido.

Uma vez que o E2 é metabolizado, elimina-se o efeito inibitório. Consequentemente, é observado um aumento nas concentrações circulantes de FSH (pico de FSH), seguido pela emergência de uma nova onda folicular (MARTÍNEZ et al. 2005; MARTÍNEZ et al. 2007)

Em trabalhos subsequentes, foi observado que a combinação do E2 com a P4, de fato, determina a regressão folicular e induz a emergência de uma nova onda folicular dentro de um intervalo consistente após o tratamento (em média $4,3 \pm 0,1$ dias após o tratamento), independente da fase de desenvolvimento folicular (D1, D3, D6 ou D9 do ciclo estral) na qual o protocolo foi iniciado (BÓ et al. 1994a; MAPLETOFT et al. 2008).

Adicionalmente, o efeito de diferentes doses de BE na liberação de gonadotrofinas foi testado em fêmeas de corte cruzadas, tratadas com implante intravaginal de progesterona (PRID) ou ablação folicular. Os autores concluíram que o efeito supressivo do E2 sobre o FSH é dose-dependente (O'ROURKE et al. 2000; BURKE et al. 2003).

Entretanto, na literatura, a maioria dos trabalhos utilizou tratamentos com 17β -estradiol ou valerato de estradiol (VE). Poucos trabalhos efetivamente testaram diferentes doses de BE. Além disso, a maioria dos trabalhos foi desenvolvida apenas com animais taurinos. No entanto, vale ressaltar que o rebanho brasileiro é composto em sua grande maioria por animais zebuínos. É sabido que a fisiologia envolvida na resposta ao BE, em zebuínos, é pouco estudada e a comparação dessa raça às raças taurinas também é escassa.

Dessa forma, faz-se necessário avaliar o efeito de diferentes doses de BE associadas à P4 na sincronização da emergência da onda folicular em vacas de raças taurinas versus zebuínas em condições nacionais.

CAPÍTULO 2

Experimento 1

**“Função ovariana e hormônios circulantes em
vacas não lactantes das raças Nelore e Holandês Preto
e Branco”**

RESUMO

A função ovariana e as concentrações circulantes dos hormônios reprodutivos e metabólicos foram comparadas em vacas *Bos taurus* e *Bos indicus* sob as mesmas condições climáticas e nutricionais. Vacas secas das raças Nelore (n=12) e Holandês Preto e Branco (HPB; n=12) foram mantidas em baias individuais, recebendo dieta de manutenção de acordo com o NRC (2000). O ECC e o PC se mantiveram em $3,1 \pm 0,1$ e $2,8 \pm 0,2$ (escala de 1 a 5) e 508 ± 17 e 575 ± 20 kg, para Nelore e HPB, respectivamente. Após 21 dias de adaptação, o estro foi sincronizado e os animais monitorados diariamente durante um intervalo ovulatório, através de ultrassonografia ovariana, usando um transdutor linear de 7,5 MHz. Durante a primeira onda folicular, os exames ultrassonográficos foram realizados duas vezes ao dia. Amostras de sangue foram colhidas uma vez ao dia para dosagens hormonais. Os resultados foram analisados pelo procedimento Mixed do SAS ($P < 0,05$) e apresentados como média dos quadrados mínimos \pm EP. Foi observado que 80% das vacas Nelore e 60% das vacas HPB apresentaram três ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral. Todas as demais apresentaram duas ondas. O comprimento médio do ciclo estral foi similar entre Nelore e HPB (23 dias; variando de 21 a 26). Foram observadas diferenças substanciais quanto ao número de folículos antrais entre Nelore e HPB. À emergência da onda, o número de folículos de 2 a 5 mm presentes nos ovários foi de $42,7 \pm 5,9$ para Nelore (variando de 25 a 100) e $19,7 \pm 3,2$ para HPB (variando de 5 a 40). O desvio folicular ocorreu, em média, 2,3 dias após a ovulação, independente de raça, quando o maior folículo atingiu $7,0 \pm 0,2$ e $8,9 \pm 0,4$ mm de diâmetro em Nelore e HPB, respectivamente. O diâmetro máximo do folículo ovulatório ($15,7 \pm 0,3$ vs $13,4 \pm 0,3$ mm), assim como o volume do CL (7611 ± 512 vs 4917 ± 548 mm³), foram maiores em taurinos que em zebuínos. Entretanto, as concentrações plasmáticas de progesterona no D7 ($2,8 \pm 0,16$ vs $2,0 \pm 0,04$ ng/mL) e no D14 ($4,6 \pm 0,40$ vs $4,1 \pm 0,18$ ng/mL) do ciclo estral e o pico pré-ovulatório de estradiol ($12,7 \pm 0,98$ vs $7,7 \pm 0,67$ pg/mL), assim como as concentrações plasmáticas pré-prandiais de insulina ($9,9 \pm 1,51$ vs $3,0 \pm 0,70$ μ UI/mL) foram maiores em fêmeas zebuínas que em taurinas. Além disso, as concentrações plasmáticas pré-prandiais de insulina foram mais elevadas na fase estrogênica do que progesterônica tanto em Nelore ($11,9 \pm 2,05$ vs $8,3 \pm 1,47$ μ UI/mL) quanto em HPB ($4,2 \pm 1,05$ vs $2,2 \pm 0,64$ μ UI/mL). Portanto, foi demonstrado que mesmo em condições climáticas e nutricionais similares há grandes diferenças na função ovariana e nos hormônios circulantes entre taurinos e zebuínos.

2.1 OBJETIVO

Comparar a função ovariana e a concentração circulante dos hormônios reprodutivos e metabólicos em vacas *Bos taurus* e *Bos indicus* sob as mesmas condições climáticas e nutricionais.

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Animais

Foram utilizadas 12 vacas Nelores (*Bos indicus*) e 12 vacas Holandesas (*Bos taurus*) não lactantes com condição, peso corporal (PC) e idade (3 a 6 anos) semelhantes. As vacas foram alojadas em baias individuais (acesso individual ao cocho), sem acesso a pastagem, a fim de controlar a ingestão alimentar de cada animal, com água à vontade e o sal mineral foi fornecido na dieta.

2.1.2 Dietas tratamento

Todos os animais passaram por um período de adaptação de sete dias e receberam uma dieta de manutenção de acordo com o NRC (2000), composta de 42,8% de bagaço de cana; 45,7% de milho moído; 3,2% de farelo de soja; 1,2% de uréia; 5,7% de melaço; 1,4% de sal mineral, totalizando 71% de matéria seca (MS) na dieta total. A ingestão em MS por kg de PC foi de 1,37% para Nelore e 1,54% para Holandês. O ECC e o PC se mantiveram em $3,1 \pm 0,1$ e $2,8 \pm 0,2$

(escala de 1 a 5) e 508 ± 17 e 575 ± 20 kg, para Nelore e Holandês, respectivamente. Após este período de adaptação, as vacas permaneceram mantidas em sistema de confinamento em baias individuais, recebendo esta mesma dieta, formulada para atender às necessidades de manutenção do peso e da condição corporal. As dietas foram oferecidas durante todo o período experimental, incluindo 7 dias de dieta de adaptação e, aproximadamente, 23 dias de dieta tratamento (dieta tratamento foi oferecida até o momento em que todos os animais completaram um ciclo estral).

Para certificação da ingestão desejada, o PC e ECC foram avaliados semanalmente e a dieta ajustada de acordo com o peso dos animais. Além disso, diariamente a sobra do cocho, quando existia, foi pesada e a porcentagem de matéria seca da dieta foi avaliada.

2.1.3 Sincronização de estro

Simultaneamente ao início do fornecimento das dietas experimentais, as vacas tiveram o ciclo estral sincronizado com uso de hormônios, sendo, no Dia 0 do protocolo, colocação de um dispositivo intravaginal de P4 (CIDR, Pzifer Saúde Animal) e aplicação de GnRH (Gestran Plus, Agener União). Nos Dias 6 e 7 foi aplicada $PGF2\alpha$ (Veteglan, Hertape Calier Saúde Animal S/A) e a remoção do implante foi realizada no Dia 7 (**Figura 1**).

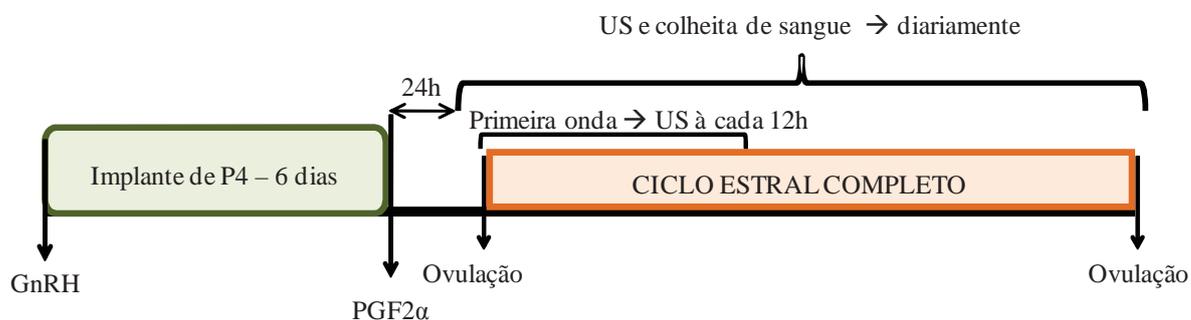


FIGURA 1. Esquema representativo do delineamento experimental, mostrando o protocolo de sincronização do cio, o período dos exames ultrassonográficos e das colheitas de sangue.

2.1.4 Exames ultrassonográficos, colheita de sangue e dosagens hormonais

Exames ultrassonográficos ovarianos transretais utilizando-se uma probe linear de 7,5 MHz foram realizados duas vezes ao dia (12/12 horas) a partir do Dia 8 do protocolo de sincronização (início dos exames 24 h após a remoção do implante de P4) até o estabelecimento da dominância folicular na primeira onda folicular após a ovulação, após esse período, os exames ultrassonográficos passaram a ser realizados uma vez ao dia até a confirmação da ovulação no ciclo estral subsequente. Os exames ultrassonográficos foram realizados a fim de detectar e comparar o momento da emergência da primeira onda, o número de folículos recrutados, o momento da seleção do folículo dominante, o diâmetro do folículo ovulatório, o número de ondas foliculares, a taxa de crescimento do folículo ovulatório e o crescimento luteal entre as fêmeas das duas subespécies, durante um ciclo estral completo.

Colheitas de sangue foram realizadas diariamente durante todo o período experimental. O plasma colhido foi congelado a -20°C para posterior avaliação das concentrações plasmáticas de IGF-I total (Quimioluminescência), P4 (Quimiluminescência), E2e Insulina (Radioimunoensaio).

As dosagens de P4 e IGF-I plasmáticos foram realizadas por Quimioluminescência (Immulite 2000, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA) no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia da ESALQ, USP, utilizando-se um kit comercial conforme normas do fabricante, sendo os CVs intra-ensaio de 6,2% e 7,1% para P4 e IGF-I, respectivamente. As dosagens de Insulina foram realizadas por Radioimunoensaio no Laboratório de Endocrinologia Animal do Departamento de RARV da FMVZ, UNESP, utilizando-se um kit comercial (TKIN5, Count-A-Count, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA) conforme normas do fabricante, sendo o CV intra-ensaio de 3,5%.

A análise estatística das concentrações circulantes de P4 e Insulina, obtidas sob medidas repetidas, foi realizada sob um modelo que incluiu a matriz de correlação de melhor ajuste (simétrica composta heterogênea para P4 e autorregressiva de primeira ordem para Insulina), utilizando a metodologia dos modelos lineares generalizados (NELDER & WEDDERBURN 1972) com o procedimento GLIMMIX do SAS ($P < 0,05$).

Para P4, consideraram-se os efeitos fixos de raça, dia (Dia 7 e Dia 14) e a interação raça*dia, e como aleatório o efeito de vaca, sob distribuição normal. Para Insulina, consideraram-se os efeitos fixos de raça, fase (estrogênica e progesterônica) e a interação raça*fase, e como aleatório o efeito de vaca, sob distribuição binomial negativa e função de ligação logarítmica.

Para as variáveis número de folículos antrais no momento da emergência e duração do ciclo estral (em dias), considerou-se o efeito fixo de raça, sob distribuição poisson e função de ligação logarítmica. Para as demais variáveis utilizou-se o mesmo modelo sob distribuição normal.

2.2 RESULTADOS

Os resultados estão apresentados como média dos quadrados mínimos \pm EP. Foi observado que 80% das vacas Nelore e 60% das vacas HPB apresentaram três ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral. Todas as demais apresentaram duas ondas.

O comprimento médio do ciclo estral foi similar entre Nelore e Holandês (23 dias; variando de 21 a 26). Foram observadas diferenças substanciais quanto ao número de folículos antrais entre as raças Nelore e HPB. À emergência da onda, o número de folículos de 2 a 5 mm presentes nos ovários foi maior nas vacas Nelore do que nas vacas HPB. Além disso, esta

diferença no número de folículos entre as raças persistiu durante todo o ciclo estral. O desvio folicular ocorreu no mesmo momento, independente de raça.

O diâmetro máximo do folículo ovulatório, assim como o volume do CL, foram maiores em taurinos que em zebuínos. Entretanto, as concentrações plasmáticas de P4 no D7 e no D14 do ciclo estral e o pico pré-ovulatório de E2, assim como as concentrações plasmáticas pré-prandiais de insulina foram maiores em fêmeas zebuínas que em taurinas. Além disso, as concentrações plasmáticas pré-prandiais de insulina foram mais elevadas na fase estrogênica do que progesterônica tanto em Nelore quanto em HPB. Todos estes resultados estão demonstrados na Tabela 1.

TABELA 1. Resultados (média \pm EP) das avaliações ultrassonográficas ovarianas e das dosagens hormonais realizadas durante o ciclo estral de vacas não lactantes das raças NEL e HPB.

	<i>Bos indicus</i> – NEL (n = 12)	<i>Bos taurus</i> – HPB (n = 12)	P
Duração do ciclo estral; d	23,0 \pm 0,5	23,0 \pm 0,5	>0,05
Folículos antrais à emergência (2 a 5 mm); n	42,7 \pm 5,9 (25 a 100)	19,7 \pm 3,2 (5 a 40)	<0,05
Momento do desvio folicular; dias após a ovulação	2,3 \pm 0,24	2,3 \pm 0,26	>0,05
Diâmetro do maior folículo no momento do desvio; mm	7,0 \pm 0,2 (6,1 a 8,2)	8,9 \pm 0,4 (7,5 a 10,5)	<0,05
Diâmetro máximo do folículo ovulatório; mm	13,4 \pm 0,3	15,7 \pm 0,3	<0,05
Pico pré-ovulatório plasmático de estradiol; pg/mL	12,7 \pm 0,98	7,7 \pm 0,67	<0,05
Volume do CL; mm ³	4917 \pm 548	7611 \pm 512	<0,05
Concentração plasmática de P4 no D7; ng/mL	2,8 \pm 0,16	2,0 \pm 0,04	<0,05
Concentração plasmática de P4 no D14; ng/mL	4,6 \pm 0,40	4,1 \pm 0,18	<0,05
Concentração plasmática pré-prandial de insulina; μ UI/mL	9,9 \pm 1,51	3,0 \pm 0,70	<0,05
Concentração plasmática pré-prandial de IGF-I; ng/mL	245,5 \pm 12,0	198,25 \pm 10,3	<0,05

2.3 CONCLUSÃO

Foi demonstrado que mesmo em condições climáticas e nutricionais similares há grandes diferenças na função ovariana e nos hormônios circulantes entre taurinos e zebuínos.

CAPÍTULO 3

Experimento 2

**“Efeito da dose de benzoato de estradiol em
associação à progesterona na sincronização da
emergência da onda folicular em vacas *Bos indicus* e
Bos taurus”**

RESUMO

O efeito da dose de benzoato de estradiol (BE) associadas à progesterona (P4) na sincronização da emergência da onda folicular foi avaliado em vacas *Bos indicus* e *Bos taurus*. Vacas não lactantes das raças Nelore (n=13) e HPB (n=11) foram mantidas em baias, recebendo dieta de manutenção de acordo com o NRC (2000). O ECC e o PC se mantiveram em $3,5 \pm 0,1$ e $3,0 \pm 0,2$ (escala de 1 a 5) e 535 ± 14 e 600 ± 23 kg, para Nelore e HPB, respectivamente. Durante o período de adaptação às dietas, as fêmeas receberam duas aplicações de PGF2 α (11 dias de intervalo, 150 μ g, i.m., Sincrocio, Ourofino Agronegócio, Brasil) e no dia da segunda aplicação foram tratadas com um dispositivo intravaginal de P4, o qual permaneceu por 10 dias (Sincrogest, Ourofino), associado a uma aplicação de BE (i.m., Sincrodiol, Ourofino). Foram testadas três doses de BE, sendo elas: 1, 2 e 4 mg. O experimento teve três repetições em um delineamento do tipo quadrado latino. Exames ultrassonográficos dos ovários foram realizados diariamente durante 9 dias a partir da aplicação de BE. Foram incluídas na análise estatística apenas as vacas que tiveram a emergência da onda folicular sincronizada pelo protocolo, ou seja, quando a emergência ocorreu entre 1 e 6 dias após o tratamento com BE+P4. Os resultados foram analisados por meio do PROC GLIMMIX do SAS e apresentados como média dos quadrados mínimos \pm EP. Como resposta aos tratamentos, 2,5% (1/39) das vacas Nelore não tiveram emergência da onda folicular sincronizada, tendo sido esta tratada com 1 mg de BE. Quanto às vacas HPB, 15,1% (5/33) não tiveram a emergência da onda sincronizada, sendo que três vacas haviam recebido 1 mg e as outras duas, 2 ou 4 mg de BE. Após os tratamentos com 1, 2 e 4 mg de BE, o FSH começou a subir nos seguintes momentos: $54,6 \pm 4,3$, $60,3 \pm 2,6$, $68,6 \pm 3,5$ horas, respectivamente ($P=0,02$), o pico de FSH foi observado às $83,9 \pm 5,6$, $89,5 \pm 3,8$, $104,2 \pm 4,2$ horas, respectivamente ($P=0,001$) e a emergência da onda ocorreu em $3,0 \pm 0,3$, $3,3 \pm 0,1$ e $3,8 \pm 0,2$ dias, respectivamente ($P=0,03$), independente de raça. Conseqüentemente, foi observado efeito de dose de BE no diâmetro do maior folículo 9 dias após os tratamentos, sendo $12,5 \pm 0,7$, $11,3 \pm 0,7$ e $10,4 \pm 0,7$ mm nas vacas que receberam 1, 2 e 4 mg de BE ($P=0,09$). Vacas da raça Nelore apresentaram maior número de folículos de 2 a 5 mm no dia da emergência ($25,0 \pm 4,4$) do que as HPB ($13,2 \pm 2,7$; $P=0,03$). Além disso, o desvio folicular ocorreu $3,0 \pm 0,2$ dias após a emergência, independente de raça, quando o maior folículo atingiu $7,3 \pm 0,4$ e $9,0 \pm 0,5$ mm de diâmetro em vacas Nelore e HPB, respectivamente. Também foi observado efeito de raça na taxa de crescimento do folículo dominante, sendo $1,6 \pm 0,1$ e $1,2 \pm 0,1$ mm/dia para HPB e Nelore, respectivamente ($P=0,007$) e nas concentrações plasmáticas de FSH no momento do pico, sendo $1,3 \pm 0,004$ e $1,0 \pm 0,04$ ng/mL para HPB e Nelore, respectivamente ($P=0,002$). Conclui-se que o momento da emergência folicular após tratamento com BE+P4 foi dose-dependente de BE tanto para vacas zebuínas quanto taurinas. Além disso, os efeitos de raça encontrados neste estudo corroboram resultados prévios deste mesmo grupo de pesquisa.

3.1 OBJETIVOS

Avaliar o efeito da dose de BE (1, 2 e 4 mg) associada à P4 na sincronização da emergência da onda folicular em vacas das raças Nelore (NEL) e Holandês Preto e Branco (HPB) recebendo dieta de manutenção.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP, Piracicaba-SP. Foram utilizadas 11 vacas HPB e 13 NEL, com escore de condição corporal (ECC) e peso corporal (PC) semelhantes, sendo $3,1 \pm 0,1$ e $2,8 \pm 0,2$ (escala de 1 a 5) e 508 ± 17 e 575 ± 20 kg, para NEL e HPB, respectivamente.

As fêmeas foram mantidas confinadas em baias com três animais por baia, com exceção de uma baia de HPB que permaneceu com apenas dois animais.

Durante todo o período experimental as fêmeas receberam dieta para manutenção do PC de acordo com NRC (2000). A dieta total era composta de 42,8% de bagaço de cana; 45,7% de milho moído; 3,2% de farelo de soja; 1,2% de uréia; 5,7% de melaço; 1,4% de sal mineral, totalizando 71% de matéria seca (MS) na dieta total. A ingestão em MS por kg de PC foi de 1,4% para NEL e 1,6% para HPB.

Durante o período de 11 dias de adaptação às dietas experimentais as fêmeas receberam duas aplicações de PGF 2α (Sincrocio, Ourofino Agronegócio, Brasil; 11 dias de intervalo) e no dia da segunda aplicação tiveram a emergência da onda sincronizada com um dispositivo

intravaginal de P4 (Sincrogest, Ourofino Agronegócio, Brasil) associado a uma aplicação de BE (Sincrodiol, Ourofino Agronegócio, Brasil).

Foram testadas três doses de BE, sendo elas: 1 mg, 2 mg e 4 mg nas raças NEL e HPB, em um delineamento fatorial 2 x 3. Para tanto foram formados seis grupos experimentais: grupo BE1-NEL (P4 + 1 mg de BE, n=12), grupo BE1-HPB (P4 + 1 mg de BE, n=11), grupo BE2-NEL (P4 + 2 mg de BE, n=12), grupo BE2-HPB (P4 + 2 mg de BE, n=11), grupo BE4-NEL (P4 + 4 mg de BE, n=12) e BE4-HPB (P4 + 4 mg de BE, n=11).

O experimento foi realizado em três repetições em um delineamento de quadrado latino, ou seja, todas as vacas passaram por todos os tratamentos. O final de cada repetição ocorreu após o estabelecimento da dominância folicular da onda sincronizada (9 dias após o início do tratamento). Nesse momento, o dispositivo de P4 foi retirado e no dia seguinte, iniciou-se a próxima repetição (Figura 2).

Ultrassonografia ovariana transretal foi realizada diariamente, utilizando um transdutor linear de 7,5 MHz, com o objetivo de detectar a emergência da onda folicular. Nesta avaliação foram contados todos os folículos com diâmetro ≥ 2 mm, presentes nos ovários. As avaliações ultrassonográficas foram realizadas durante a primeira onda de crescimento folicular iniciada após a sincronização (Figura 2). Além disso, amostras de sangue também foram colhidas diariamente para posteriores dosagens de FSH e E2.

A análise estatística da concentração plasmática de FSH, obtida sob medidas repetidas, foi realizada sob um modelo que incluiu a matriz de correlação de melhor ajuste (autorregressiva de primeira ordem), utilizando a metodologia dos modelos lineares generalizados (Nelder & Wedderburn 1972) com o procedimento GLIMMIX do SAS ($P < 0,05$). Consideraram-se os efeitos fixos de período, raça, tratamento (1, 2 ou 4 mg de BE), interação raça*tratamento, dia e suas interações simples, e como aleatórios os efeitos de vaca e de quadrado latino, sob distribuição normal.

As análises estatísticas para as variáveis: número de folículos, dia do desvio e dia da emergência folicular pós-tratamento foram realizadas utilizando a metodologia dos modelos lineares generalizados (NELDER & WEDDERBURN 1972) com o procedimento GLIMMIX do SAS ($P < 0,05$). Consideraram-se os efeitos fixos de período, raça, tratamento (1, 2 ou 4 mg de BE), interação raça*tratamento, dia e suas interações simples, e como aleatórios os efeitos de vaca e de quadrado latino, sob distribuição de poisson e função de ligação logarítmica. Para as demais variáveis utilizou-se o mesmo modelo sob distribuição normal.

Os resultados são apresentados como média dos quadrados mínimos \pm EP.

3.1 RESULTADOS

Como resposta aos tratamentos, 2,5% (1/39) das vacas NEL não tiveram emergência da onda folicular sincronizada, tendo sido esta tratada com 1 mg de BE. Quanto às vacas HPB, 15,1% (5/33) não tiveram a emergência da onda sincronizada, sendo que três vacas haviam recebido 1 mg e as outras duas, 2 ou 4 mg de BE.

Observou-se efeito dose-dependente do tratamento com BE, independente da raça, nas seguintes variáveis: dia da emergência da onda folicular após tratamento com BE, diâmetro do folículo dominante 9 dias após o tratamento com BE, concentração circulante de E2 24 horas após o tratamento com BE, no momento em que o FSH começou a subir (início do pico de FSH) após aplicação de BE e no momento em que ocorreu o pico de FSH (**Tabela 2**).

TABELA 2. Resultados das variáveis (média dos quadrados mínimos \pm EP) que apresentaram efeito de tratamento, independente da raça em vacas HPB e Nelore não lactantes tratadas com 1, 2 ou 4 mg de benzoato de estradiol.

	Tratamento (mg de BE)			P
	1	2	4	
Emergência da onda folicular após os tratamentos; dias	3,0 \pm 0,1	3,3 \pm 0,2	3,8 \pm 0,2	0,03
Diâmetro do maior folículo 9 dias após os tratamentos; mm	12,5 \pm 0,7	11,3 \pm 0,7	10,4 \pm 0,7	0,09
Concentração plasmática de E2, 24h após o tratamento com BE; pg/mL	37,3 \pm 8,5	64,7 \pm 4,3	108,9 \pm 7,0	<0,0001
Início do pico de FSH após tratamento com BE; horas	54,6 \pm 4,3	60,3 \pm 2,6	68,6 \pm 3,5	0,02
Momento do pico de FSH após o tratamento com BE; horas	83,9 \pm 5,6	89,5 \pm 3,8	104,2 \pm 4,2	0,001

No entanto, apesar do efeito dose-dependente do BE no dia da emergência da onda folicular, o momento do desvio folicular em relação à emergência da onda foi semelhante ($P > 0,10$), independente de raça e de tratamento. O desvio ocorreu, em média, $3,0 \pm 0,2$ dias após a emergência da onda folicular.

Em relação ao perfil do FSH de acordo com as diferentes doses de BE, observou-se uma interação dose/dia. Animais que receberam 1 mg de BE apresentaram maiores concentrações de FSH que os animais que receberam 2 e 4 mg 48h após o tratamento (D2). No D3 (72h após o

tratamento com BE) os animais que receberam 4 mg de BE apresentaram menores concentrações circulantes de FSH do que animais que receberam 1 e 2 mg. Além disso, nos animais que receberam 4 mg de BE os níveis de FSH ainda estavam elevados no D6 (144h após os tratamentos) comparados aos animais que receberam 1 mg (Figura 3).

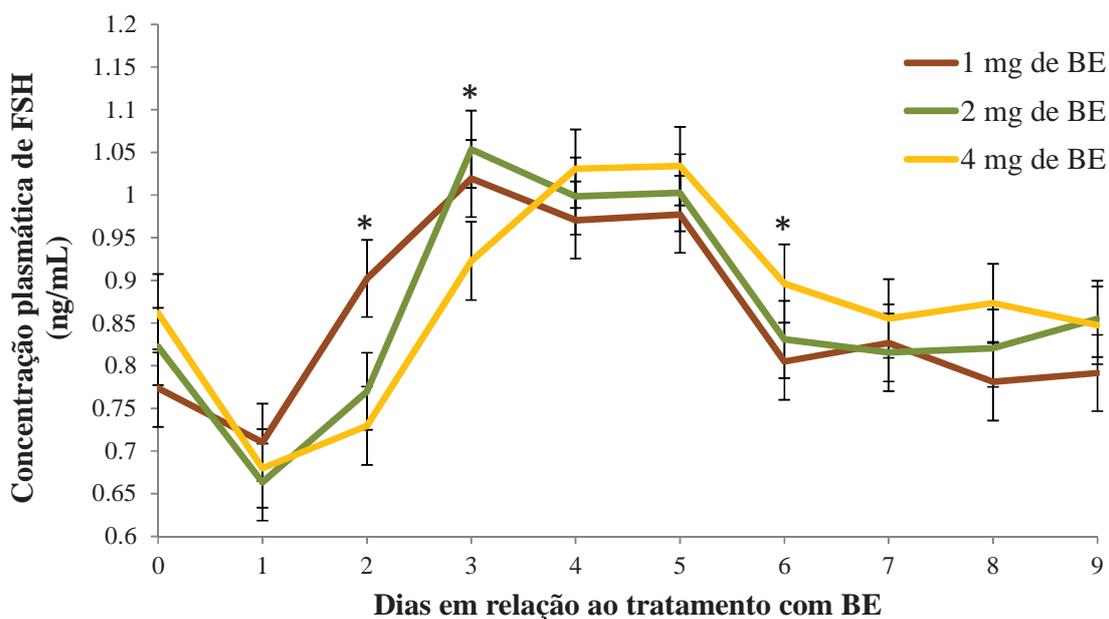


FIGURA 3. Concentrações plasmáticas de FSH durante 9 dias após o tratamento com 1, 2 ou 4 mg de BE em vacas HPB e Nelore não lactantes. Houve interação tratamento/dia (* $P < 0,05$).

Algumas variáveis apresentaram efeito de raça, independente do tratamento. Dentre elas: número de folículos pequenos (2 a 5 mm) presentes nos ovários no momento da emergência da onda folicular, diâmetro do maior folículo no momento do desvio folicular, taxa de crescimento (mm/d) do folículo dominante, concentração de E2 24 horas após os tratamentos com BE e concentração circulante de FSH no momento do pico (**Tabela 3**).

TABELA 3. Resultados das variáveis (média dos quadrados mínimos \pm EP) que apresentaram efeito de raça, independente do tratamento em vacas HPB e Nelore não lactantes tratadas com 1, 2 ou 4 mg de benzoato de estradiol.

	HPB (n=28)	NELORE (n=38)	P
Folículos de 2 a 5 mm no dia da emergência; n	13,2 \pm 2,7	25,0 \pm 4,4	0,03
Diâmetro do maior folículo no momento do desvio; mm	9,0 \pm 0,5	7,3 \pm 0,4	0,02
Taxa de crescimento do folículo dominante; mm/d	1,6 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1	0,007
Concentração plasmática de E2 24h após tratamento com BE; pg/mL	48,4 \pm 6,8	92,2 \pm 5,5	0,0001
Pico plasmático de FSH após o tratamento com BE; ng/mL	1,3 \pm 0,04	1,0 \pm 0,04	0,002

Apesar de a concentração plasmática de E2 24 horas após o tratamento com BE ter sido mais alta nas vacas NEL que nas HPB (Figura 3), não houve efeito de raça quanto ao dia da emergência da onda folicular após tratamento com BE ($P > 0,10$).

Em relação às concentrações circulantes de E2 24h após o tratamento com BE, observou-se efeito de tratamento e de raça (**Figura 4**). Além disso, foi observado que a resposta de E2 circulante às diferentes doses de BE foi mais acentuada nas vacas NEL, comparadas às HPB (Figura 4).

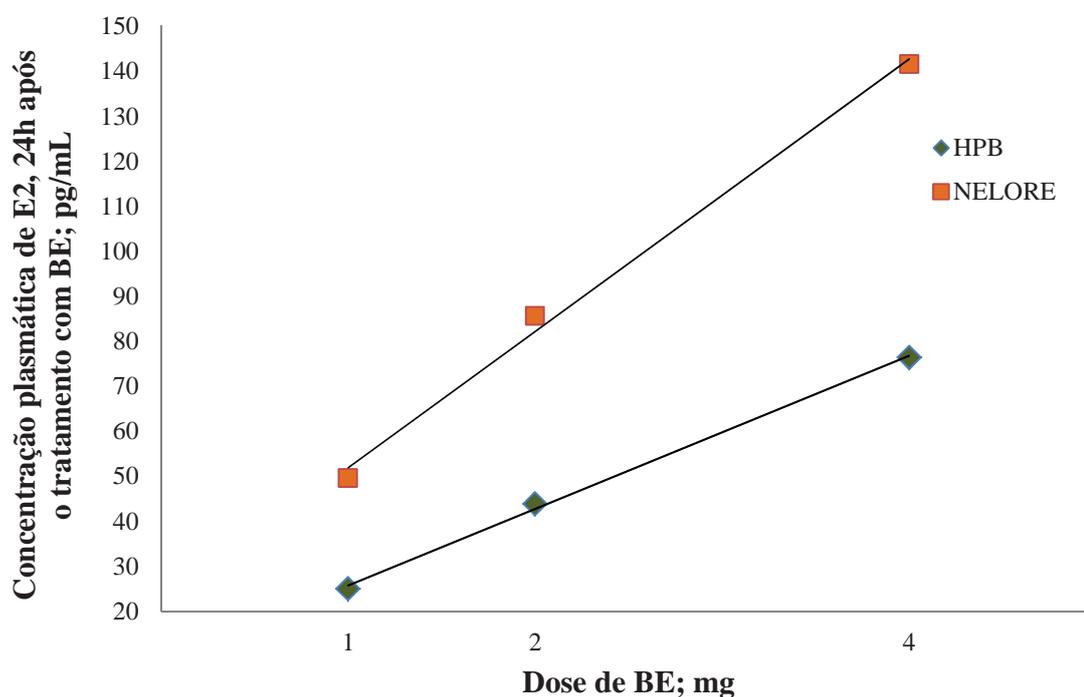


FIGURA 4. Concentrações plasmáticas de E2 24h após tratamento com 1, 2 ou 4 mg de BE em vacas HPB e Nelore não lactantes. Houve efeito de raça e de tratamento ($P < 0,05$).

Ao analisar o perfil de FSH nas duas raças, independente do tratamento, observou-se uma interação raça/dia. As fêmeas da raça HPB apresentaram maiores concentrações circulantes de FSH nos dias 3 (72h) e 5 (120h) após o tratamento com BE comparadas às fêmeas da raça NEL (Figura 5).

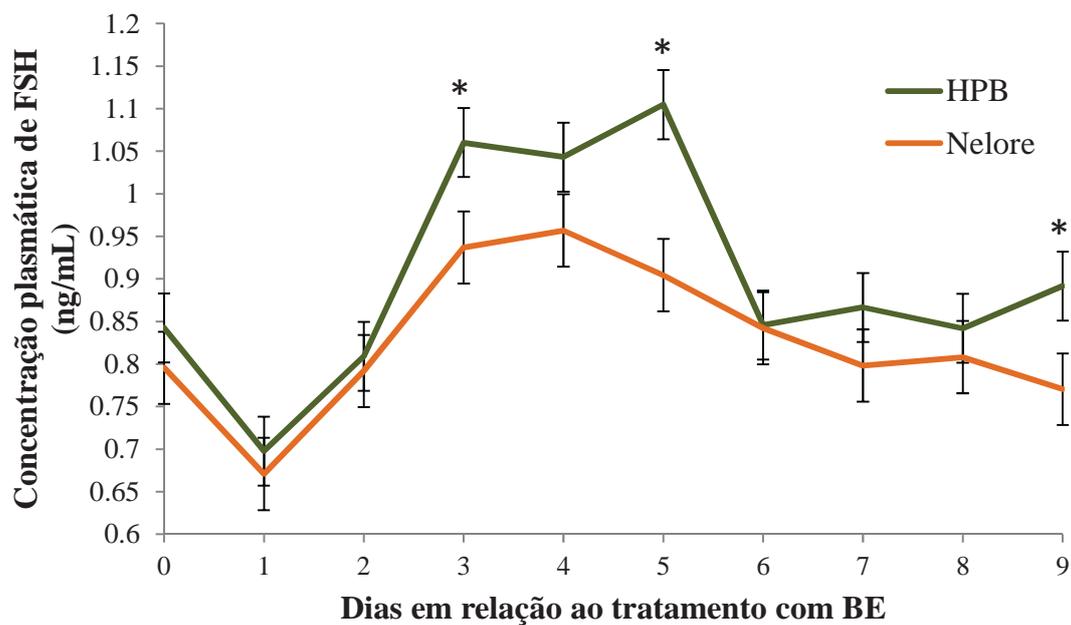


FIGURA 5. Concentrações plasmáticas de FSH durante 9 dias após o tratamento com 1, 2 ou 4 mg de BE em vacas HPB e Nelore não lactantes. Houve interação raça/dia (* $P < 0,05$).

3.3 CONCLUSÃO

O momento da emergência folicular após tratamento com BE+P4 foi dose-dependente de BE tanto para vacas zebuínas quanto taurinas. Além disso, os efeitos de raça encontrados neste estudo corroboram resultados prévios deste mesmo grupo de pesquisa (BASTOS et al., *Acta Sci. Vet.*, 38, Supl 2: s776, 2010).

CAPÍTULO 4

Experimento 3

“Intensidade e duração do estro em vacas não lactante *Bos indicus* (Nelore) e *Bos taurus* (Holandês preto e branco)”

RESUMO

O objetivo deste estudo foi comparar o comprimento e a intensidade do estro em vacas *Bos indicus* (Nelore; n=13) e *Bos taurus* (HPB; n=11) não lactantes. As vacas foram mantidas em um mesmo piquete, a fim de permitir uma interação entre elas e eram diariamente alimentadas com uma dieta calculada para manutenção do peso corporal, de acordo com o NRC (2000). A composição da dieta era: 42,8% de bagaço de cana, 45,7% de milho moído, 3,2% de farelo de soja, 1,2% de uréia, 5,7% de melaço e 1,4% de sal mineral, totalizando uma dieta com 71% de matéria seca (MS). A ingestão de MS por Kg de peso corporal (PC) foi de 1,45%. O escore de condição corporal (ECC) e PC foi de $3,5 \pm 0,1$ e $3,0 \pm 0,2$ (escala de 1 a 5) e $549,5 \pm 14,3$ e $625,5 \pm 20,5$ Kg para Nelore e HPB, respectivamente. Todas as fêmeas tiveram a emergência da onda folicular sincronizada com a inserção de um dispositivo intravaginal de progesterona (Sincrogest, Ourofino Agronegócio, São Paulo, Brasil), 2 mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol, Ourofino Agronegócio, São Paulo, Brasil) e 0,150 mg de PGF 2α (Sincrocio, Ourofino Agronegócio, São Paulo, Brasil). Dez dias após o início do protocolo, o Sincrogest foi removido e outro tratamento com 0,150 mg de PGF 2α foi realizado. A partir deste momento, foi realizada detecção visual do estro, durante 24 horas por dias, durante 5 dias. O número de vacas que efetuaram montas e o número de vacas que se deixaram montar foi registrado, assim como o momento (horário) de cada evento. Para confirmar a ovulação, foi realizado exame ultrassonográfico entre os dias 5 e 7 após a detecção do estro. Os dados foram analisados pelo teste T-Student e pelo teste exato de Fisher ou Qui-quadrado e os dados estão apresentados na forma de média \pm EPM ou porcentagem. Dez de 13 (76,9%) e 11 de 11 (100%) das vacas Nelore e HPB, respectivamente, foram detectadas em estro e ovularam ($P > 0,10$). Em média, vacas HPB começaram a demonstrar o comportamento de estro mais cedo que as vacas Nelore, após a remoção do implante de P4 ($40,4 \pm 2,9$ vs $47,7 \pm 28$ h; $P = 0,09$). Não houve diferença na intensidade e duração do estro entre vacas *Bos taurus* e *Bos indicus*. O comprimento do estro foi de $14,7 \pm 1,0$ h (variando de 8,3 a 19h) em HPB e de $12,4 \pm 0,8$ h (variando de 8,6 a 17,13h) em Nelore ($P > 0,10$). Além disso, o número médio de vezes que as vacas aceitaram monta foi de $32,2 \pm 6,1$ e $36,3 \pm 5,3$ para HPB e Nelore, respectivamente ($P > 0,10$). Somente 9,1% das montas aceitas pelas vacas Nelore foi realizada pelas vacas HPB e somente 3,8% das montas aceitas por vacas HPB em cio foram realizadas por vacas Nelore ($P < 0,05$). Com base nestes resultados, pode-se concluir que vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* manejadas sob as mesmas condições nutricionais e mesmo ambiente, exibem estro com a mesma intensidade e duração. No entanto, houve apenas uma pequena interação durante o estro entre as raças Nelore e HPB, mostrando que existe um padrão de segregação racial.

4.1 OBJETIVO

Comparar a duração e intensidade do estro em vacas não lactantes *Bos indicus* (Nelore [NEL]) versus *Bos taurus* (Holandês Preto e Branco [HPB]), mantidas sob as mesmas condições climáticas e nutricionais.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Todas as vacas (NEL e HPB) foram mantidas em um único piquete (Figura 6), a fim de permitir uma interação entre as diferentes raças. A alimentação foi fornecida diariamente e baseada em uma dieta de manutenção de acordo com o NRC (2000). A dieta era composta de 42,8% de bagaço de cana, 45,7% de milho moído, 3,2% de farelo de soja, 1,2% de uréia, 5,7% de melação, 1,4% de sal mineral, totalizando 71% de matéria seca (MS) na dieta. A ingestão de MS por Kg de peso corporal (PC) foi de 1,45%. O escore de condição corporal e PC foram $3,5 \pm 0,1$ e $3,0 \pm 0,2$ (escala de 1 a 5) e $549,5 \pm 14,3$ e $625,5 \pm 20,5$ kg para vacas NEL e HPB, respectivamente.



FIGURA 6. Vacas das raças NEL e HPB não lactantes mantidas no mesmo piquete para observação de estro.

Todas as fêmeas tiveram a emergência da onda sincronizada com um dispositivo intravaginal de P4 (Sincrogest, Ourofino Agronegócio, São Paulo, Brasil), 2mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol, Ourofino, i.m.) e 0,526 mg de PGF2 α (Sincrocio, Ourofino; i.m.). Dez dias após o início do protocolo, o dispositivo intravaginal foi removido e outro tratamento com 0,526 mg de PGF2 α (Sincrocio, Ourofino; i.m.) foi realizado (**Figura 7**).

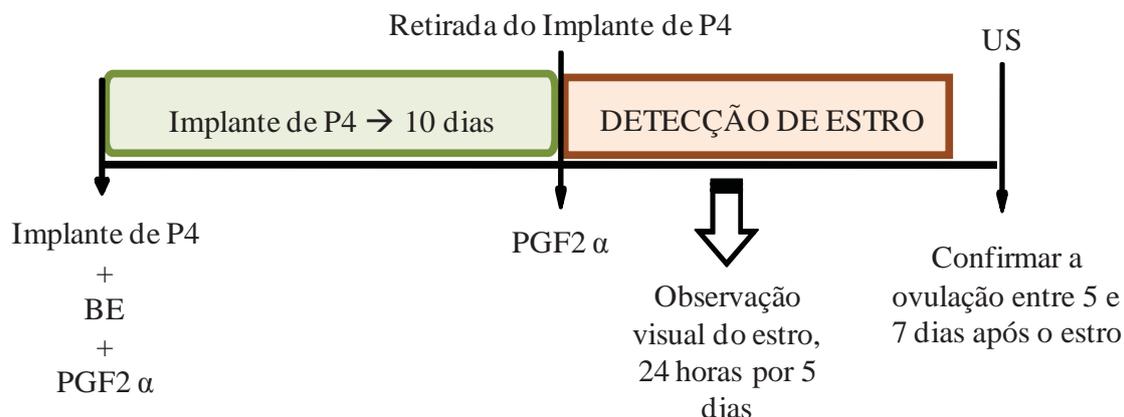


FIGURA 7. Esquema representativo do delineamento experimental, mostrando o protocolo de sincronização e observação do cio, o momento do exame ultrassonográfico.

Após a retirada do dispositivo, a manifestação de estro foi monitorada por contínua observação durante 24 h por d, por um período de 5 d. O número das vacas que realizavam a monta e também das que aceitavam a monta foi registrado em cada um dos eventos ocorridos, bem como o horário em que cada evento ocorria. Para confirmar a ovulação, foi realizado um exame ultrassonográfico 5 a 7 d após a detecção do estro.

Os dados foram analisados pelo teste-T de Student e pelo teste exato de Fisher ou pelo Chi-quadrado. Os dados estão apresentados no formato de média \pm EP ou porcentagem.

4.3 RESULTADOS

Dez de 13 e 11 de 11 vacas NEL e HPB, respectivamente, foram detectadas em estro e ovularam. Em média, vacas HPB iniciaram o estro mais cedo que as vacas NEL após a retirada do dispositivo de P4 (**Tabela 4**).

Não houve diferença na intensidade e duração do estro entre vacas *Bos taurus* e *Bos indicus* (**Tabela 4**). A intensidade do estro foi baseada no número médio de vezes que cada vaca aceitou monta.

Somente 9,1% das montas aceitas pelas vacas NEL foram realizadas pelas vacas HPB e somente 3,8% das montas aceitas pelas vacas HPB foram realizadas por vacas NEL ($P < 0,05$).

TABELA 4. Resultados (porcentagem ou média \pm EP) das observações do estro e da confirmação da ovulação de vacas não lactantes das raças NEL e HPB.

	<i>Bos indicus</i> (NEL)	<i>Bos taurus</i> (HPB)	P
Vacas em estro (estro + ovulação); %	76,9 (10/13)	100,0 (11/11)	>0,10
Intervalo entre a retirada do CIDR e o estro; h	40,4 \pm 2,9	47,7 \pm 2,8	0,09
Duração do estro; h	12,4 \pm 0,8 (8,6 a 17,1)	14,7 \pm 1,0 (8,3 a 19,0)	>0,10
Número médio de aceites de montas; n	32,2 \pm 6,1	36,3 \pm 5,3	>0,10

4.4 CONCLUSÃO

Foi demonstrado que em condições climáticas e nutricionais similares, vacas NEL e HPB manifestaram estro com a mesma intensidade e duração. No entanto, houve apenas uma pequena interação entre vacas NEL e HPB durante o período de estro, mostrando que, existiu um padrão de segregação racial, que pode ter sido devido à falta de convívio entre os animais de cada raça previamente ao período experimental.

CAPÍTULO 5

Experimento 4

“Influência da alta e baixa ingestão alimentar na
função ovariana em *Bos taurus indicus* e *Bos taurus*
taurus”

RESUMO

A função ovariana e as concentrações circulantes dos hormônios reprodutivos foram comparadas em vacas *Bos taurus* e *Bos indicus* sob as mesmas condições climáticas, porém com diferentes manejos nutricionais. Vacas secas das raças Nelore (n=12) e Holandês Preto e Branco (HPB; n=12) foram mantidas em baias individuais, recebendo dieta de alta e baixa ingestão de acordo com o NRC (2000). Os animais que estavam submetidos a uma dieta de alta ingestão, receberam 180% da dieta de manutenção e os animais que estavam sob restrição alimentar receberam 70% da dieta de manutenção. Após 21 dias de adaptação, o estro foi sincronizado e os animais monitorados diariamente, duas vezes ao dia, durante a primeira onda de crescimento folicular, através de ultrassonografia ovariana, usando um transdutor linear de 7,5 MHz. Amostras de sangue foram colhidas duas vezes ao dia para dosagens hormonais. Além disso, os animais foram cateterizados a fim de mensurar a concentração de P4 na veia cava caudal previamente à passagem pelo fígado, simultaneamente às coletas de sangue do cateter, também eram coletadas amostras da veia jugular, a fim de possibilitar uma comparação entre as concentrações de P4 antes e após a passagem pelo fígado. Como informações adicionais, também foram realizadas biópsias de CL para futuras avaliações da expressão de genes relacionados à produção de P4 e o fluido folicular do folículo dominante foi aspirado para dosagem de E2. Os resultados foram analisados pelo procedimento Mixed do SAS ($P < 0,05$) e apresentados como média dos quadrados mínimos \pm EP. Não houve interação raça/tratamento em nenhuma das variáveis analisadas neste experimento. Portanto, os dados foram agrupados dentro de raça e dentro de tratamento. Ganho médio de peso durante todo o período experimental (Peso Final – Peso Inicial) apresentou efeito apenas de tratamento, sendo que as vacas que estavam recebendo dieta de alta ingestão ganharam em média $41,6 \pm 2,2$ Kg e as vacas que receberam dieta de baixa ingestão perderam, em média, $28,5 \pm 2,4$ Kg, independente da raça. Foram observadas diferenças substanciais quanto ao número de folículos antrais entre Nelore e HPB. À emergência da onda, o número de folículos de 2 a 5 mm presentes nos ovários foi de $27,2 \pm 4,4$ para Nelore e $11,6 \pm 2,04$ para HPB. O desvio folicular ocorreu, em média, 2,7 dias após a ovulação, independente de raça, quando o maior folículo atingiu $7,3 \pm 0,2$ e $8,2 \pm 0,2$ mm de diâmetro em Nelore e HPB, respectivamente. O diâmetro máximo do folículo ovulatório ($15,3 \pm 0,8$ vs $13,6 \pm 0,8$ mm), assim como o volume do CL (5050 ± 558 vs 3205 ± 596 mm³), foram maiores em taurinos que em zebuínos. Entretanto, as concentrações plasmáticas de progesterona no D7 ($3,0 \pm 0,2$ vs $2,1 \pm 0,3$ ng/mL) do ciclo estral e o pico pré-ovulatório de estradiol ($16,1 \pm 1,1$ vs $12,5 \pm 1,2$ pg/mL), foram maiores em fêmeas zebuínas que em taurinas. Além disso, as concentrações plasmáticas pré-prandiais de insulina foram superiores na raça Nelore do que nas HPB, tanto na fase estrogênica ($7,8 \pm 1,3$ vs $2,8 \pm 1,4$ μ UI/mL) quanto na fase progesterônica ($7,6 \pm 1,3$ vs $2,2 \pm 0,6$ μ UI/mL). Em relação ao efeito de tratamento, o fornecimento de dietas de alta ou baixa ingestão exerceu influência no diâmetro do folículo ovulatório ($15,1 \pm 1$ vs $13,8 \pm 1$), no volume luteal ($4619,4 \pm 493,4$ vs 3636 ± 491), no dia do desvio folicular após a ovulação ($2,9 \pm 0,1$ vs $2,5 \pm 0,2$ d), no diâmetro do maior folículo no momento do desvio ($8,1 \pm 0,2$ vs $7,4 \pm 0,2$ mm) nos animais que receberam dieta de alta ingestão ou restrição, respectivamente. Também exerceu influência nas concentrações plasmáticas de P4 no Dia 7 do ciclo estral ($2,3 \pm 0,2$ vs $3,1 \pm 0,2$ ng/mL), nas concentrações plasmáticas de insulina nas fases estrogênica ($6,9 \pm 1,3$ vs $3,7 \pm 1,4$ μ UI/mL) e progesterônica ($7,1 \pm 1,9$ vs $1,8 \pm 2,0$ μ UI/mL) e no pico pré-ovulatório de E2 ($12,6 \pm 1,0$ vs

16,0±1,0 pg/mL) para animais com alta e baixa ingestão, respectivamente. No entanto, diferentes níveis de ingestão alimentar não mostraram efeito no número de folículos de 2 a 5 mm presentes nos ovários no momento da emergência da onda folicular. Os dados da produção e metabolismo dos hormônios esteróides serão apenas descritivos, pois ainda são inconclusivos. Conclui-se que existem diferenças significativas na fisiologia reprodutiva entre raças taurinas (HPB) e zebuínas (Nelore). Além disso, mostrou-se que o nível de ingestão alimentar pode alterar a fisiologia reprodutiva, independente da raça.

5.1 OBJETIVO

Comparar as concentrações circulantes de hormônios esteróides e metabólicos em vacas *Bos indicus* (Nelore [NEL]) versus *Bos taurus* (Holandês Preto e Branco [HPB]) submetidas a dietas de alta e baixa ingestão de matéria seca, além de avaliar aspectos relacionados à função ovariana nos diferentes grupos experimentais.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Animais

Durante o experimento foram utilizadas 12 vacas Nelore (*Bos indicus*) e 12 vacas Holandesas (*Bos taurus*) não lactantes com condição, peso corporal e idade (3 a 8 anos) semelhantes. As vacas foram alojadas em baias individuais com acesso à dieta controlada, além de água e sal mineral à vontade.

A justificativa de se usar vacas ao invés de novilhas baseia-se no fato de que novilhas apresentam uma maior exigência nutricional por ainda estarem em fase de crescimento. Outro aspecto importante é que, em geral, as fêmeas taurinas atingem puberdade mais cedo do que as zebuínas. Desta forma, foram comparados animais de diferentes idades ou diferentes pesos corporais.

5.2.2 Dietas tratamento

Todos os animais passaram por um período de adaptação a uma dieta de manutenção durante 14 dias, que consistiu de uma ração total com 40% de bagaço de cana, 47,1% de milho moído, 4,0% de farelo de soja, 1,9% de sal mineral, 1,3% de uréia e 6,0% de melaço, de acordo com o NRC, totalizando 71% de MS na dieta total. Para a dieta de manutenção destes animais, utilizou-se uma ingestão em MS por kg de PC de 1,37% para NEL e 1,54% para HPB. Após o período de adaptação, as vacas foram divididas, aleatoriamente, em dois grupos experimentais, recebendo volumes de dietas equivalentes a 180% (alta ingestão) ou 70% (baixa ingestão) em relação à manutenção similar ao usado por Mollo et al. (2007a,b) e Martins et al. (2008) e mantidas em sistema de confinamento. As dietas (manutenção, restrição ou alta ingestão) foram oferecidas durante todo o período experimental de aproximadamente 120 dias. Dentro desse período de 120 dias, estão incluídos os 14 dias de dieta de adaptação, seguidos de 30 dias de dieta tratamento para cada uma das duas réplicas. Entre as duas réplicas houve um período de descanso de 30 dias, durante o qual, os animais receberam apenas dieta para manutenção do peso corporal, a fim de eliminar o efeito residual da dieta tratamento oferecida na réplica anterior. Ao final desse período de descanso de 30 dias os tratamentos nutricionais foram invertidos e o experimento repetido em um modelo cross-over.

Para certificação da ingestão desejada, o peso corporal e escore de condição corporal foram avaliados semanalmente e a dieta ajustada de acordo com o peso dos animais. Além disso, diariamente a sobra do cocho foi pesada a fim de mensurar o consumo.

5.2.3 Sincronização e observação de estro

Simultaneamente ao início do fornecimento das dietas experimentais, as vacas tiveram o ciclo estral sincronizado com uso de hormônios, sendo, no Dia 0 do protocolo, foi feita aplicação de GnRH (10µg de Buserelina, Sincroforte, Ourofino Agronegócio), no Dia 7 foi realizada uma segunda aplicação de GnRH (10µg de Buserelina, Sincroforte, Ourofino Agronegócio) e nos Dias 6 e 7, após a segunda dose de GnRH, foi aplicada PGF2α (500 µg de cloprostenol sódico, Sincrocio, Ourofino Agronegócio). Em seguida, avaliações ultrassonográficas foram realizadas para confirmação da ovulação.

5.2.4 Ultrassonografia ovariana e colheita de sangue

Exames ultrassonográficos ovarianos utilizando-se uma probe linear de 7,5 MHz e colheitas de sangue foram realizados uma vez ao dia, iniciando no dia da aplicação da PGF2α até a ovulação.

No dia em que a ovulação foi confirmada, os exames ultrassonográficos e as colheitas de sangue foram realizados duas vezes ao dia, durante 6 dias a partir do dia em que a ovulação foi confirmada. Os exames ultrassonográficos foram realizados para comparar o diâmetro do folículo ovulatório após o estro, e para detectar o momento do desvio folicular e o diâmetro do maior folículo no momento do desvio. Assim como, comparar o volume luteal entre os grupos, durante a primeira onda do ciclo estral. Com isso, houve a possibilidade de comparação entre raças e níveis nutricionais de diversas variáveis, dentre elas, a seleção do folículo dominante. O plasma colhido foi congelado a -20°C para avaliação das concentrações plasmáticas de progesterona, estradiol e insulina (RIE).

5.2.5 Avaliação da produção ovariana de progesterona e estradiol

Procurou-se avaliar a produção ovariana de P4 e E2 por meio de uma técnica adaptada pela nossa equipe. Com base no trabalho desenvolvido por Benoit e Dailey (1991), no qual foi realizada a cateterização da veia cava caudal, via veia safena lateral. Os autores concluíram que um cateter com 90 cm de comprimento é suficiente para tal avaliação. Na primeira repetição deste trabalho, foi feita uma adaptação da técnica a fim de possibilitar tal procedimento nos animais da raça Nelore. Para tanto, o cateter foi inserido via veia caudal média. Foi utilizado um catéter (BIOCAT, Cateter para Acesso Venoso Central Uni Lumen, 16ga x 60cm, Agulha 14ga, Biomedical, São Paulo, Brasil; a escolha deste cateter com 60 cm de comprimento foi devido ao fato de este ser o cateter mais longo disponível no mercado nacional e, além disso, acreditava-se que o cateter com 60 cm seria suficiente para alcançar a veia cava caudal na altura da veia ovariana), o qual foi inserido nos animais no Dia 6 do ciclo, após ovulação. No entanto, com os resultados da primeira repetição em mãos, vimos que o cateter de 60 cm não foi suficiente para atingir o local desejado. A técnica adaptada de cateterização da veia cava caudal foi estabelecida, porém o cateter utilizado não foi longo o suficiente para alcançar a veia cava caudal na altura em que a veia ovariana desemboca. Nas dosagens hormonais, as concentrações de esteróides presentes no sangue coletado do cateter foram similares às do sangue coletado na veia jugular.

Portanto, na segunda repetição, utilizamos um cateter mais longo (130 cm), o qual foi montado pela nossa equipe. Utilizamos tubos de plástico transparente (Parker[®] - Atlantic tubin, Cleveland, OH - EUA, TFT 16-NT com 1,3 mm de diâmetro interno, a espessura da parede é de 0,3 mm e o diâmetro externo de 1,6mm), agulhas (40X12) e uma tampa de sonda uretral foram adaptadas na extremidade externa para fechar o catéter, todos estes estéreis.

No entanto, além da alteração do tipo do cateter utilizado, foi necessário alterar a técnica de cateterização. Quando a segunda repetição foi iniciada, o local da veia caudal média, onde o catéter precisava ser inserido ainda não estava totalmente cicatrizado, o que dificultou a localização da veia caudal e a passagem do catéter. Diante destas dificuldades, decidiu-se utilizar a técnica descrita por Benoit e Dailey (1991), ou seja, o catéter foi inserido via veia safena lateral (**Figura 8**). Nesta fase do experimento as vacas Nelores já estavam adaptadas ao manejo diário, o que facilitou a cateterização da veia safena das mesmas.

Abaixo estão algumas fotos (**Figura 8**) mostrando como foi realizada a cateterização. Na grande maioria dos animais a cateterização foi realizada com os animais em estação, contidos em um brete de contenção e o membro posterior no qual o cateter foi colocado também foi contido. Realizou-se tricotomia e antissepsia do local, anestesia local com lidocaína sem vasoconstritor e inserção do cateter, sem dissecação da veia. Após visualização do vaso, uma agulha com calibre superior ao do cateter era inserida na veia e o catéter passado por ela. Os tubos (cateter) eram cortados com 150 cm de comprimento, embalados individualmente e autoclavados. Apenas 130 cm eram inseridos nos animais, os 20 cm restantes eram alocados dentro de uma bolsa plástica presa ao membro do animal, a fim de proteger o cateter e facilitar o manejo nos momentos das colheitas de sangue.

Após inserção do catéter, utilizava-se solução heparinizada (solução fisiológica com heparina a 10 UI/mL), 5 mL por cateter, o mesmo era fechado e fixado com fio de sutura (Nylon 0.6) e protegido por uma bolsa plástica. Após fixar a bolsa plástica no membro do animal, protegia-se o local com 2 ataduras, a fim de evitar contaminação do local.

Apenas nos animais mais agitados, a cateterização foi realizada com os animais em decúbito lateral, nos demais a cateterização foi realizada com os animais em estação, contido em brete de contenção (**Figura 8**).





FIGURA 8. Fotos ilustrativas da cateterização da veia safena lateral.

Amostras de sangue do catéter foram colhidas no dia 6 e 7 do ciclo estral, duas vezes ao dia, simultaneamente foram colhidas amostras de sangue da veia jugular, para possibilitar a comparação das concentrações circulantes de P4. Além disso, tentou-se realizar a mensuração do fluxo sanguíneo da veia cava caudal, logo após a região onde desemboca a veia ovariana, por meio de Doppler.

No Dia 7, imediatamente após as colheitas de sangue do catéter foi feita uma aplicação de $\text{PGF2}\alpha$ (500 μg de cloprostenol sódico, Sincrocio, Ourofino Agronegócio) e amostras de sangue continuaram sendo colhidas do catéter e da jugular até a confirmação da ovulação, a fim de coletar dados durante o período de luteólise e a produção de estradiol no período pré ovulatório. As colheitas de sangue do cateter eram realizadas da seguinte forma:

Passo 1: Retirada da atadura e exposição do cateter.

Passo 2: Os primeiros 10 mL de sangue eram descartados, a fim de evitar sangue diluído em solução heparinizada presente no catéter.

Passo 3: Coletava-se outros 10 mL de sangue e eram colocados em tubos heparinizados e mantidos resfriados para posterior centrifugação e armazenamento do plasma.

Passo 4: 5 mL de solução heparinizada eram inseridos no cateter e o mesmo fechado e protegido com a atadura novamente.

Como análises adicionais ao proposto no projeto inicial, após a confirmação da ovulação, o cateter foi retirado e as vacas permaneceram nas dietas experimentais por mais um período. No Dia 7 do ciclo estral (referente a esta ovulação subsequente), todos os animais foram submetidos a biopsias de CL guiadas por ultrassonografia, por via trans-vaginal utilizando agulha Tru-Cut [Single Action Biopsy Device, 16g (1,6mm) x 48cm, 20mm Throw, 15mm Notch, Trocar Tip, USBiopsy, Franklin IN, EUA]. Foram coletados fragmentos de CL para posteriores análises da expressão de genes relacionados à esteroidogênese e fragmentos para posterior mensuração da quantidade de P4 por grama de tecido luteal de acordo com a técnica descrita por Schmitt et al. (1996).

Após o término das biopsias foi feita uma aplicação de $PGF2\alpha$ (500 μ g de cloprostenol sódico, Sincrocio, Ourofino Agronegócio). No dia seguinte à $PGF2\alpha$ os animais foram agrupados em um único piquete para que fosse possível a observação do estro. A partir desse momento todos os animais passaram a receber dieta de manutenção e o estro foi observado por 1,5 hora, 4 vezes ao dia (obedecendo os seguintes horários: das 6 às 7:30h, 12 às 13:30h, 18 às 19:30h e 0 à 1:30h). No momento em que o estro era detectado, as fêmeas eram, imediatamente, levadas ao tronco de contenção, e o folículo pré-ovulatório foi mensurado, seu conteúdo foi aspirado através de punção folicular guiada por ultrassonografia, com agulha descartável 18g (WTA, Cravinhos, SP, Brasil) e o fluido folicular congelado em eppendorfs para aferição das concentrações de estradiol pela técnica de radioimunoensaio.

Previamente a ambos os procedimentos, aspiração folicular guiada por ultrassonografia e biópsia do CL guiada por ultrassonografia, as fêmeas eram contidas no brete de contenção, era realizada anti-sepsia da região e anestesia peridural com lidocaína a 2% (5 mL de Lidocaína 2%; Anestésico L – Pearson, Eurofarma).

Os fragmentos de CL (2 fragmentos por animal) ainda estão armazenados para futuras dosagens de P4 por grama de tecido luteal e expressão de genes relacionados à esteroidogênese. Infelizmente, não foi possível avaliar as concentrações de P4 durante a luteólise e as concentrações de E2 no momento pré-ovulatório na veia cava caudal. Alguns animais não ovularam e em outros não foi possível manter o cateter por muito tempo. Dessa forma, o número de dados colhidos nestes momentos não foi suficiente para permitir algum tipo de análise.

Nas avaliações das concentrações de E2 no fluido folicular, o número de vacas HPB é superior ao número de animais utilizados no experimento. Isso se deve ao fato de que algumas vacas não ovularam na sincronização inicial e por esse motivo não foram incluídas no experimento. Mas na última etapa, essas fêmeas também receberam $PGF2\alpha$ e as que manifestaram cio, tiveram o fluido folicular aspirado. Portanto o número de HPB nesta avaliação é de 17 e não apenas 12 como nas demais variáveis.

As avaliações das concentrações plasmáticas de insulina, P4 e E2 foram realizadas por meio de Radioimunoensaio no Laboratório de Endocrinologia Animal do Departamento de RARV da FMVZ, UNESP, utilizando-se kits comerciais (Insulina: TKIN5, P4: TKPG5, Count-A-Count, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA) conforme normas do fabricante, sendo os CVs intra-ensaio de 3,5% e 4,5%, para insulina e P4, respectivamente. As dosagens de E2 foram realizadas utilizando-se kit Estradiol Double Antibody (KE2D1, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA). Nesta análise de E2, as amostras de plasma

sofreram extração dupla com éter dietílico e o ensaio foi realizado utilizando-se o kit com modificações de acordo com Kulick et al. (1999) , no qual o CV intra-ensaio obtido foi de 7,4%. Para análise de E2 do FF foi realizada diluição de 1:200 de forma que a concentração de E2 do FF se encaixasse dentro da curva padrão utilizada no ensaio.

A análise estatística para a variável número de folículos antrais pequenos no momento da emergência da onda foi realizada sob a metodologia dos modelos lineares generalizados (Nelder & Wedderburn 1972) com o procedimento GLIMMIX do SAS ($P < 0,05$). Consideraram-se os efeitos fixos de período, raça, dieta e interação raça*dieta, e como aleatórios os efeitos de vaca e de grupo (PC), sob distribuição de poisson e função de ligação logarítmica. Para as demais variáveis utilizou-se o mesmo modelo sob distribuição normal.

5.3 RESULTADOS

Os animais iniciaram o experimento com ECC igual a $3,5 \pm 0,1$ e $3,0 \pm 0,2$ (escala de 1 a 5) e o PC igual a $532,62 \pm 39,2$ e $624,03 \pm 39,7$ kg, para Nelore e HPB, respectivamente. As fêmeas chegaram ao final do experimento com ECC igual a $3,6 \pm 0,2$ e $3,2 \pm 0,3$ e o PC igual a $631,3 \pm 40,9$ e $539,3 \pm 40,5$ para Nelore e HPB, respectivamente. As vacas da raça Nelore chegaram ao final do experimento com PC igual a $562,2 \pm 40,5$ e $516,5 \pm 40,5$ para alta ingestão e restrição alimentar, respectivamente. As vacas HPB chegaram ao final do experimento com PC igual a $661,7 \pm 41,0$ e $600,8 \pm 41,1$ para alta ingestão alimentar e restrição alimentar, respectivamente (**Figura 9**). Independente da raça, o ganho médio de peso durante todo o período experimental (Peso Final – Peso Inicial) apresentou efeito apenas de tratamento, sendo que as vacas que estavam recebendo dieta de alta ingestão ganharam

em média $41,5 \pm 2,1$ Kg e as vacas que receberam dieta de baixa ingestão perderam, em média, $28,53 \pm 2,42$ Kg, independente da raça.

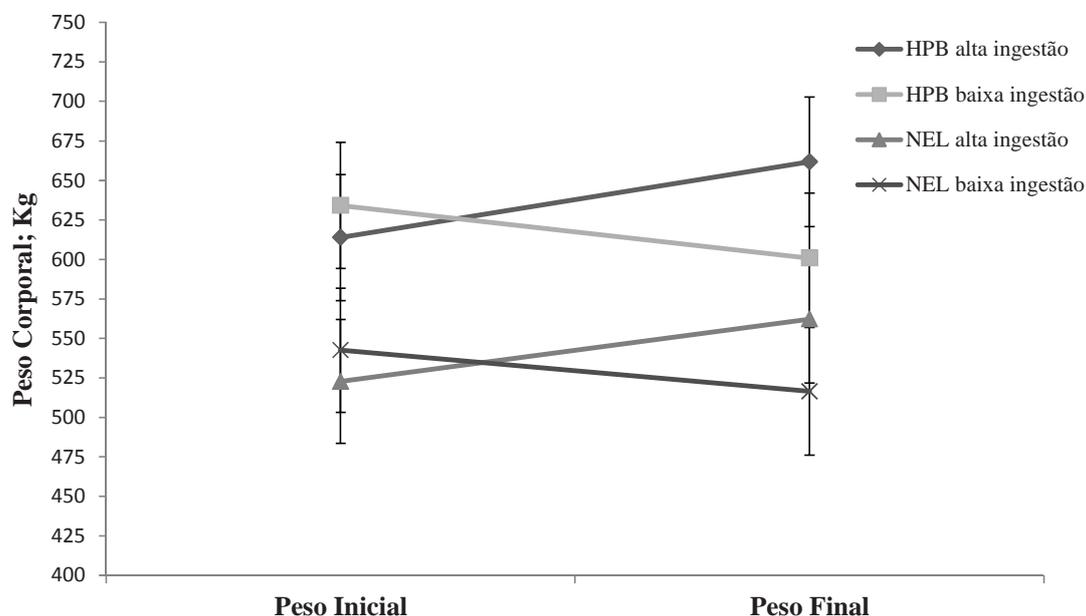


FIGURA 9. Peso corporal (kg) dos animais das raças HPB e Nelore, submetidos a dietas de alta e baixa ingestão alimentar, durante todo o período experimental.

Não houve interação raça/tratamento em nenhuma das variáveis analisadas neste experimento. Portanto, os dados foram agrupados dentro de raça, independente do tratamento. Da mesma forma, foram agrupados dentro de tratamento, independente da raça. A fim de mostrar, separadamente, efeito de raça e efeito de tratamento.

Foi observado efeito de raça no número de folículos de 2 a 5 mm presentes nos ovários no momento da emergência da onda folicular, no diâmetro do maior folículo no momento do desvio, no diâmetro do folículo ovulatório, no volume luteal, nas concentrações plasmáticas de insulina nas fases estrogênica e progesterônica, nas concentrações de P4 no dia 7 do ciclo estral e

no pico pré-ovulatório de E2 (**Tabela 5**). O dia do desvio após ovulação não apresentou efeito de raça (**Tabela 5**).

TABELA 5. Média dos quadrados mínimos \pm EP das variáveis analisadas neste experimento considerando apenas o efeito da raça.

	HPB (n=20)	NEL (n=24)	P
Diâmetro do folículo ovulatório após aplicação de PGF2 α do protocolo de sincronização de cio; mm	14,2 \pm 0,5	12,9 \pm 0,5	0,01
Volume do CL; mm ³	5245,01 \pm 321	3866 \pm 301,55	0,0065
Diâmetro do folículo ovulatório subsequente; mm	15,3 \pm 0,84	13,6 \pm 0,83	0,007
Volume do CL subsequente; mm ³	5050,2 \pm 558,4	3205,08 \pm 596,5	0,03
Número de folículos na emergência; n	11,6 \pm 2,04	27,2 \pm 4,4	0,0007
Dia do desvio, após a ovulação; d	2,8 \pm 0,2	2,7 \pm 0,2	0,6
Diâmetro do maior folículo no momento do desvio; mm	8,2 \pm 0,2	7,32 \pm 0,2	0,02
Concentração plasmática de insulina na fase estrogênica; μ UI/mL	2,83 \pm 1,4	7,8 \pm 1,3	0,004
Concentração plasmática de insulina na fase progesterônica; μ UI/mL	1,3 \pm 2,0	7,6 \pm 1,9	0,0007
Concentração plasmática de progesterona; ng/mL	2,1 \pm 0,3	3,0 \pm 0,26	0,008
Pico pré-ovulatório plasmático de E2; pg/mL	12,5 \pm 1,2	16,1 \pm 1,1	0,04

Em relação ao efeito de tratamento, o fornecimento de dietas de alta ou baixa ingestão exerceu influência no diâmetro do folículo ovulatório, no volume luteal, no dia do desvio folicular após a ovulação, no diâmetro do maior folículo no momento do desvio, nas concentrações plasmáticas de P4 no Dia 7 do ciclo estral, nas concentrações plasmáticas de insulina nas fases estrogênica e progesterônica e no pico pré-ovulatório de E2 (**Tabela 6**).

Diferentes níveis de ingestão alimentar não mostrou efeito no número de folículos de 2 a 5 mm presentes nos ovários no momento da emergência da onda folicular (**Tabela 6**).

TABELA 6. Média dos quadrados mínimos \pm EPM das variáveis analisadas neste experimento considerando apenas o efeito do tratamento.

	Alta Ingestão (n=22)	Baixa Ingestão (n=22)	P
Diâmetro do folículo ovulatório após aplicação de PGF2 α do protocolo de sincronização de cio; mm	14,6 \pm 0,45	12,5 \pm 0,45	<0,0001
Volume do CL; mm ³	5146,7 \pm 287,5	3964,2 \pm 306,0	0,0094
Diâmetro do folículo ovulatório subsequente; mm	15,08 \pm 0,8	13,8 \pm 0,8	0,004
Volume do CL subsequente; mm ³	4619,4 \pm 493,8	3635,8 \pm 491,0	0,09
Número de folículos na emergência; n	16,6 \pm 2,2	18,9 \pm 2,6	0,12
Dia do desvio, após a ovulação; d	2,9 \pm 0,17	2,5 \pm 0,2	0,039
Diâmetro do maior folículo no momento do desvio; mm	8,1 \pm 0,2	7,4 \pm 0,2	0,02
Concentração plasmática de insulina na fase estrogênica; μ UI/mL	6,9 \pm 1,3	3,7 \pm 1,44	0,04
Concentração plasmática de insulina na fase progesterônica; μ UI/mL	7,1 \pm 1,9	1,8 \pm 2,0	0,003
Concentração plasmática de progesterona; ng/mL	2,3 \pm 0,2	3,1 \pm 0,2	0,013
Pico pré-ovulatório plasmático de E2; μ g/mL	12,6 \pm 1,0	16,0 \pm 1,0	0,01

Quanto às comparações entre as concentrações circulantes de P4 no cateter e na jugular, pode-se observar apenas um efeito de raça (**Tabela 7 e 8**). Os dados das dosagens hormonais da primeira repetição foram excluídos do experimento, visto que o cateter não foi longo o suficiente para ultrapassar o local onde o sangue oriundo do ovário desemboca na veia cava caudal. Portanto, nestes resultados estão presentes apenas os dados da segunda repetição. Além disso, em alguns animais a cateterização não foi bem sucedida, por esse motivo, o número de observações utilizadas nestas variáveis é inferior às demais variáveis observadas.

TABELA 7. Média \pm EP das concentrações plasmáticas de P4 no cateter e na jugular no dia 7 do ciclo estral em HPB e Nelore, independente do tratamento. Nesta tabela estão apenas os dados dos animais nos quais foi possível a cateterização da veia cava caudal.

	HPB (n=9)	NEL (n=6)	P
Concentração plasmática P4 na veia Jugular no D7; ng/mL	1,9 \pm 0,3 ^{B,b}	3,0 \pm 0,4 ^{B,a}	0,04
Concentração plasmática de P4 na veia Cava Caudal no D7; ng/mL	4,2 \pm 0,6 ^{A,b}	6,6 \pm 0,6 ^{A,a}	0,014
Diferença na concentração de P4 (Catéter vs Jugular); %	45,24	45,45	
P	0,002	0,0006	

*Letras maiúsculas mostram diferenças entre as colunas. Letras minúsculas mostram diferenças entre as linhas.

TABELA 8. Média \pm EP das concentrações plasmáticas de P4 no cateter e na jugular no dia 7 do ciclo estral nas fêmeas que receberam dietas de alta ou baixa ingestão alimentar, independente da raça. Nesta tabela estão apenas os dados dos animais nos quais foi possível a cateterização da veia cava caudal.

	Alta Ingestão (n=8)	Baixa Ingestão (n=7)	P
Concentração plasmática de P4 na veia Jugular no D7; ng/mL	2,3 \pm 0,3 ^{B,a}	2,9 \pm 0,4 ^{B,a}	0,18
Concentração plasmática de P4 na veia Cava Caudal no D7; ng/mL	5,0 \pm 0,6 ^{A,a}	5,4 \pm 0,8 ^{A,a}	0,34
Diferença na concentração de P4 (Catéter vs Jugular); %	46,00	53,70	
P	0,001	0,03	

*Letras maiúsculas mostram diferenças entre as colunas. Letras minúsculas mostram diferenças entre as linhas.

Quanto às dosagens de E2 no fluido folicular, tais dosagens foram realizadas, mas não foram observados efeitos de raça e de tratamento (**Tabela 9 e 10**). Porém muitas vacas Nelores ovularam sem manifestar cio ou não manifestaram cio e não ovularam, o que impossibilitou a colheita do FF destes animais, uma vez que a aspiração do FF foi realizada no momento em que o animal iniciava o comportamento de cio. Estes dados são, na grande maioria, apenas das vacas HPB. Por este motivo, os dados do FF estão sendo apresentados neste relatório apenas em caráter descritivo.

TABELA 9. Média \pm EP das concentrações de E2 presentes no fluido folicular (FF) do folículo pré-ovulatório de vacas das raças HPB e Nelore, independente do tratamento.

	HPB (n=17)	NEL (n=5)	P
Concentração de E2 no fluido folicular do folículo pré-ovulatório; $\mu\text{g/mL}$	58,4 \pm 5,5	58,2 \pm 10,5	0,98

TABELA 10. Média \pm EP das concentrações de E2 presentes no fluido folicular (FF) do folículo pré-ovulatório de vacas HPB submetidas a dietas com alta e baixa ingestão alimentar e de vacas Nelore submetidas apenas a dietas com alta ingestão.

	Alta Ingestão (n=15)	Baixa Ingestão (n=7)	P
Concentração de E2 no fluido folicular do folículo pré-ovulatório de vacas HPB; $\mu\text{g/mL}$	54,0 \pm 6,4	62,8 \pm 8,8	0,41
Concentração de E2 no fluido folicular do folículo pré-ovulatório de vacas Nelore; $\mu\text{g/mL}$	58,2 \pm 10,5	-	-

As colheitas de sangue realizadas do dia 7 em diante (após $\text{PGF2}\alpha$ até a ovulação) também ficaram comprometidas, devido ao fato de algumas vacas não terem ovulado ou terem levado mais tempo que o esperado para ovular, o que impossibilitou manter o cateter nestes animais por muito tempo. Além disso, alguns outros dados ainda estão em fase de análise e algumas informações adicionais ainda poderão ser obtidas com este estudo, como, por exemplo, as biópsias de CL

ainda estão armazenadas para futuras dosagens de P4 no tecido luteal e para futura análise da expressão de genes relacionados à produção de P4.

Em relação ao fluxo sanguíneo da veia cava caudal, os dados foram excluídos devido à dificuldade de ter certeza se os dados colhidos eram realmente da veia cava caudal. A região possui uma série de vasos bastante próximos, dificultando esta avaliação, através da ultrassonografia, precisamente da veia cava caudal. Para evitar falsos resultados decidiu-se excluir tais dados das análises.

5.4 CONCLUSÃO

Com base nos dados analisados até o presente momento pode-se concluir que, de fato, existem diferenças significativas na fisiologia reprodutiva entre raças taurinas (HPB) e zebuínas (Nelore). Além disso, mostrou-se que o nível de ingestão alimentar pode alterar a fisiologia reprodutiva, independente da raça.

Quanto ao metabolismo dos hormônios esteróides, como observado neste experimento, as concentrações de P4 na veia cava caudal e na veia jugular foram maiores em Nelore do que em HPB. No entanto a porcentagem de metabolização hepática (diferença entre a P4 presente na veia cava caudal e na jugular) foi semelhante. Mas, vale ressaltar que, o número de animais avaliados ainda é bastante restrito. Além disso, não foi possível mensurar o fluxo sanguíneo na veia cava caudal. Sendo assim, não é possível concluir se, de fato, a raça Nelore produz mais P4 e metaboliza na mesma proporção que a raça HPB, resultando em maiores concentrações circulantes na raça Nelore, ou se, as maiores concentrações são consequência de um menor

metabolismo, de forma que a progesterona que não é metabolizada é somada ao que está sendo produzida, mantendo os níveis mais elevados.

Vale ressaltar que, a técnica de cateterização da veia cava caudal funcionou e podemos considerá-la estabelecida, sendo totalmente possível realizá-la em ambas as raças, Nelore e HPB. Com a técnica estabelecida, outros trabalhos poderão ser desenvolvidos de agora em diante, possibilitando um maior aprofundamento dos estudos sobre metabolismo de hormônios esteroides em bovinos.

CAPÍTULO 6

Discussão dos resultados

6.1 Fisiologia reprodutiva de fêmeas *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* e influência da nutrição na reprodução

6.1.1 Dinâmica folicular

No primeiro experimento, 80% das vacas da raça NEL e 60% de vacas da raça HPB apresentaram três ondas de desenvolvimento folicular durante o ciclo estral. Todas as vacas restantes tiveram duas ondas. Além disso, a duração do ciclo estral média foi de 23 d (21 a 26 d) e foi semelhante entre NEL e HPB. Dados de outros estudos mostraram um intervalo interovulatório médio de 21 dias, tanto para gado *Bos taurus* quanto *Bos indicus* (discutido por BÓ et al., 2003 e SARTORI et al., 2004), com ciclos de duas ondas mais curtos do que aqueles com três ondas (SAVIO et al., 1988, 1990;. SIROIS & FORTUNE, 1988; ALVAREZ et al., 2000;. TOWNSON et al., 2002;. SARTORI et al., 2004). Houve, no entanto, exceções, em que vacas HPB de alta produção em lactação tiveram um ciclo estral mais longo (23 d), devido ao tempo prolongado entre a luteólise e ovulação (discutido por SARTORI et al., 2004). Deve-se destacar uma das limitações de experimentos tais como o realizado em nossos estudos, onde um manejo intensivo dos animais ou alterações nas condições climáticas podem alterar parâmetros fisiológicos, tais como taxa de crescimento folicular, ovulação ou mesmo as concentrações circulantes hormonais devido a estresse ou outros fatores (discutido por MAZIERO et al., 2011). A predominância de três ondas foliculares observada neste estudo condiz com outros relatos em fêmeas NEL, entretanto, a maioria dos estudos com fêmeas da raça HPB, havia reportado uma predominância de duas ondas. Deve-se destacar que quase todos os estudos de dinâmica folicular em HPB descritos na literatura foram realizados em países de clima temperado.

6.1.2 Número de folículos recrutados no início da onda folicular

Em praticamente todos os experimentos realizados comparando *Bos taurus* a *Bos indicus*, detectou-se um número bem maior de folículos pequenos (2 a 5 mm) nos ovários das fêmeas zebuínas. Além disso, houve pouca variação no número de folículos pequenos durante todo o ciclo estral em ambas as raças, como também relatado por Alvarez et al. (2000) e Buratini Jr. et al. (2000), indicando a necessidade de se fazer uma reflexão melhor sobre os conceitos estabelecidos dos mecanismos envolvidos com o recrutamento de folículos antrais e emergência das ondas foliculares (GINTHER et al., 1996).

Diferenças significativas na população folicular ovariana entre *Bos indicus* e *Bos taurus* podem estar associadas a maiores concentrações circulantes de insulina e IGF-I observadas em zebuínos, como descrito nos resultados acima e também por Alvarez et al. (2000) e Sales (2010). Nos experimentos 1 e 4, foi observado que as concentrações plasmáticas pré-prandiais de insulina foram mais elevadas na fase estrogênica do que progesterônica tanto em NEL quanto em HPB. É sabido que as concentrações séricas de insulina apresentam variações diurnas, mas também ocorre variação durante o ciclo estral, com significativo aumento durante o período pré-ovulatório. O E2 é forte candidato a ser mediador dessas alterações, pois o aumento das concentrações séricas de insulina ocorre paralelamente ao aumento do E2 associado ao desenvolvimento do folículo dominante. Foi mostrado que o E2 estimula ambos a expressão de mRNA para insulina como também sua secreção pelo pâncreas (WEBB et al., 2004). Sabe-se que a insulina é um dos principais fatores que controlam a liberação e a biodisponibilidade de IGF-I. Sendo assim, especula-se que maiores concentrações de insulina e IGF-I são responsáveis pelo maior número de folículos recrutados em zebuínos do que em taurinos. Especialmente, por

estes hormônios estarem aumentados na fase estrogênica, momento que ocorre o recrutamento folicular do início do ciclo estral.

6.1.3 Seleção do folículo dominante

Os resultados relacionados ao diâmetro do futuro folículo dominante no momento do desvio obtidos nos experimentos 1, 2 e 4 são consistentes com os demais descritos na literatura no que diz respeito à diferença de tamanho entre as raças taurinas e zebuínas, em que *Bos indicus* apresentam folículos de menor tamanho ao desvio. Entretanto, os valores absolutos observados foram, em geral, maiores do que os relatados anteriormente. Na maioria dos trabalhos com NEL, o diâmetro folicular ao desvio foi entre 5,7 e 6,2 mm, enquanto que em nossos estudos, o diâmetro médio observado foi entre 7,0 e 7,3. Curiosamente, para a raça HPB, nossos resultados foram similares aos descritos na literatura. Uma possível explicação é o fato de termos trabalhado com vacas NEL confinadas, ao invés de novilhas NEL a pasto, como foi o caso da maioria dos demais estudos de outros pesquisadores (CASTILHO et al., 2007; ERENO, 2008; GIMENES et al., 2008) com exceção de Sartorelli et al. (2005) que trabalharam com novilhas e vacas confinadas. Diferenças no tamanho do folículo no momento do desvio entre categorias animais distintas foram relatadas por Sartori et al. (2004) ao compararem vacas leiteiras HPB a novilhas HPB nulíparas. Naquele estudo, foi observado que o desvio folicular ocorreu quando o maior folículo em crescimento na onda atingiu 9,8 mm e 8,3 mm em média nas vacas e novilhas, respectivamente ($P < 0.05$).

Diferentes manejos nutricionais podem também influenciar no tamanho do folículo e no momento do desvio folicular, como foi demonstrado no último experimento descrito nesta tese. Independente de raça (NEL ou HPB), vacas submetidas à alta IMS tiveram um atraso na

ocorrência do desvio folicular após a ovulação, conseqüentemente, tiveram um maior diâmetro folicular no momento do desvio em relação às vacas com restrição alimentar. Especula-se que maiores concentrações circulantes de insulina nas vacas com maior IMS poderiam estar relacionadas com esse fenômeno, por estimular o crescimento folicular. No entanto, se o efeito fosse exclusivamente conseqüência dos maiores níveis de insulina, também deveria existir diferença no momento do desvio quando comparadas as raças HPB e Nelore, visto que as Nelores possuem níveis circulantes de insulina mais elevados. No entanto, o momento do desvio foi semelhante, o que diferiu foi apenas o diâmetro do maior folículo. Dessa forma, deve-se considerar que, no experimento 4, os animais que receberam dieta de alta ingestão apresentaram um menor pico pré-ovulatório de E2 e tiveram menores concentrações circulantes de P4, provavelmente essa alteração nas concentrações de E2 e P4 também esteve presente durante todo o ciclo estral. Sabe-se que o feed back negativo do E2 e inibina na liberação de FSH está diretamente relacionado às concentrações circulantes de E2 e inibina. Acredita-se que quanto maior a concentração de E2 e inibina, menor a liberação de FSH pela hipófise (GINTHER et al., 1996). De acordo com Adams e colaboradores (1992 e 1993) o declínio da liberação de FSH está associado ao momento em que ocorre o mecanismo de seleção do folículo dominante e este evento é um componente integral do mecanismo de seleção. Dessa forma, acredita-se que as menores concentrações de E2 nos animais que estavam submetidos à dieta de alta ingestão pode ser o responsável por esse atraso no momento do desvio folicular observado nos animais, já que o FSH pode ter permanecido mais elevado por mais tempo. Provavelmente essa alteração nas concentrações de E2 não foi suficiente para chegar a uma codominância/dupla ovulação, mas pode ter resultado em um pequeno atraso no momento do desvio folicular. Foi mostrado por Adams et al. (1993) que quando foi realizado tratamento exógeno com FSH por 2 dias

previamente ao momento da seleção, houve um atraso de 1,5 dias no momento do desvio. Esse aumento do FSH alterou o padrão de crescimento do folículo dominante e do primeiro subordinado, conseqüentemente, atrasou a regressão do folículo subordinado, assim como o momento do desvio. Quando o mesmo tratamento com FSH foi realizado pós-desvio, não houve nenhuma alteração no desenvolvimento folicular e no processo de atresia.

6.1.4 Desenvolvimento folicular e luteal e concentrações circulantes de hormônios esteróides e metabólicos

Em praticamente todos os resultados obtidos com os experimentos apresentados nesta tese, vacas NEL tiveram folículos ovulatórios e CL menores do que as HPB. Apesar disso, as concentrações circulantes de E2 e P4 foram consistentemente superiores nas vacas zebuínas. Poucos trabalhos realizaram esse tipo de comparação entre taurinos e zebuínos. Em um estudo realizado por Alvarez et al. (2000), não houve diferença na concentração máxima de E2 circulante entre vacas das raças Brahman, Angus e Senepol ($8,9 \pm 1,6$, $9,1 \pm 1,4$ e $8,7 \pm 1,4$ pg/mL, respectivamente). Entretanto, este parece ser o único estudo em que o diâmetro máximo do folículo ovulatório foi maior em *Bos indicus* ($15,6 \pm 0,5$ mm) do que em *Bos taurus* ($12,8 \pm 0,4$ e $13,6 \pm 0,4$ mm para Angus e Senepol, respectivamente). Por outro lado, Segerson et al. (1984) ao compararem vacas Angus a Brahman, observaram maiores concentrações séricas de E2 e P4 em vacas *Bos taurus*. De acordo com Randel (1976) fêmeas *Bos indicus* e fêmeas mestiças *Bos indicus* tiveram menor concentração de P4 por grama de tecido luteal do que em fêmeas *Bos taurus*. No entanto, Segerson et al. (1984) não detectaram diferenças na concentração de P4 no CL entre vacas Brahman e Angus ($75,8 \pm 11,3$ e $65,9 \pm 5,3$ mg/g de CL, respectivamente; $P > 0,10$). Por outro lado, outros estudos realizados no Brasil detectaram maior

P4 circulante em *Bos indicus* (Nelore ou Gir) do que em *Bos taurus* (Angus ou HPB). Carvalho et al. (2008) compararam fêmeas *Bos indicus* (Nelore e Gir), *Bos taurus* (Angus e HPB) e mestiças (Angus x Nelore e Gir x HPB) durante todo o período de um protocolo de sincronização de estro. Durante esse período (com um dispositivo intravaginal de P4), as concentrações séricas de P4 foram superiores em novilhas zebuínas. Da mesma forma, em um outro estudo realizado pela nossa equipe (Dados não publicados), vacas NEL com dispositivo intravaginal de P4 tiveram maior concentração circulante de P4 do que as HPB. Pontualmente, em relação à P4 circulante, este achado pode ser decorrente de um metabolismo mais lento de hormônios esteróides em *Bos indicus*. É sabido que o elevado metabolismo hepático dos hormônios esteróides está diretamente correlacionado à alta ingestão de matéria seca (SANGSRITAVONG et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2003). No entanto, no estudo 1, todas as vacas estavam recebendo uma dieta para manutenção do PC e a IMS por Kg de PC foi de apenas 1,37% para NEL e 1,54% para HPB. Mesmo assim, as diferenças nas concentrações circulantes de P4 e E2 se mantiveram. Portanto, com base nestes resultados, é possível especular que o maior metabolismo dos esteróides na raça HPB pode ser uma característica inerente à raça e, não apenas uma consequência da elevada ingestão alimentar. Por outro lado, as fêmeas NEL podem ainda apresentar menor metabolismo hepático e/ou maior produção de esteróides do que as HPB, associado a concentrações circulantes mais altas de insulina e IGF-I.

Grande parte da P4 circulante é inativada ou catabolizada nos hepatócitos pelas enzimas citocromo P450 2C (CYP2C) e citocromo P450 3A (CYP3A) e os principais metabólitos são a 21-hidroxiprogesterona e a 6 β -hidroxiprogesterona, respectivamente (MURRAY 1991, 1992). Alguns trabalhos mostraram que a presença da insulina altera a expressão destas enzimas. Saad et al. (1994) e Sidhu e Omiecinski (1999) cultivaram hepatócitos de roedores na presença de

doses fisiológicas e crescentes de insulina e observaram menor expressão de mRNA da enzima CYP3A e também observaram uma diminuição dose-dependente na formação do metabólito 6 β -hidroxiprogesterona. Recentemente, Lemley et al. (2008) mostraram que a insulina altera a expressão destas enzimas em vacas de leite. Tais autores primeiramente induziram o aumento da insulina através da infusão de propilenoglicol e detectaram menor expressão da CYP3A. Posteriormente, infundiram insulina e glicose, a fim de causar uma curva hiperinsulinêmica-euglicêmica e observaram que a insulina causou um decréscimo dose-dependente na expressão de ambas as enzimas CYP2C e CYP3A.

Ambos, insulina e IGF-I atuam como potentes estimuladores da proliferação de células da granulosa e da esteroidogênese em bovinos (WEBB et al., 2004). O IGF-I atua de maneira sinérgica com o FSH na esteroidogênese, aumentando a atividade da P450 aromatase (ECHTERNKAMP et al., 1994). Silva & Price (2002) mostraram que concentrações de insulina em torno de 100 ng/mL no cultivo *in vitro* de células da granulosa de bovinos estimularam a expressão de mRNA e a atividade da P450 aromatase, além de aumentar a secreção de E2. Recentemente, Mani et al. (2010) cultivaram células da granulosa de bovinos com diferentes concentrações de IGF-I (1, 50 e 100 ng/mL) em um sistema livre de soro e sem insulina. Os autores também observaram que células cultivadas com IGF-I (50 e 100 ng/mL) tiveram um significativo aumento na produção de 17 β -estradiol, no número de células e na expressão de RNAm de genes relacionados à esteroidogênese (CYP11A1, HSD3B1 e CYP19A1) e dos genes que codificam os receptores de IGF-I e FSH (IGF1R e FSHR), enquanto o cultivo com somente FSH não apresentou nenhum efeito significativo. Além disso, foi relatado que o CL também possui receptores de IGF-I, potencializando a ação das gonadotrofinas e a síntese de P4 (SANTOS E AMSTALDEN, 1998).

Outra importante ação da insulina foi mostrada por Armstrong et al. (2001). Os autores encontraram que maiores concentrações de insulina, induzidas por alteração nos níveis nutricionais, diminuíram a expressão de IGFbps intraovarianas, aumentando a biodisponibilidade dos IGFs. Também foi citado por Gong et al. (2002) que o estado nutricional, ou seja, maiores concentrações circulantes de insulina, podem alterar a quantidade e a espécie de IGFbp na circulação periférica. É sabido que quanto menor é a concentração de IGFbps, maior é a concentração de IGF-I livre, potencializando assim a sua ação.

Dessa forma, com base nestes relatos da literatura, deve-se considerar a possibilidade da produção dos hormônios esteróides nos folículos e no CL ser, de fato, maior nos zebuínos que nos taurinos. Acredita-se que realmente a insulina e o IGF-I sejam os responsáveis por uma maior produção de esteróides nas fêmeas zebuínas. No entanto, ainda não existem relatos na literatura que tenham avaliado e comparado a produção e o metabolismo dos hormônios esteróides em fêmeas taurinas e zebuínas, tornando difícil saber se tais evidências realmente se confirmam.

No estudo 4, um dos objetivos era tentar determinar a quantidade de sangue, ou seja, o fluxo sanguíneo que passa pela veia cava caudal nas duas raças e a real produção dos hormônios esteróides. No entanto, o fato de não termos conseguido determinar o fluxo sanguíneo impossibilitou qualquer tipo de conclusão em relação à produção/metabolismo dos hormônios esteróides. Por meio da metodologia utilizada foi possível dosar as concentrações de P4 antes e após a passagem pelo fígado. Em ambos os locais, a P4 sempre foi superior nos animais Zebuínos. No entanto, a diferença, ou seja, a porcentagem de P4 que se perdeu durante passagem pelo fígado foi similar entre as raças. Infelizmente, essa informação não é suficiente para afirmarmos que as fêmeas Nelore produzem mais e metabolizam na mesma proporção ou menos.

Caso o fluxo sanguíneo seja superior nas fêmeas HPB, a proporção de metabolização de P4 no fígado também será superior, e, dessa forma, os valores absolutos das concentrações de P4 por mL deixam de ser reais.

Sendo assim, ainda existe a necessidade do desenvolvimento de uma metodologia que permita a determinar o fluxo sanguíneo, ou seja, o volume de sangue presente em cada raça e o quanto desse sangue passa pelo fígado por hora, para que seja possível saber qual a taxa de P4 metabolizada nas diferentes raças e em animais submetidos a diferentes manejos nutricionais.

6.1.5 Comportamento estral

No experimento 3 sobre comportamento estral em vacas NEL e HPB não lactantes, foi observada uma duração média de estro acima de 12 h em ambos os grupos genéticos, não tendo sido detectada diferença entre os grupos, apesar de termos detectado uma maior concentração circulante pré-ovulatória de E2 nas vacas NEL do que nas HPB nos demais experimentos.

Além disso, apesar de ter havido pouca interação racial, foi observada uma quantidade substancial de montas nas vacas em estro (acima de 30). Apesar de alguns estudos sugerirem que fêmeas zebuínas têm uma duração de estro menor do que taurinas, isso não foi observado neste estudo, assim como em outros dois estudos realizados por nossa equipe. A duração média do estro em novilhas NEL (MOLLO et al., 2007b; SARTORI & BARROS, 2011) ou vacas aneloradas (MAZIERO et al., 2011) foi superior a 12 h. Similarmente, apesar dos inúmeros relatos da curta duração de estro em vacas HPB lactantes na literatura, nossos resultados demonstraram uma duração relativamente longa de estro nas vacas HPB não lactantes. Novamente, um menor metabolismo hepático de E2 neste grupo de animais recebendo dieta de manutenção em relação a vacas lactantes é a mais provável explicação para estes achados.

Outro fator que pode ser levado em consideração é que os animais utilizados neste experimento são os mesmos utilizados nos demais. Dessa forma, eram animais já adaptados ao manejo diário e ao contato com pessoas no dia a dia. Sendo assim, acredita-se que, provavelmente, não houve interferência de nenhum fator de estresse devido ao manejo diário e à presença de pessoas observando o cio 24 horas por dia, principalmente em relação às fêmeas da raça Nelore.

6.2 Uso de benzoato de estradiol para sincronização da emergência da onda folicular em *Bos taurus* e *Bos indicus*

No segundo experimento, ao avaliar o efeito de diferentes doses de BE associadas a P4 na sincronização da emergência da onda folicular em NEL e HPB, foi observado que o BE associado à P4, de fato, tem efeito supressivo nas concentrações de FSH e na sincronização da emergência de uma nova onda folicular. Independente da dose de BE utilizada ou da raça, esse efeito sempre esteve presente. Uma série de estudos já desenvolvidos com os diversos ésteres de E2 encontrou resultados semelhantes (BO et al., 1991, 1993, 1994a, 1994b, 1995; O'ROURKE et al., 2000; MARTÍNEZ et al., 2005).

As concentrações plasmáticas de E2, o momento do início do pico de FSH, o momento do pico de FSH, assim como, o dia da emergência da onda folicular apresentaram resposta dose-dependente. Ou seja, quanto maior a dose de BE utilizada, maior foram as concentrações circulantes de E2. Conseqüentemente, mais tardio foi o aumento do FSH e o pico de FSH circulantes, o que resultou, também, em uma emergência de onda folicular mais tardia. Entretanto, o dia em que o desvio folicular ocorreu, tomando por base o dia da emergência, não diferiu entre os tratamentos. Estes resultados estão de acordo com outros estudos desenvolvidos

que testaram doses de BE (O'ROURKE et al., 2000 e BURKE et al., 2003). O'Rourke et al. (2000) desenvolveram um estudo com o objetivo de detectar a dose ótima de BE necessária para suprimir o FSH. Testaram as seguintes doses de BE, associadas a um dispositivo intravaginal de P4 (PRID): 0, 0,5, 1, 2,5, 5 e 10 mg de BE, administradas por via i.m. em novilhas de corte ovariectomizadas. Concluíram que a aplicação de BE resultou em um aumento dose-dependente das concentrações circulantes de E2. Da mesma forma, o aumento nas concentrações de E2 apresentou um efeito supressivo dose-dependente nas concentrações de FSH. O efeito supressivo do E2 sobre o FSH foi temporário, uma vez que as concentrações de FSH começaram a aumentar dentro de 1 a 2 dias após os tratamentos com BE. No entanto, neste estudo não foi avaliado o momento da emergência da onda folicular. Posteriormente, Burke et al. (2003) desenvolveram um estudo a fim de determinar o papel do BE no momento da emergência da onda folicular após ablação folicular, ou seja, posteriormente à retirada do efeito supressivo do folículo dominante. Após aspiração folicular guiada por ultrassonografia, fêmeas da raça Angus e Angus x Simental receberam 0, 1, 2 ou 4 mg de BE i.m. As concentrações circulantes de E2 aumentaram à medida que se aumentou a dose de BE, sendo elas: $29,1 \pm 2,9$, $63,7 \pm 9,0$ e $112,1 \pm 12,7$ pg/mL para as doses 1, 2 e 4 mg, respectivamente, 24h após o tratamento com BE. Corroborando estes resultados, no nosso estudo encontramos concentrações de E2 semelhantes, sendo elas: 37,3, 64,7 e 108,9 pg/mL para as doses 1, 2 e 4 mg de BE, 24h após o início dos tratamentos. Além disso, estes mesmos autores mostraram que o pico de FSH ocorreu, em média, $53,3 \pm 4,5$, $81,1 \pm 15,5$ e $91,4 \pm 8,2$ h após o tratamento com BE. Consequentemente, a emergência da onda folicular ocorreu $3,3 \pm 0,3$, $4,0 \pm 0,6$ e $4,4 \pm 0,4$ dias após o tratamento, respectivamente. Quanto ao momento do pico de FSH, neste estudo, encontramos que o mesmo ocorreu, em média, 83, 89,5 e 104,2 h após o início dos tratamentos, ou seja, um pouco mais tardio em relação aos resultados

encontrados por Burke et al. (2003). Essa pequena discrepância de resultados pode ser explicada pelo fato de que em nosso estudo as amostras de sangue foram colhidas a cada 24 horas. Já no estudo de Burke et al. (2003), amostras de sangue foram colhidas a cada 8 horas. Curiosamente, o momento da emergência da onda folicular foi semelhante nos dois estudos.

Foi observado que nos animais que receberam 1 mg de BE o FSH começou a aumentar mais precocemente quando comparado aos animais que receberam 2 e 4 mg de BE. Ou seja, no D2 (48h após o tratamento com BE) as concentrações de FSH foram maiores nos animais que receberam 1 mg, comparados aos demais tratamentos. Já nos animais que receberam 4 mg de BE o aumento do FSH foi mais tardio. Foi observado que no D3 (72h após o tratamento com BE) os animais que receberam 4mg de BE tinham menores concentrações circulantes de FSH do que os animais que receberam 1 e 2 mg. Como consequência do aumento mais tardio do FSH no tratamento 4 mg, no D6 (144h após tratamento com BE) as concentrações de E2 estavam mais elevadas nos animais que receberam 4 mg de BE do que nos animais que receberam 1 mg de BE. Esta diferença encontrada no perfil de FSH entre as diferentes doses de BE, se deve às concentrações de E2. Para que o FSH comece a aumentar é necessário que as concentrações de E2 estejam diminuindo (BO et al., 1994; O'ROURKE et al., 2000). É sabido que, maiores doses de BE, conseqüentemente, resultam em maiores concentrações circulantes de E2. Quanto maior a concentração de E2 circulante, maior é o tempo necessário para que ocorra o metabolismo do E2. Conseqüentemente, a queda do E2 circulante ocorre mais tardiamente, resultando em um pico de FSH mais tardio e similarmente, a emergência da onda folicular também é mais tardia. Quanto ao perfil de FSH, nossos resultados corroboram os resultados de O'Rourke et al. (2000) e Burke et al. (2003).

As diferenças na fisiologia reprodutiva entre raças observadas no presente estudo, independentes de tratamento, corroboram resultados do primeiro experimento (BASTOS et al., 2010), onde o número de folículos pequenos (2 a 5 mm) presentes nos ovários no momento da emergência folicular foi maior em NEL do que em HPB. Além disso, confirmou-se que o diâmetro do maior folículo no momento do desvio folicular foi maior nos animais taurinos que nos zebuínos, assim como a taxa de crescimento (mm/d) do folículo dominante. Sartori et al. (2001) mostraram que o desvio folicular em vacas HPB de alta produção ocorreu quando o maior folículo atingiu 8,5 a 9,0 mm e a taxa de crescimento do folículo dominante foi de 1,5 a 2,0 mm/d. Posteriormente, Gimenes et al. (2008) desenvolveram um estudo semelhante, porém com vacas NEL. Observaram que o desvio ocorreu quando o maior folículo atingiu 5,7 a 6,0 mm e a taxa de crescimento do folículo dominante foi de 0,8 a 1,0 mm/d. O experimento 1, apresentado nesta tese, foi desenvolvido recentemente a fim de, efetivamente, comparar a fisiologia reprodutiva de fêmeas não lactantes taurinas e zebuínas. Neste estudo, o desvio folicular ocorreu, em média, 2,3 d após a ovulação, independente de raça, quando o maior folículo atingiu $7,0 \pm 0,2$ e $8,9 \pm 0,4$ mm de diâmetro em NEL e HPB, respectivamente (BASTOS et al, 2010).

Quanto às concentrações circulantes de E2, observou-se que, mesmo mantidos nas mesmas condições ambientais e nutricionais, existe diferença no metabolismo dos hormônios esteróides entre animais da raça HPB e da raça NEL. Observou-se efeito de raça nas concentrações circulantes de E2 dentro de cada tratamento. Ou seja, fêmeas NEL apresentaram concentrações circulantes de E2 maiores que fêmeas HPB em todos os tratamentos (1, 2 e 4 mg de BE). Alguns estudos (SANGSRITAVONG et al., 2002 e VASCONCELOS et al., 2003) mostraram que vacas HPB de alta produção de leite apresentam concentrações circulantes dos hormônios esteróides mais baixas que vacas secas ou novilhas. Acredita-se que esta diferença exista por consequência

da alta ingestão de matéria seca necessária para dar suporte à elevada produção de leite. Animais submetidos a uma alta ingestão alimentar, apresentaram maior fluxo sanguíneo hepático e conseqüentemente maior metabolização hepática de P4 e E2 (SANGSRITAVONG et al., 2002). Posteriormente, Sartori et al. (2004) também mostraram que vacas lactantes desenvolvem maior folículo ovulatório, mas têm menor concentração sérica de E2 do que novilhas. No entanto, no estudo 1, foi realizada uma comparação da fisiologia de vacas não lactantes das raças NEL e HPB, recebendo uma mesma dieta de manutenção, sob as mesmas condições ambientais. Foi observado que vacas taurinas apresentam concentrações circulantes dos hormônios esteróides inferiores quando comparadas às fêmeas zebuínas, mesmo sendo mantidas nas mesmas condições nutricionais e não sendo submetidas a manejos com alta ingestão alimentar. Observou-se que o diâmetro máximo do folículo ovulatório ($15,7 \pm 0,3$ vs $13,4 \pm 0,3$ mm), assim como o volume do corpo lúteo (CL; 7611 ± 512 vs 4917 ± 548 mm³) foram maiores em taurinos que em zebuínos. Entretanto, as concentrações plasmáticas de P4 no D7 ($2,8 \pm 0,16$ vs $2,0 \pm 0,04$ ng/mL) e no D14 ($4,6 \pm 0,40$ vs $4,1 \pm 0,18$ ng/mL) do ciclo estral e o pico pré-ovulatório de E2 ($12,7 \pm 0,98$ vs $7,7 \pm 0,67$ pg/mL), foram maiores em fêmeas zebuínas que em taurinas (BASTOS et al., 2010). Com base nestes resultados, é possível especular que o maior metabolismo dos esteróides na raça HPB pode ser uma característica inerente à raça e, não apenas uma conseqüência da elevada ingestão alimentar. Dados não publicados do nosso laboratório têm corroborado esta hipótese. Recentemente, foi realizado um estudo a fim de detectar a concentração plasmática de P4 oriunda de uma fonte exclusivamente exógena de P4 (dispositivo intravaginal de P4, na ausência de CL) em vacas não lactantes das raças HPB e NEL, sob um mesmo manejo nutricional. Foi observado que, 12h após a inserção dos dispositivos de P4 as concentrações plasmáticas de P4 foram $1,4 \pm 0,2$ e $2,2 \pm 0,2$ ng/mL em HPB e NEL, respectivamente ($P < 0,01$). Além disso, os dados

de Carvalho (2004) também reforçam tal achado, o qual encontrou que a concentração sérica de progesterona durante o tratamento com dispositivo intravaginal de progesterona também foi mais elevada em novilhas *Bos indicus*.

Além disso, deve-se destacar que as concentrações circulantes de E2 apresentaram uma resposta dose-dependente aos tratamentos com BE. Quanto maior a dose de BE utilizada maiores as concentrações circulantes de E2, independente da raça. No entanto, foi observada uma maior sensibilidade dos animais da raça NEL às doses mais elevadas de BE. As fêmeas NEL responderam de forma mais acentuada que as fêmeas HPB aos diferentes tratamentos com BE.

As vacas HPB apresentaram maiores concentrações circulantes de FSH no momento do pico de FSH após o tratamento com BE, comparadas as vacas NEL. Tal achado provavelmente se deve às menores concentrações circulantes de E2. Sabe-se que o E2, juntamente com a Inibina, são os hormônio responsáveis pela supressão do FSH. Dessa forma, espera-se que animais com menores concentrações circulantes de E2 também apresentem maiores concentrações circulantes de FSH. Além disso, Evans et al. (2010) observaram maiores concentrações circulantes de FSH em vacas taurinas com população folicular menor em relação àquelas com mais folículos ovarianos. De fato, em nosso estudo e em vários outros estudos (BASTOS et al., 2010; SARTORI e BARROS, 2010; SARTORI et al., 2010) foi observada uma população folicular ovariana bem maior em fêmeas zebuínas do que taurinas.

CAPÍTULO 7

Considerações finais

Seguem abaixo 2 esquemas mostrando uma sequência dos resultados obtidos e que foram descritos ao longo desta tese, mostrando os principais resultados em relação à raça e em relação aos tratamentos de alta e baixa ingestão alimentar.

HPB

Menos Insulina e IGF-I

Menor número de folículos recrutados

Menos E2

Mais FSH

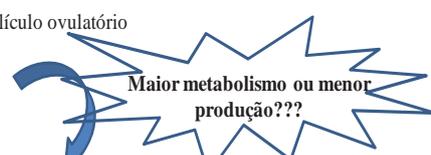
Maior taxa de crescimento do folículo

Maior diâmetro folicular no momento do desvio

Maior diâmetro do folículo ovulatório

Maior Volume do CL

Pico pré-ovulatório de E2 e concentração circulante de P4 menores



Nelore

Mais Insulina e IGF-I

Maior número de folículos recrutados

Mais E2

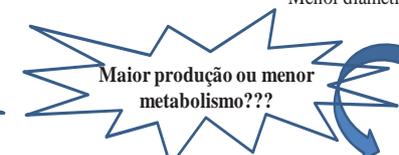
Menos FSH

Menor taxa de crescimento do folículo

Menor diâmetro folicular no momento do desvio

Menor diâmetro do folículo ovulatório

Menor volume do CL



Pico pré-ovulatório de E2 e concentração circulante de P4 maiores

Alta ingestão alimentar

Mais Insulina

Número de folículos recrutados semelhante

Maior taxa de crescimento do folículo

Momento do desvio folicular mais tardio

Maior diâmetro folicular no momento do desvio

Maior diâmetro do folículo ovulatório

Maior volume do CL

Pico pré-ovulatório de E2 e concentração circulante de P4 menores



Restrição alimentar

Menos Insulina

Número de folículos recrutados semelhante

Menor taxa de crescimento do folículo

Momento do desvio folicular mais precoce

Menor diâmetro folicular no momento do desvio

Menor diâmetro do folículo ovulatório

Menor volume do CL

Pico pré-ovulatório de E2 e concentração circulante de P4 maiores



Após a realização de todos esses experimentos foi possível chegar a uma série de resultados bastante interessantes quando se trata do objetivo de comparar efetivamente as diferentes raças, neste caso, Nelore e HPB.

Com base nestes resultados foi possível concluir que, de fato, existem diferenças entre essas duas raças e que essas diferenças persistem mesmo quando manejadas sob as mesmas condições de ambiente e nutrição. É sabido que as condições em que os experimentos foram desenvolvidos não refletem a realidade de manejo destas raças, logo tais resultados não podem ser extrapolados para outras condições de manejo. No entanto acredita-se que ao trabalhar com essas duas raças nas suas reais condições essas diferenças possam ser ainda mais pronunciadas. Uma vez que, uma vaca HPB em lactação provavelmente terá um metabolismo ainda mais acelerado do que uma vaca seca, apenas recebendo dieta de alta ingestão. Assim como, vacas Nelore manejadas a pasto terão acesso a uma dieta muito menos insulinêmica do que o que foi proposto neste experimento, já que trabalhamos com uma dieta com alto teor de grão. No entanto, essa metodologia foi escolhida exatamente para permitir uma real comparação entre as raças. Vale ressaltar que devido a essa metodologia foi possível provar que as diferenças na fisiologia reprodutiva (concentrações hormonais e dinâmica ovariana) persistem, mesmo quando forçamos uma condição semelhante para ambas as raças. Espera-se que tais resultados possam trazer grandes contribuições para o entendimento da fisiologia e possibilite desenvolver estratégias de manejo mais adequadas para cada raça.

Além disso, também foi possível constatar e corroborar alguns resultados prévios, de que alterações na dieta podem alterar a dinâmica ovariana e as concentrações circulantes dos hormônios esteróides e metabólicos.

No entanto, alguns pontos ainda não foram totalmente esclarecidos, dentre eles, e talvez o principal, identificar as diferenças na produção e metabolismo dos hormônios esteróides. Portanto, novos estudos precisam ser realizados a fim de desenvolver estratégias metodológicas para efetivamente avaliar a produção de E2 e P4 pelo ovário e o metabolismo hepático destes hormônios nos animais destes distintos grupos genéticos.

REFERÊNCIAS

Adamiak S.J., Mackie K., Watt R.G., Webb R. & Sinclair K.D. (2005) Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biol Reprod* **73**, 918-26.

Adams G.P., Kot K., Smith C.A. & Ginther O.J. (1993) Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. *Animal Reproduction Science* **30**, 259-71.

Allrich R.D. (1994) Endocrine and neural control of estrus in dairy cows. *J Dairy Sci* **77**, 2738-44.

Alvarez P., Spicer L.J., Chase C.C., Payton M.E., Hamilton T.D., Stewart R.E., Hammond A.C., Olson T.A. & Wettemann R.P. (2000) Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *J Anim Sci* **78**, 1291-302.

ANUALPEC (2010) Anuário da Pecuária Brasileira (ANUALPEC).

Armstrong D.G., McEvoy T.G., Baxter G., Robinson J.J., Hogg C.O., Woad K.J., Webb R. & Sinclair K.D. (2001) Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. *Biol Reprod* **64**, 1624-32.

ASBIA (2010) Relatório estatístico de importação, exportação e comercialização de sêmen. (ed. by Artificial ABdI).

Bao B., Garverick H.A., Smith G.W., Smith M.F., Salfen B.E. & Youngquist R.S. (1997) Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biol Reprod* **56**, 1158-68.

Baruselli P., Ayres H., Souza A., Martins C., Gimenes L. & Torres-Júnior J. (2006) Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de corte. In: *2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada*, p. 113-32, Londrina, Paraná, Brasil.

Baruselli P., Gimenes L. & Sales J. (2007) Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* **31**, 205-11.

Bastos M., Mattos M., Meschiatti M., Surjus R., Guardieiro M., Ferreira J., Mourão G., Pires A., Biehl M., Pedroso A., Santos F. & Sartori R. (2010) Ovarian function and circulating hormones in nonlactating Nelore versus Holstein cows [abstract]. *Acta Scientiae Veterinariae* **38 (Suppl 2)**, 776.

Beg M.A., Bergfelt D.R., Kot K., Wiltbank M.C. & Ginther O.J. (2001) Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biol Reprod* **64**, 432-41.

Bergfelt D.R., Lightfoot K.C. & Adams G.P. (1994) Ovarian dynamics following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology*, 42: 895-907. *Theriogenology* **42**, 895-907.

Bo G.A., Adams G.P., Nasser L.F., Pierson R.A. & Mapletoft R.J. (1993) Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. *Theriogenology* **40**, 225-39.

Bo G.A., Pierson R.A. & Mapletoft R.J. (1991) The effect of estradiol valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cows with Syncro-Mate-B implants. *Theriogenology* **36**, 169-83.

Bossis I., Wettemann R.P., Welty S.D., Vizcarra J.A., Spicer L.J. & Diskin M.G. (1999) Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function preceding cessation of ovulation. *J Anim Sci* **77**, 1536-46.

Buratini J., Price C., Visintin J. & Bo G. (2000) Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology* **54**, 421-31.

Burke C.R., Mussard M.L., Gasser C.L., Grum D.E. & Day M.L. (2003) Estradiol benzoate delays new follicular wave emergence in a dose-dependent manner after ablation of the dominant ovarian follicle in cattle. *Theriogenology* **60**, 647-58.

Bó G., Caccia M., Martinez M., Adams G., Pierson R. & Mapletoft R. (1994a) The use of estradiol-17b and progestogen treatment for the control of follicular wave dynamics in beef cattle. *Theriogenology* **40**, 165.

Bó G.A., Adams G.P., Caccia M., Martinez M., Pierson R.A. & Mapletoft R.J. (1995) Ovarian Follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science* **39**, 193-204.

Bó G.A., Adams G.P., Pierson R.A., Tribulo H.E., Caccia M. & Mapletoft R.J. (1994b) Follicular wave dynamics after estradiol-17B treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology* **41**, 1555-69.

Bó G.A., Baruselli P.S. & Martínez M.F. (2003) Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci* **78**, 307-26.

Bó G.A., Baruselli P.S., Moreno D., Cutaia L., Caccia M., Tribulo R., Tribulo H. & Mapletoft R.J. (2002) The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* **57**, 53-72.

Carvalho J.B.P. Sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR) em novilhas *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus* e *Bos taurus*. São Paulo, 2004. 122 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004.

Carvalho J.B., Carvalho N.A., Reis E.L., Nichi M., Souza A.H. & Baruselli P.S. (2008) Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology* **69**, 167-75.

Castilho C., Garcia J.M., Renesto A., Nogueira G.P. & Brito L.F. (2007) Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Anim Reprod Sci* **98**, 189-96.

De la Sota R.L., Lucy M.C., Staples C.R. & Thatcher W.W. (1993) Effects of recombinant bovine somatotropin (sometribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. *J Dairy Sci* **76**, 1002-13.

DeSouza M.M. & Murray M.K. (1995) An estrogen-dependent secretory protein, which shares identity with chitinases, is expressed in a temporally and regionally specific manner in the sheep oviduct at the time of fertilization and embryo development. *Endocrinology* **136**, 2485-96.

Diskin M.G., Mackey D.R., Roche J.F. & Sreenan J.M. (2003) Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci* **78**, 345-70.

Echternkamp S.E., Howard H.J., Roberts A.J., Grizzle J. & Wise T. (1994) Relationships among concentrations of steroids, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding proteins in ovarian follicular fluid of beef cattle. *Biol Reprod* **51**, 971-81.

Ereno R.L. (2008) Expressão gênica das isoformas do receptor do hormônio luteinizante (LHR) em células da granulosa, antes, durante e após o desvio folicular em novilhas. In: *Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia*. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brazil.

Evans A.C. & Fortune J.E. (1997) Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology* **138**, 2963-71.

Evans A.C., Mossa F., Fair T., Lonergan P., Butler S.T., Zielak-Steciwko A.E., Smith G.W., Jimenez-Krassel F., Folger J.K., Ireland J.L. & Ireland J.J. (2010) Causes and consequences of the variation in the number of ovarian follicles in cattle. *Soc Reprod Fertil Suppl* **67**, 421-9.

Figueiredo R., Barros C., Pinheiro O. & Soler J. (1997) Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology* **47**, 1489-505.

Fortune J.E., Rivera G.M., Evans A.C. & Turzillo A.M. (2001) Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod* **65**, 648-54.

Freret S., Grimard B., Ponter A.A., Joly C., Ponsart C. & Humblot P. (2006) Reduction of body-weight gain enhances in vitro embryo production in overfed superovulated dairy heifers. *Reproduction* **131**, 783-94.

Garverick H., Baxter G., Gong J., Armstrong D., Campbell B., Gutierrez C. & Webb R. (2002) Regulation of expression of ovarian mRNA encoding steroidogenic enzymes and gonadotrophin receptors by FSH and GH in hypogonadotrophic cattle. *Reproduction* **123**, 651-61.

Gimenes L., Sa M., Carvalho N., Torres J., Souza A., Madureira E., Trinca L., Sartorelli E., Barros C., Carvalho J., Mapletoft R. & Baruselli P. (2008) Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology* **69**, 852-8.

Ginther O.J., Kastelic J.P. & Knopf L. (1989) Intraovarian relationships among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers. *Theriogenology* **32**, 787-95.

Ginther O.J., Wiltbank M.C., Fricke P.M., Gibbons J.R. & Kot K. (1996) Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod* **55**, 1187-94.

Gong J., Armstrong D., Baxter G., Hogg C., Garnsworthy P. & Webb R. (2002a) The effect of increased dietary intake on superovulatory response to FSH in heifers. *Theriogenology* **57**, 1591-602.

Gong J., Lee W., Garnsworthy P. & Webb R. (2002b) Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. *Reproduction* **123**, 419-27.

Gutierrez C., Oldham J., Bramley T., Gong J., Campbell B. & Webb R. (1997) The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. *Journal of Animal Science* **75**, 1876-84.

Ireland J.J. & Roche J.F. (1982) Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotropin receptors. *Endocrinology* **111**, 2077-86.

- Kawashima C., Kida K., Hayashi K.G., Amaya Montoya C., Kaneko E., Matsunaga N., Shimizu T., Matsui M., Miyake Y., Schams D. & Miyamoto A. (2007) Changes in plasma metabolic hormone concentrations during the ovarian cycles of Japanese black and holstein cattle. *J Reprod Dev* **53**, 247-54.
- King R.S., Anderson S.H. & Killian G.J. (1994) Effect of bovine oviductal estrus-associated protein on the ability of sperm to capacitate and fertilize oocytes. *J Androl* **15**, 468-78.
- Knopf L., Kastelic J., Schallenberger E. & Ginther O. (1989) Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Domest Anim Endocrinol* **6**, 111-9.
- Ko J.C., Kastelic J.P., Del Campo M.R. & Ginther O.J. (1991) Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. *J Reprod Fertil* **91**, 511-9.
- Kulick L.J., Kot K., Wiltbank M.C. & Ginther O.J. (1999) Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology* **52**, 913-21.
- Landaeta-Hernández A.J., Palomares-Naveda R., Soto-Castillo G., Atencio A., Chase C.C. & Chenoweth P.J. (2004) Social and breed effects on the expression of a PGF2alpha induced oestrus in beef cows. *Reprod Domest Anim* **39**, 315-20.
- Lemley C.O., Butler S.T., Butler W.R. & Wilson M.E. (2008) Short communication: insulin alters hepatic progesterone catabolic enzymes cytochrome P450 2C and 3A in dairy cows. *J Dairy Sci* **91**, 641-5.
- Lopez H., Sartori R. & Wiltbank M. (2005) Reproductive hormones and follicular growth during development of one or multiple dominant follicles in cattle. *Biology of Reproduction* **72**, 788-95.
- Lopez H., Satter L.D. & Wiltbank M.C. (2004) Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci* **81**, 209-23.
- Mapletoft R., Bó G. & Adams G. (2008) Techniques for synchronization of follicular wave emergence and ovulation: Past, present and future. In: *3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada*, pp. 15-25, Londrina, Paraná, Brasil.

Martins A., Mollo M., Bastos M., Guardieiro M. & Sartori R. (2008) Concentrações séricas hormonais em vacas azebuadas submetidas à baixa e alta ingestão alimentar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **43**, 243-7.

Martínez M., Kastelic J., Bó G., Caccia M. & Mapletoft R. (2005a) Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. *Anim Reprod Sci* **86**, 37-52.

Martínez M.F., Kastelic J.P., Bó G.A., Caccia M. & Mapletoft R.J. (2005b) Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. *Anim Reprod Sci* **86**, 37-52.

Martínez M.F., Kastelic J.P., Colazo M.G. & Mapletoft R.J. (2007) Effects of estradiol on gonadotrophin release, estrus and ovulation in CIDR-treated beef cattle. *Domest Anim Endocrinol* **33**, 77-90.

Mattos M.C., Bastos M.R., Guardieiro M.M., Carvalho J.O., Franco M.M., Mourão G.B., Barros C.M. & Sartori R. (2011) Improvement of embryo production by the replacement of the last two doses of porcine follicle-stimulating hormone with equine chorionic gonadotropin in Sindhi donors. *Anim Reprod Sci* **125**, 119-23.

Maziero R.R.D., Martins A.C., Mollo M.R., Martin I., Bastos M.R., Ferreira J.C.P., Rumpf R. & Sartori R. (2011) Ovarian function in cows submitted to acute stress during proestrus. *Livestock Science* **138**, 105-8.

McShane T.M., Petersen S.L., McCrone S. & Keisler D.H. (1993) Influence of food restriction on neuropeptide-Y, proopiomelanocortin, and luteinizing hormone-releasing hormone gene expression in sheep hypothalami. *Biol Reprod* **49**, 831-9.

Membrive C. (2000) Estudo da sincronização das ondas foliculares e das características de estros, por radiotelemetria, em novilhas cruzadas (Bos indicus x Bos taurus) tratadas com acetate de melengestrol e prostaglandina associados a hCG, GnRH ou 17b estradiol + progesterona. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

Mizuta K. (2003) Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, progesterona, e estradiol que precedem a ovulação em fêmeas bovinas Nelore (*Bos taurus indicus*), Angus (*Bos taurus taurus*) e Nelore x Angus (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*). In: *Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia*. Universidade de São Paulo.

Mollo M., Rumpf R., Martins A., Carrijo L., Saueressig M. & Sartori R. (2007a) Produção de embriões em novilhas Nelore superovuladas submetidas à baixa ou alta ingestão alimentar [abstract]. *Acta Scientiae Veterinarie* **35**, 1241.

Mollo M., Rumpf R., Martins A., Mattos M., Lopes Jr G., Carrijo L. & Sartori R. (2007b) Função ovariana em novilhas Nelore submetidas a baixa ou alta ingestão alimentar. *Acta Scientiae Veterinarie* **35**, 958.

Murphy M.G., Enright W.J., Crowe M.A., McConnell K., Spicer L.J., Boland M.P. & Roche J.F. (1991) Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. *J Reprod Fertil* **92**, 333-8.

Murray M. (1991) Microsomal cytochrome P450-dependent steroid metabolism in male sheep liver. Quantitative importance of 6 beta-hydroxylation and evidence for the involvement of a P450 from the IIIA subfamily in the pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol* **38**, 611-9.

Murray M. (1992) Participation of a cytochrome P450 enzyme from the 2C subfamily in progesterone 21-hydroxylation in sheep liver. *J Steroid Biochem Mol Biol* **43**, 591-3.

Nebel R., Jobst S., Dransfield M., Pandolfi S. & Bailey T. (1997) Use of radiofrequency data communication system, Heat Watch, to describe behavioral estrus in dairy cattle [abstract]. *Journal of Dairy Science* **80**, 151.

Nolan R., O'Callaghan D., DUBY R.T., Lonergan P. & Boland M.P. (1998) The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following superovulation in beef heifers. *Theriogenology* **50**, 1263-74.

O'Rourke M., Diskin M.G., Sreenan J.M. & Roche J.F. (2000) The effect of dose and route of oestradiol benzoate administration on plasma concentrations of oestradiol and FSH in long-term ovariectomised heifers. *Anim Reprod Sci* **59**, 1-12.

Parr R.A., Davis I.F., Miles M.A. & Squires T.J. (1993) Feed intake affects metabolic clearance rate of progesterone in sheep. *Res Vet Sci* **55**, 306-10.

Pierson R.A. & Ginther O.J. (1984) Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology* **21**, 495-504.

Pinheiro O., Barros C., Figueiredo R., do Valle E., Encarnacao R. & Padovani C. (1998) Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2 alpha or norgestomet and estradiol valerate. *Theriogenology* **49**, 667-81.

Pursley J.R., Stevenson J.S. & Minton J.E. (1993) Ovarian follicular waves in dairy cows after administration of gonadotropin-releasing hormone at estrus. *J Dairy Sci* **76**, 2548-60.

Rae D.O., Chenoweth P.J., Giangreco M.A., Dixon P.W. & Bennett F.L. (1999) Assessment of estrus detection by visual observation and electronic detection methods and characterization of factors associated with estrus and pregnancy in beef heifers. *Theriogenology* **51**, 1121-32.

Randel R.D. (1976) LH and ovulation in Brahman, Brahman x Hereford and Hereford heifers. In: *68th Annual Meeting of the American Society of Animal Science Texas A&M University*, p. 300. J ANIM SCI, TEXAS.

Rhodes F.M., Fitzpatrick L.A., Entwistle K.W. & De'ath G. (1995) Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrus. *J Reprod Fertil* **104**, 41-9.

Saad B., Thomas H., Schawalder H., Waechter F. & Maier P. (1994) Oxygen tension, insulin, and glucagon affect the preservation and induction of cytochrome P450 isoforms in cultured rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* **126**, 372-9.

Sales J.N.S. (2011) Efeito da dieta com alta energia nos parâmetros metabólicos, endócrinos e reprodutivos de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus*. In: *Reprodução Animal*. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Sangsrivavong S., Combs D., Sartori R., Armentano L. & Wiltbank M. (2002a) High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 beta in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* **85**, 2831-42.

Sangsrivavong S., Combs D.K., Sartori R., Armentano L.E. & Wiltbank M.C. (2002b) High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17beta in dairy cattle. *J Dairy Sci* **85**, 2831-42.

Santos J. & Amstalden M. (1998) Effects of nutrition on bovine reproduction. In: *13 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões*, pp. 19-89. Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

Sartorelli E., Carvalho L., Bergfelt D., Ginther O. & Barros C. (2003) Morphological characterization of the beginning of follicle deviation in Nelore heifers and cows. *Arquivo da Faculdade de Veterinária UFRGS* **29 (Suplemento)**.

Sartorelli E., Carvalho L., Bergfelt D., Ginther O. & Barros C. (2005) Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology* **63**, 2382-94.

Sartori R. & Barros C. (2011) Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science* **124**, 244-50.

Sartori R., Bastos M., Baruselli P., Gimenes L., Ereno R. & Barros C. (2010a) Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. *Reproduction in Domestic Ruminants Vii* **67**, 357-75.

Sartori R., Bastos M., Mollo M. & Martins A. (2007) Influência da ingestão alimentar na produção de embriões bovinos. *Acta Scientiae Veterinarie* **35**, 869-73.

Sartori R., Bastos M.R. & Wiltbank M.C. (2010b) Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle. *Reprod Fertil Dev* **22**, 151-8.

Sartori R., Fricke P., Ferreira J., Ginther O. & Wiltbank M. (2001) Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biology of Reproduction* **65**, 1403-9.

Sartori R. & Guardieiro M.M. (2010) Fatores nutricionais associados à reprodução da fêmea bovina. *Revista Brasileira de Zootecnia* **39**, 422-32.

Sartori R., Haughian J., Shaver R., Rosa G. & Wiltbank M. (2004) Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *Journal of Dairy Science* **87**, 905-20.

Sartori R., Mattos M.C.C., Bastos M.R., Oliveira T.A., Guenther J.N. & Wiltbank M.C. (2011) Conception rates of fresh and frozen in vivo-produced morulae and blastocysts in lactating dairy recipient cows. *Reproduction Fertility and Development* **23**, 178-9.

Sartori R. & Mollo M. (2007) Influência da ingestão alimentar na fisiologia reprodutiva da fêmea bovina. *Rev. Bras. Reprod. Anim* **31**, 197-204.

Sartori R., Rosa G. & Wiltbank M. (2002) Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science* **85**, 2813-22.

Savio J., Thatcher W., Morris G., Entwistle K., Drost M. & Mattiacci M. (1993) Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. *J Reprod Fertil* **98**, 77-84.

Savio J.D., Boland M.P. & Roche J.F. (1990) Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in post-partum dairy cows. *J Reprod Fertil* **88**, 581-91.

Savio J.D., Keenan L., Boland M.P. & Roche J.F. (1988) Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil* **83**, 663-71.

Scaramuzzi R.J., Campbell B.K., Downing J.A., Kendall N.R., Khalid M., Muñoz-Gutiérrez M. & Somchit A. (2006) A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod Nutr Dev* **46**, 339-54.

Segerson E.C., Hansen T.R., Libby D.W., Randel R.D. & Getz W.R. (1984) Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. *J Anim Sci* **59**, 1026-46.

Senger P.L. (1994) The estrus detection problem: new concepts, technologies, and possibilities. *J Dairy Sci* **77**, 2745-53.

Shingu H., Hodate K., Kushibiki S., Ueda Y., Watanabe A., Shinoda M. & Matsumoto M. (2002) Breed differences in growth hormone and insulin secretion between lactating Japanese Black cows (beef type) and Holstein cows (dairy type). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **132**, 493-504.

Sidhu J.S. & Omiecinski C.J. (1999) Insulin-mediated modulation of cytochrome P450 gene induction profiles in primary rat hepatocyte cultures. *J Biochem Mol Toxicol* **13**, 1-9.

Silva J.M. & Price C.A. (2002) Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro. *J Endocrinol* **174**, 499-507.

Simpson R.B., Chase C.C., Spicer L.J., Vernon R.K., Hammond A.C. & Rae D.O. (1994) Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular oestradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows. *J Reprod Fertil* **102**, 483-92.

Sinclair K.D., Kuran M., Gebbie F.E., Webb R. & McEvoy T.G. (2000) Nitrogen metabolism and fertility in cattle: II. Development of oocytes recovered from heifers offered diets differing in their rate of nitrogen release in the rumen. *J Anim Sci* **78**, 2670-80.

Sirois J. & Fortune J. (1988) Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod* **39**, 308-17.

Thomas M.G., Bao B. & Williams G.L. (1997) Dietary fats varying in their fatty acid composition differentially influence follicular growth in cows fed isoenergetic diets. *J Anim Sci* **75**, 2512-9.

Townson D.H., Tsang P.C., Butler W.R., Frajblat M., Griel L.C., Johnson C.J., Milvae R.A., Niksic G.M. & Pate J.L. (2002) Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. *J Anim Sci* **80**, 1053-8.

Vasconcelos J., Sartori R., Oliveira H., Guenther J. & Wiltbank M. (2001) Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* **56**, 307-14.

Vasconcelos J.L., Sangsritavong S., Tsai S.J. & Wiltbank M.C. (2003) Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. *Theriogenology* **60**, 795-807.

Viana J. & Camargo L. (2007) A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. *Acta Scientiae Veterinarie* **35**, 915-9.

Viana J., Ferreira A., Sá W. & Camargo L. (2000) Follicular dynamics in zebu cattle. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **35**, 2501-09.

Webb R. & England B.G. (1982) Relationship between LH receptor concentrations in thecal and granulosa cells and in-vivo and in-vitro steroid secretion by ovine follicles during the preovulatory period. *J Reprod Fertil* **66**, 169-80.

Webb R., Garnsworthy P.C., Gong J.G. & Armstrong D.G. (2004) Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci* **82 E-Suppl**, E63-74.

Wilson S.J., Kirby C.J., Koenigsfeld A.T., Keisler D.H. & Lucy M.C. (1998a) Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 2. Heifers. *J Dairy Sci* **81**, 2132-8.

Wilson S.J., Marion R.S., Spain J.N., Spiers D.E., Keisler D.H. & Lucy M.C. (1998b) Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating cows. *J Dairy Sci* **81**, 2124-31.

Wiltbank M., Gumen A. & Sartori R. (2002) Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* **57**, 21-52.

Wiltbank M., Lopez H., Sartori R., Sangsritavong S. & Gümen A. (2006) Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology* **65**, 17-29.

Xu Z., Garverick H.A., Smith G.W., Smith M.F., Hamilton S.A. & Youngquist R.S. (1995) Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol Reprod* **53**, 951-7.

Zeitoun M., Rodriguez H. & Rande R. (1996) Effect of season on ovarian follicular dynamics in Brahman cows. *Theriogenology* **45**, 1577-81.

SÚMULA CURRICULAR

Resumos publicados em Eventos Nacionais e Internacionais de 3 experimentos que foram desenvolvidos durante o doutorado:

Bastos, M.R.; Mattos, M.C.C.; Meschiatti, M.A.P.; Surjus, R.S.; Guardieiro, M.M.; Ferreira, J.C.P.; Mourão, G.B.; Pires, A.V.; Biehl, M.V.; Pedroso, A.M.; Santos, F.A.P.; Sartori, R. Ovarian function and circulating hormones in nonlactating nelore versus holstein cows. *Acta Scientiae Veterinariae*, 38 (Supl2): s776, Abstract 161, 2010.

Bastos, M.R.; Surjus, R.S.; Prata, A.B.; Meschiatti, M.A.P.; Borsato, M.; Mourão, G.B.; Pedroso, A.M.; Pires, A.V.; Sartori, R. Efeito da dose de benzoato de estradiol em associação à progesterona na sincronização da emergência da onda folicular em vacas *Bos indicus* e *Bostaurus*. *Acta Scientiae Veterinariae*, 39 (Supl 1): 376, Abstract R092, 2011.

Bastos, M.R.; Meschiatti, M.A.P.; Surjus, R.S.; Prata, A.B.; Lemes, A.P.; Guardieiro, M.M.; Santos, F.A.P.; Sartori, R. Estrus length and intensity in *Bostaurus* (Holstein) versus *Bos indicus* (Nelore) nonlactating cows. **Reproduction, Fertility and Development**. v.23. p.110-110, 2011.

Recentemente trabalhou em 4 revisões de literatura, sendo elas:

Sartori, R.; Bastos, M.R.; Wiltbank, M.C. Factors affecting fertilization and early embryo quality in single and superovulated dairy cattle. **Reproduction, Fertility and Development**. v.22, p.151–158, 2010.

Sartori, R. Bastos, M.R., Baruselli, P.S.; Gimenes, L.U.; Ereno, R.L.; Barros, C.M. Physiological differences and implications to reproductive management of *Bostaurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. **Proceedings of the Eighth International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants. Society of Reproduction and Fertility**, v.67, p.357-375, de 3 a 7 de Setembro de 2010, Anchorage, Alaska.

Sartori, R.; Bastos, M.R.; Mattos, M.C.C. Review Article: Physiological bases for understanding estrous cycle differences between *Bostaurus* and *Bosindicus*. *Acta Scientiae Veterinariae*, 38 (Supl2): s277-s315. Revisão publicada no Workshop "Fisiologia Reprodutiva Bovina: Conhecimentos Aplicados para Otimizar a Fertilidade e o Melhoramento Genético", o qual aconteceu durante a XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões).

Sartori, R. Guardieiro, M.M.; Surjus, R.S.; Bastos, M.R. Fatores nutricionais que influenciam a qualidade embrionaria em bovinos. **4º Simpósio Internacional de Reprodução animal Aplicada**. 23 a 25 de setembro de 2010, Londrina-PR, p.56-67, 2010.

Além disso, também está na co-autoria de 4 resumos publicados na XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE-2010), de dois resumos publicados na IETS 2010 e de três artigos completos publicados na revista Pesquisa Agropecuária Brasileira, na revista Animal Reproduction Science e na Revista Livestock Science. Sendeoles:

Oliveira, A.C.S.; Mattos, M.C.C.; Bastos, M.R.; Lunardi, L.H.; Surjus, R.S.; Sartori, R.; Barros, C.M. Efficiency of protocol p-36, associated with ecg or lh administration, in the last day of superestimulatory treatment, in nelore cows. *Acta Scientiae Veterinariae*, 38 (Supl 2): s707, Abstract 48.

Machado, G.M.; Ferreira, A.R.; Guardieiro, M.M.; Bastos, M.R.; Diesel, T.; Sartori, R.; Rumpf, R.; Franco, M.M.; Dode, M.A.N. Post-hatching development of in vivo and in vitro produced bovine embryo: morphological and molecular characteristics. *Acta Scientiae Veterinariae*, 38 (Supl 2): s758, Abstract 133.

Mattos, F.C.S.Z.; Bastos, M.R.; Lemes, A.P.; Mattos, M.C.C.; Guardieiro, M.M.; Marques-Filho, W.C.; Canavessi, A.M.O.; Susin, I.; Mourão, G.B.; Sartori, R. Influence of high or low feed intake on circulating insulin and progesteron concentrations in prepubertal ewes. *Acta Scientiae Veterinariae*, 38 (Supl 2), s784, Abstract 177.

Mattos, M.C.C.; Bastos, M.R.; Oliveira, A.C.S.; Gonçalves, J.R.S.; Lima, L.G.; Sousa, R.V.; Pires, A.V.; Mourão, G.B.; Sartori, R. Cryotolerance of morulae and blastocysts produced *in vivo* in *Bosindicus*. *Acta Scientiae Veterinariae*, 38 (Supl 2), s815, Abstract 223.

Guardieiro, M.M., Machado, G.M., Bastos, M.R., Mourão, G.B., Carrijo, L.H.D., Dode, M.A.N., Sartori R. Post cryopreservation viability of embryos from Nelore heifers supplemented with rumen-protected fat. *Reproduction, Fertility and Development*. v.22, p.205-206, 2010.

Mattos, M. C. C.; Bastos, M. R.; Guardieiro M. M.; Carvalho J. O.; Mourão G. B.; Barros C. M.; Sartori R. Improvement on embryo quality by the replacement of the last two doses of pfsh by ecg in superstimulatedsindi donors. *Reproduction, Fertility and Development*. v.22, p.364, 2010. Abstract.

Guardieiro, M.M.; Bastos, M.R.; Mourao, G.B.; Carrijo, L.H.D.; Melo, E.O.; Rumpf, R.; Sartori, R. Função ovariana de novilhas Nelore alimentadas com dieta suplementada com gordura protegida ruminal. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.45, p.408-414, 2010.

M.C.C. Mattos, M.R.Bastos, M.M.Guardieiro, J.O.Carvalho, M.M.Franco, G.B. Mourão, C.M.Barros, R.Sartori. Improvement of embryo production by the replacement of the last two doses of porcine follicle-stimulating hormone with equine chorionic gonadotropin in Sindhi donors. *Animal Reproduction Science*. v.125, p.119-123, 2011.

R.R.D. Maziero, A.C. Martins, M.R. Mollo, I. Martin, M.R. Bastos, J.C.P. Ferreira, R. Rumpf, R. Sartori. Ovarian function in cows submitted to acute stress during proestrus. *Livestock Science*, v.138, p.105–108, 2011.

ANEXO I

Capítulo de livro que foi publicado durante o doutorado. Neste capítulo constam os resultados obtidos com o Experimento 1, o qual está descrito no Capítulo 2 desta tese.



Reproduction in Domestic Ruminants VII

Edited by
M.C. Lucy, J.L. Pate, M.F. Smith and T.E. Spencer



Nottingham
University Press

Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment

R Sartori¹, MR Bastos², PS Baruselli³, LU Gimenes³, RL Ereno⁴
and CM Barros⁴

¹Department of Animal Science, ESALQ, University of São Paulo (USP), Piracicaba, SP, Brazil, 13418-900. ²Department of Animal Reproduction and Radiology, FMVZ, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil, 18618-000. ³Department of Animal Reproduction, FMVZ, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil, 05508-000. ⁴Department of Pharmacology, IBB, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil, 18618-000

In the current review the main fundamental biological differences in reproductive function between *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle are discussed. Breed differences regarding puberty, estrous cycle patterns, estrous behavior, acquisition of ovulatory capacity, ovarian structures and reproductive hormones are presented. The main physiological differences that *Bos indicus* cattle present relative to *Bos taurus* cattle include: delayed age at puberty; higher circulating concentrations of hormones such as estradiol, progesterone, insulin and IGF-I, despite having smaller ovulatory follicle size and corpora lutea; greater population of small follicles and smaller size of the dominant follicle at deviation; and greater sensitivity of follicles to gonadotropins. Knowledge of the differences between *Bos indicus* and *Bos taurus* breeds help explain different management procedures and responses to hormonal treatments associated with artificial insemination, ovarian superstimulation, and in vivo and in vitro embryo production.

Introduction

Over the years, cattle have been raised and selected especially for meat and dairy production and the majority of breeds are either *Bos taurus* or *Bos indicus* (Zebu). Some of the *Bos taurus* breeds, such as Holstein and Jersey, have been selected for high milk production, and others for beef production. Due to intensive selection, *Bos taurus* breeds are very efficient for food production as compared to other breeds; however, they are not well adapted to tropical environments and cannot maximize their potential for production in the tropics. The main problem with *Bos taurus* cattle in the tropics is the very low tolerance to heat stress. As compared to *Bos taurus*, *Bos indicus* (Zebu) breeds experience a less severe reduction in feed intake, growth rate, milk yield and reproductive function in response to heat stress (Adeyemo *et al.* 1979; Bennett *et al.* 1985; Pegorer *et al.* 2007).

Although *Bos taurus* breeds are more precocious, Zebu cattle are extensively used in the tropics, especially in Brazil, due to their thermo tolerance and resistance to parasites. In fact, Brazil alone has nearly 200 million cattle of which 80% are Zebu or crossbred Zebu animals. The extensive systems of management which predominate in South America have continually exposed these cattle to a tropical climate and nutritional environment resulting in increased tolerance to that environment through selection pressure. This environmental tolerance means that Zebu cattle can thrive where *Bos taurus* cattle may not.

To overcome or minimize problems related to decreased production of purebred *Bos taurus* cattle in tropical regions, one strategy has been to produce *Bos taurus* X *Bos indicus* crossbreds. Zebu cattle are known to be less fertile and have lower levels of milk production than *Bos taurus* breeds, but are better adapted to the environmental conditions which makes them more likely to reproduce successfully in the tropics. Crossbreds incorporate the environmental adaptation of Zebu cattle and the higher production of *Bos taurus* cattle (Negussie *et al.* 1999) as well as the benefit of hybrid vigor.

Because most of the reproductive physiology studies in cattle have been performed with *Bos taurus* breeds in countries with a temperate climate, strategies for reproductive management that have been used in Zebu cattle were adapted from those studies and may not be ideal for *Bos indicus*. Therefore, the increase in knowledge of the physiological differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* breeds has been useful to develop specific protocols or strategies for reproductive management to maximize production in different breeds of cattle raised in a tropical environment.

Similarities and differences in reproductive physiology of *Bos taurus* and *Bos indicus* cows and heifers

Puberty

Puberty is defined by the animal's ability to reproduce as a result of the development of hypothalamic neurons that secrete GnRH at the appropriate frequency and in sufficient quantities to release gonadotropins and promote gametogenesis. Although the first ovulatory estrus is the main marker of puberty (Rawlings *et al.* 2003), heifers usually only reach maximum fertility on their third estrus (Byerley *et al.* 1987). Increased LH pulse frequency in the circulation, which is the determining factor for sexual maturity of heifers, is due to decreased hypothalamic sensitivity to the negative feedback of estradiol (Day *et al.* 1987) which is influenced by genetic and environmental factors (Martin *et al.* 1992; Nogueira 2004).

Most heifers reared in the tropics are subjected to low quality forages and suffer from protein, energy and/or mineral deficiencies. Therefore, most of these animals cannot reach puberty until 2 years of age, while those in a temperate climate reach puberty around 9 to 12 months of age (Fajersson *et al.* 1991). According to Nogueira (2004), independent of nutrition, there also seems to be a genetic factor associated with puberty in Zebu cattle, since 30% of Nelore heifers (12 of 37) became pregnant at 16 months of age but there was no difference in age or weight from the group mean at first ovulation.

There are also clear differences in age at puberty between *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. Generally, Zebu heifers reach sexual maturity and puberty later than *Bos taurus* heifers. This was demonstrated in the study by Rodrigues *et al.* (2002), where the cessation of inhibition of LH pulses by estradiol occurred simultaneously with the onset of puberty in heifers of both genotypes, but it happened earlier in *Bos taurus* heifers, especially during the initial period of weight gain (16 to 18 months of age). The estimated age at puberty for Zebu in the tropics

and subtropics is between 16 and 40 months, with a mean of 25 months, i.e., 6 to 12 months later than *Bos taurus* (Abeygunawardena & Dematawewa 2004; Nogueira 2004). Moreover, smaller breeds, such as the Zebu breeds, normally reach puberty at an older age and heavier body weight than *Bos taurus* heifers (Martin *et al.* 1992; Bagley 1993). Finally, regardless of size and nutrition level, Zebu cattle are less precocious in regards to puberty because the selection pressure for puberty has been much less intensive than in *Bos taurus* cattle (Eler *et al.* 2002), even though there is a high correlation between scrotal circumference in *Bos indicus* bulls and younger age of puberty in their daughters (Forni & Albuquerque 2005; Eler *et al.* 2006). Moreover, age at first conception was highly heritable ($h^2 = 0.44$ to 0.67 ; Pereira *et al.* 2007) as was heifer pregnancy ($h^2 = 0.58$ to 0.66 ; Eler *et al.* 2006; Pereira *et al.* 2007). There was also a high genetic correlation between age at first calving and interval from the onset of breeding season to calving in the subsequent year (Forni & Albuquerque 2005). Therefore, the potential to improve age of puberty and shorten postpartum anestrus interval through selection in *Bos indicus* cattle does exist.

Estrous cycle and follicular dynamics

During the estrous cycles of heifers and cows, there is growth and regression of follicles in a wave-like pattern (Pierson & Ginther 1984; Savio *et al.* 1988). Studies in *Bos taurus* cattle have described the occurrence of two to four follicular waves during the estrous cycle, with a predominance of two waves, and very rarely four waves (Sirois & Fortune 1988; Townson *et al.* 2002; Sartori *et al.* 2004). In a study with *Bos indicus* cattle in Brazil, Figueiredo *et al.* (1997) observed two- and three-wave cycles in Nelore cattle, with the majority of cows having two (83.3%) and heifers having three (64.7%) follicular waves. Other studies in Nelore heifers (Mollo *et al.* 2007), Gir cows (Gambini *et al.* 1998, Viana *et al.* 2000), and Brahman cows (Zeitoun *et al.* 1996) have detected a predominance of three waves, but also observed animals with two, four, and even a few with five waves during a cycle.

Although, several studies evaluated estrous cycle patterns in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle, very few have directly and simultaneously compared these genetic groups under the same environmental and management conditions. An experiment performed in Florida compared multiparous lactating Angus (temperate *Bos taurus*; $n = 12$), Brahman (tropical *Bos indicus*; $n = 12$), and Senepol (tropical *Bos taurus*; $n = 12$) cows throughout an estrous cycle during the summer (Alvarez *et al.* 2000). In this study, the majority of Angus and Brahman cows had two follicular waves during the estrous cycle (72.7% and 55.6%, respectively) and 70% of the cycles of Senepol cows had three waves.

A study in our laboratory compared estrous cycle patterns between *Bos indicus* and *Bos taurus* cows (Bastos *et al.* 2010). From January to April 2010, 5 to 10 year old multiparous nonlactating cows ($n = 12$ Nelore and 12 Holstein cows) were managed in individual stalls and fed a total mixed maintenance ration (TMR) according to the NRC (2000). The TMR consisted of 42.8% sugar cane bagasse, 45.7% corn, 5.7% molasses, 3.2% soybean hulls, 1.2% urea, and 1.4% mineral salt. Nelore and Holstein cows had a BCS (scale from 1 to 5) of 3.1 ± 0.1 and 2.8 ± 0.2 , and a body weight of 508 ± 17 and 575 ± 20 kg, respectively. After a 14 to 21-d period of adaptation, estrus was synchronized and cows were monitored daily by ovarian ultrasonography throughout an entire estrous cycle. Moreover, during the first follicular wave, ultrasound scanning was performed twice a day. Daily blood samples from the jugular vein were also collected for hormone assays during the entire period of study, except in two occasions in which blood was collected immediately before and 4 hours after feeding during the follicular and luteal phases. In this study, 80% of Nelore cows and 60% of Holstein cows

presented three waves of follicular development during the estrous cycle. All the remaining cows had two waves. Moreover, average estrous cycle length was 23 d (range of 21 to 26 d) and was similar between Nelore and Holstein cows ($P > 0.05$).

From other data, the average interestrus interval was 21 d, for both *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle (discussed by Bó *et al.* 2003 and Sartori *et al.* 2004), and two-wave cycles were shorter than three-wave cycles (Savio *et al.* 1988, 1990; Sirois & Fortune 1988; Alvarez *et al.* 2000; Townson *et al.* 2002; Sartori *et al.* 2004). There were, however, exceptions, in which high-producing lactating Holstein cows tended to have a longer estrous cycle (23 d), due to a prolonged time between luteolysis and ovulation (discussed by Sartori *et al.* 2004).

Although there are similarities in estrous cycle length and follicular wave patterns between *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle, differences in antral follicle population between genetic groups are well documented and are illustrated in Figure 1. At the onset of each follicular wave, approximately 24 small (2 to 5 mm) viable antral follicles were detected in *Bos taurus* cattle (Ginther *et al.* 1996), however, in *Bos indicus* cattle, there were greater numbers of small follicles during wave emergence. Buratini Jr. *et al.* (2000) described the occurrence of approximately 50 small follicles in the ovaries of Nelore heifers. High numbers of small follicles were also observed in the ovaries of Sindhi (*Bos indicus*) heifers (49.0 ± 6.4 , $n = 14$) and lactating cows (64.0 ± 5.1 , $n = 34$; MCC Mattos, unpublished observations). By directly comparing number of small follicles (3 to 5 mm) in the ovaries between *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle, Alvarez *et al.* (2000) observed a greater number of follicles at wave emergence in Brahman (39 ± 4) compared to Senepol (33 ± 4), or Angus (21 ± 4) multiparous lactating cows. Recent studies performed with both genetic groups in contemporary environmental and nutritional conditions showed that *Bos indicus* had a greater number of follicles at wave emergence compared to *Bos taurus* cattle (Carvalho *et al.* 2008; Gimenes *et al.* 2009). Carvalho *et al.* (2008) synchronized ovulation in Nelore and Angus heifers and Gir and Holstein heifers, using a progesterone intravaginal device and 2 mg of estradiol benzoate with or without PGF 2α at the beginning of the treatment. There was no interaction of breed, therefore, genetic group was combined. In this trial, *Bos indicus* cattle recruited 33.4 ± 3.2 follicles, while *Bos taurus* heifers recruited 25.4 ± 2.5 follicles ($P = 0.09$). Gimenes *et al.* (2009), synchronized Nelore and Holstein heifers using a norgestomet auricular implant and 2 mg of estradiol benzoate with or without a 50 mg injection of progesterone. Nelore heifers had 29.7 ± 3.1 follicles at wave emergence; whereas, Holstein heifers had 15.0 ± 2.8 follicles ($P < 0.01$). Similarly, Bastos *et al.* (2010) detected significant differences in number of antral follicles between Nelore and Holstein cows. At wave emergence, the number of 2 to 5 mm follicles present on the ovaries was 42.7 ± 5.9 for Nelore (range of 25 to 100) and 19.7 ± 3.2 for Holstein (range of 5 to 40) cows ($P < 0.05$). There was little variation in number of small follicles throughout the entire estrous cycle in both breeds as reported by Alvarez *et al.* (2000) and Buratini Jr. *et al.* (2000). Significant differences in ovarian follicle population between *Bos indicus* and *Bos taurus* breeds may be associated with higher circulating concentrations of insulin and IGF-I in *Bos indicus* cattle, as described by Alvarez *et al.* (2000) and Bastos *et al.* (2010).

Follicular deviation and selection of the dominant follicle

After follicular wave emergence in cattle, there is a mechanism of selection in which only one follicle becomes dominant, inhibiting the growth of other follicles on the ovary (subordinate follicles; Ginther *et al.* 1996). Follicular deviation has been used to refer to the time at which differences in the growth rate between the future dominant and the future subordinate follicles become apparent (Ginther *et al.* 1996). In *Bos taurus* breeds, such as Holstein, follicular devia-

tion occurs when the largest developing follicle reaches 8.5 to 9.0 mm in diameter (Ginther *et al.* 1996; Sartori *et al.* 2001), whereas, in Zebu cattle, such as Nelore, deviation occurs when the largest growing follicle reaches 5 to 7 mm (Castilho *et al.* 2007; Figueiredo *et al.* 1997; Sartorelli *et al.* 2005; Ereno 2008; Gimenes *et al.* 2008). There are exceptions, however, in both genetic groups of animals. When comparing high-producing lactating Holstein cows to nulliparous Holstein heifers, Sartori *et al.* (2004) observed that deviation occurred when the largest growing follicle reached 9.8 mm and 8.3 mm in lactating cows and heifers, respectively ($P < 0.05$). Likewise, Bastos *et al.* (2010) detected that follicular deviation occurred when the largest developing follicle reached 7.0 ± 0.2 and 8.9 ± 0.4 mm in nonlactating Nelore and Holstein cows, respectively ($P < 0.05$).

Although follicle size at deviation differs substantially between breeds, the time of deviation during the first follicular wave in *Bos indicus* relative to the preceding ovulation (2.3 to 2.8 d; Sartorelli *et al.* 2005; Ereno 2008; Gimenes *et al.* 2008) was similar to that reported in *Bos taurus* cattle (Ginther *et al.* 1996; Sartori *et al.* 2001). In fact, when comparing Nelore to Holstein cows, Bastos *et al.* (2010) observed that deviation occurred, on average, 2.3 d after ovulation, independent of breed.

The mechanisms that control selection of the dominant follicle are complex and not fully understood. Ovarian theca cells express LH receptors (LHR) from preantral to preovulatory sizes (Xu *et al.* 1995). Although it is clear that LHR expression occurs in granulosa cells of dominant follicles (Xu *et al.* 1995; Bao *et al.* 1997), there is some controversy about the time when these cells start to express functional LHR and whether it is required to support dominant follicle growth at the time of deviation when FSH levels are declining or low. LHR mRNA abundance measured by real-time PCR was higher in granulosa cells from the largest follicle of the wave compared with the second largest follicle before morphological deviation, suggesting that acquisition of LH responsiveness by granulosa cells is part of the deviation process (Beg *et al.* 2001). Other studies utilizing *in situ* hybridization, failed to detect LHR mRNA in granulosa cells around deviation (Evans & Fortune 1997; Fortune *et al.* 2001; Garverick *et al.* 2002), which is in agreement with previous reports showing binding of LH to granulosa cells of only selected dominant follicles (Ireland & Roche 1982; Webb & England 1982).

The LHR gene in sheep and cattle follicles is subject to alternative splicing, and variants with deletion of exon 10 and/or partial deletion of exon 11 were reported (Bacich *et al.* 1994; Abdennebi *et al.* 2002; Robert *et al.* 2003). Although functional properties of LHR splice variants have not been fully elucidated, the variant with a partial deletion of exon 11 has been shown to be translated into a protein that is not translocated to the cell membrane (Bacich *et al.* 1999; Kawate 2004), and deletion of exon 10 resulted in impaired activation by LH in comparison with hCG in humans (Gromoll *et al.* 2000; Muller *et al.* 2003). Therefore, PCR strategies amplifying exon fragments present in all transcripts should permit quantification of LH receptor expression without identifying each of the variant forms. In a recent study assessing expression of LHR alternative transcripts by PCR in granulosa cells from crossbred Nelore cows, all isoforms were only detected in follicles at 7 mm in diameter or larger, and mRNA abundance increased with follicle size (Nogueira *et al.* 2007a). In Nelore cattle, follicle deviation occurs when the dominant follicle reaches 5 to 7 mm in diameter; therefore, these results suggest that expression of functional LHR only occurs in granulosa cells after deviation. In a follow up study using the same PCR strategy, Barros *et al.* (2009) assessed LHR expression in granulosa cells from the two largest follicles in the ovary of Nelore heifers taken before (Day 2 of the wave), during (Day 2.5), and after (Day 3) the expected time of follicular deviation. LHR mRNA expression was detected only in two out of seven largest follicles obtained on Day 2.5 (both in 7 mm follicles), but not on Day 2. Moreover, the majority of the largest follicles

obtained on Day 3 expressed LHR (64% positive follicles from 8 to 14 mm). Therefore, data obtained in Nelore cattle suggest that expression of functional LHR occurs after follicular deviation and is a consequence, rather a means of selection (Part of the review above was presented at the Annual Meeting of the IETS/2010 by Barros *et al.* 2010).

Acquisition of ovulatory capacity

Although follicle deviation occurs in *Bos indicus* when the dominant follicle reaches 5 to 7 mm in diameter (Figueiredo *et al.* 1997; Sartorelli *et al.* 2005; Castilho *et al.* 2007; Gimenes *et al.* 2008; Bastos *et al.* 2010) compared to 8 to 9 mm in *Bos taurus* (Ginther *et al.* 1996; Sartori *et al.* 2001; Bastos *et al.* 2010), it is possible that additional growth is necessary for the dominant follicle to acquire ovulatory capacity in both breeds.

Sartori *et al.* (2001) observed that Holstein cows with follicles 7 or 8.5 mm in diameter did not ovulate, even after administration of high doses of pLH (40 mg). However, 80% of the cows with follicles ≥ 10 mm ovulated after pLH administration. Conversely, Gimenes *et al.* (2008) reported that administration of 25 mg pLH in *Bos indicus* heifers induced ovulation in 33.3, 80.0 and 90.0% of animals with follicles that were 7.0 to 8.4, 8.5 to 10 and > 10 mm in diameter, respectively. These results were not unexpected, and corroborate the data showing differences in size of the growing follicle at follicular deviation between *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle.

This relationship between follicular diameter, acquisition of ovulatory capacity and gene expression of LHR isoforms, was recently investigated (Simões, 2009). In the first experiment, the minimum pLH dose (Lutropin-V, Bioniche Animal Health Inc, Belleville, ON, Canada) necessary to induce ovulation in Nelore cows that had a first wave dominant follicle of 10 to 11 mm in diameter was found to be 3.125 mg. In the second experiment, 6.25 mg of pLH was utilized to induce ovulation of first wave dominant follicles of 7 to 8.0, 8.1 to 9.0 and 9.1 to 10 mm in diameter. In a third experiment, theca and granulosa cells, obtained from abattoir-derived ovarian follicles, were separated for total RNA extraction, and gene expression of LHR isoforms was measured by semiquantitative RT-PCR using GAPDH as the internal control. Simões (2009) observed that with the increase in follicle diameter (7.0 to 8.0, 8.1 to 9.0 and 9.1 to 10.0 mm) in Nelore or crossbred Nelore females, there was a corresponding increase in ovulation rates (9.0, 36.0 and 90.0%, respectively) and expression of LHR isoforms in granulosa cells (16.5, 21.0 and 37.6; mRNA LHR/mRNA GAPDH), but not in theca cells. It was concluded that in Zebu cattle ovulatory capacity is related to an increase in follicle diameter and expression of LH receptors in granulosa cells.

Maximum size of dominant/ovulatory follicle and CL and circulating hormones

Ginther *et al.* (1989), working with Holstein females, observed that heifers with two follicular waves had dominant follicles with maximum diameters of 17.1 and 16.5 mm for the first and second wave, respectively. In contrast, in *Bos indicus* females, the diameters reported were 11.3 and 12.3 mm, respectively (Figueiredo *et al.* 1997; Sartorelli *et al.* 2005; Figure 1). Similarly, in Zebu cattle, the size of the CL ranged from 17 to 21 mm in diameter (Segerson *et al.* 1984, Rhodes *et al.* 1995, Figueiredo *et al.* 1997); whereas, in *Bos taurus* cattle diameters of 20 to 30 mm were detected (Ginther *et al.* 1989). Although there seem to be clear differences in size of ovarian structures between *Bos taurus* and *Bos indicus*, follicle size, and consequently CL size may be determined by factors other than breed.

Studies have reported that dairy cows develop larger ovulatory follicles, but have lower serum estradiol concentrations than heifers (Sartori *et al.* 2004; Wolfenson *et al.* 2004) or dry cows (De La Sota *et al.* 1993), suggesting an increased steroid metabolism in dairy cows, as reported by Sangsritavong *et al.* 2002). In relation to serum concentration of estradiol, there are few data comparing *Bos indicus* to *Bos taurus*. In the study by Alvarez *et al.* (2000), there were no differences in maximum circulating estradiol among Brahman, Angus, and Senepol cows (8.9 ± 1.6 , 9.1 ± 1.4 , and 8.7 ± 1.4 pg/mL, respectively). This seems to be the only study in which the maximum diameter of the ovulatory follicle was greater in *Bos indicus* (15.6 ± 0.5 mm) than in *Bos taurus* cattle (12.8 ± 0.4 and 13.6 ± 0.4 mm for Angus and Senepol, respectively). Conversely, Segerson *et al.* (1984) compared Angus to Brahman cattle and observed higher serum concentrations of estradiol-17 β and progesterone in *Bos taurus* cows.

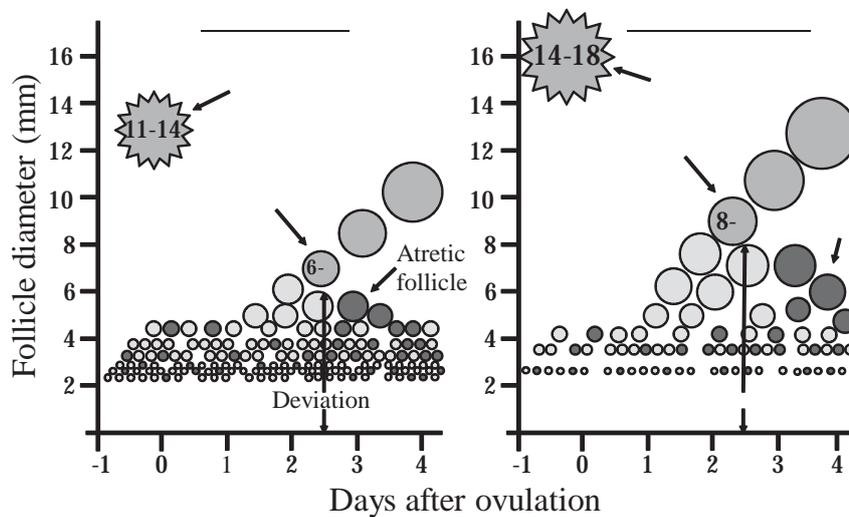


Fig. 1. Schematic representation of follicle development in Nelore (*Bos indicus*) and Holstein (*Bos taurus*) cows based on data from the literature and personal data. *Bos indicus* (Nelore) have a greater population of small (2 to 5 mm) follicles in the ovaries throughout the entire estrous cycle than *Bos taurus* (Holstein) cattle. Moreover, although both breeds present follicle deviation between Day 2 and 3 after ovulation, the diameter of the future dominant follicle at deviation is greater in Holstein cattle. The diameter of the ovulatory follicle is also greater in Holsteins than in Nelore cows.

According to Randel (1976) *Bos indicus* and *Bos indicus* crossbred females had lower progesterone concentration per gram of luteal tissue than in *Bos taurus* females. However, Segerson *et al.* (1984) did not detect differences in progesterone concentration in the CL between Brahman and Angus cows (75.8 ± 11.3 and 65.9 ± 5.3 $\mu\text{g/g}$ of CL, respectively; $P > 0.10$). Conversely, studies performed in Brazil detected higher circulating progesterone in *Bos indicus* (Nelore or Gir) compared to *Bos taurus* (Angus or Holstein) cattle. Carvalho *et al.* (2008) compared *Bos indicus* (Nelore and Gir), *Bos taurus* (Angus and Holstein) and crossbreds (Angus x Nelore and Gir x Holstein) throughout the period of an estrus synchronization protocol. Two PGF 2α treatments, 12 days apart were performed 24 and 12 days before treatment with an intravaginal source of progesterone was initiated. On Day 0, each heifer received a progesterone intravaginal device plus estradiol benzoate. During that period (with a progesterone device), serum progesterone concentrations were higher in *Bos indicus* heifers. Similarly, Bastos *et al.*

(2010) reported that although the maximum diameter of the ovulatory follicle (15.7 ± 0.3 mm vs 13.4 ± 0.3 mm; Figure 1) and the maximum CL volume (7610.5 ± 512.0 mm³ vs 4916.6 ± 548.1 mm³) were greater in Holsteins, plasma peak estradiol (7.70 ± 0.67 vs 12.71 ± 0.98 pg/mL) and progesterone (4.06 ± 0.18 vs 4.64 ± 0.40 ng/mL) concentrations were higher in Nelore cows. This suggests that *Bos indicus* females may be slower to metabolize estradiol and progesterone.

Estrous behavior

Behavioral signs of estrus can be observed in cattle and used for estrus detection for the purposes of artificial insemination (AI). However, these characteristics are influenced by age, milk yield, environment and hierarchy (revised in Landaeta-Hernández *et al.* 2004). Additionally, differences can be noted among breeds (Rae *et al.* 1999), and even among genetic groups (*Bos indicus* vs *Bos taurus*).

Mizuta (2003) compared the reproductive behavior of Nelore cows with Angus cows using radiotelemetry (Heat-Watch). Nelore cows exhibited a shorter estrus compared to Angus cows (12.9 ± 2.9 vs 16.3 ± 4.8 hours, respectively). Additionally, more than 50% of Nelore cows showed estrus during the evening and night (between 6:00 PM and 6:00 AM; Pinheiro *et al.* 1998; Membrive 2000), and about 30% exhibited estrus only during darkness (Pinheiro *et al.* 1998). These factors decrease the efficacy of estrous detection for traditional AI. However, short estrus duration has been observed in high-producing Holstein cows. In a recent study evaluating the association between levels of milk production and estrous behavior, Lopez *et al.* (2004) observed a shorter duration (6.2 versus 10.9 hours) and intensity (6.3 versus 8.8 mounts) of estrus in cows with higher (> 39.5 kg/d) compared to lower (< 39.5 kg/d) milk production. These differences within the same breed may be related to lower circulating concentrations of estradiol in higher vs lower milk producing cows (Lopez *et al.* 2004) as well as in lactating cows compared to heifers (Sartori *et al.* 2002, 2004). Based on such results, Wiltbank *et al.* (2006) hypothesized that high producing cows (above 40 kg of milk/d) have low circulating estradiol due to a high metabolism of this steroid. The effect of higher metabolism on estrus behavior was also observed in beef cattle. Nelore heifers submitted to high dietary intake exhibited less intense and shorter duration of estrus as compared with Nelore heifers receiving low dietary intake (Mollo *et al.* 2007).

Although there are differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* in duration and intensity of estrus, other factors such as feed intake, body size, and steroid metabolism may exert profound effects over this behavior.

Tolerance to heat stress

Heat stress is a particularly severe problem in cattle reproduction because of reduction in estrus expression, lower fertilization rates, increased embryonic loss and, consequently, lower fertility. Over 50% of the bovine population is located in the tropics and it is estimated that heat stress causes severe economic loss in approximately 60% of dairy farms around the world (Wolfenson *et al.* 2000). The magnitude of this effect on reproduction in dairy cattle is increasing, as augmented milk yield enhances susceptibility of cows to the deleterious effects of heat stress (Al-Katanani *et al.* 1999; Sartori *et al.* 2002; Lopez-Gatius 2003).

Bos indicus breeds experience a less severe reduction in reproductive function in response to heat stress than *Bos taurus* breeds (Adeyemo *et al.* 1979; Bennett *et al.* 1985; Rocha *et al.* 1998; Barros *et al.* 2006). Most of this adaptation to elevated temperature is due to superior

ability of thermo-tolerant breeds to regulate body temperature (Adeyemo *et al.* 1979; Gaughan *et al.* 1999) as well as intrinsic cellular resistance to elevated temperature (Malayer & Hansen 1990; Sartorelli *et al.* 2006). High environmental temperature and humidity resulted in a marked decline in oocyte quality from Holstein and crossbred Angus cows (Rocha *et al.* 1998). In contrast, a high percentage of oocytes retrieved from Brahman cows exhibited normal morphology and yielded a high proportion of blastocysts, regardless of season (Rocha *et al.* 1998). Although *Bos indicus* cattle are more resistant to heat stress than *Bos taurus* cattle, exposure of Gir cows to a 28-d period of heat stress exerted a delayed effect on reproductive function, manifested by an increased incidence of large follicles, more follicular codominance, and reductions in estrous cycle length, progesterone concentrations, and oocyte developmental capacity (Torres-Junior *et al.* 2008).

Infertility in the male caused by heat stress can be eliminated through the use of AI with semen collected and frozen from males in cool environments. In females, transfer of in vivo or in vitro produced (IVP) embryos have been utilized as an attempt to bypass effects of heat stress (Hammond *et al.* 1996; Al-Katanani *et al.* 2002; Sartori *et al.* 2006). For example, a retrospective study was performed in high-producing Holstein cows (average milk production 28.4 ± 2.3 kg/d) submitted to ET ($n = 2112$) or AI ($n = 7501$) during the period of 2000 to 2003 (Rodrigues *et al.* 2004). Estrus was detected in cows, which were subjected to AI 12 hours later or ET 7 d later. Pregnancy rates were higher in those receiving embryos than those undergoing AI during the summer months, but no differences were observed during the cooler months.

Using *Bos indicus* genotype embryos during summer months can also improve fertility. In vitro studies have shown that *Bos indicus* embryos submitted to heat shock at early stages of development are better able to survive as compared to *Bos taurus* embryos (Malayer *et al.* 1990; Kamwanja *et al.* 1994; Barros *et al.* 2006; Sartorelli *et al.* 2006). More recently, effects of heat stress on embryonic development in culture were evaluated in Nelore and crossbred (*Bos indicus* X *Bos taurus*) oocytes fertilized with Nelore or Angus (*Bos taurus*) spermatozoa. The decrease in blastocyst development rates caused by exposure to 41°C during 12 hours was more evident when the heat shock was applied at earlier stages of development, particularly for embryos that had a predominant *Bos taurus* genotype (Erberhardt *et al.* 2009). In the study reported by Sartorelli *et al.* (2006), embryos from Angus or Nelore cows produced using oocytes obtained by ovum pickup (OPU) procedures were exposed to a culture temperature of 41°C for 12 hours beginning 96 hours after fertilization. Thereafter, embryos were transferred at the blastocyst stage to crossbred recipient heifers. Pregnancy rates after transfer were: 29.4% (15/51) for non-stressed Nelore embryos, 29.0% (11/38) for stressed Nelore embryos, 21.4% (6/28) for non-stressed Angus embryos and 7.1% (1/14) for stressed Angus embryos. These results and previous reports (Malayer *et al.* 1990; Erberhardt *et al.* 2009) clearly indicate that Nelore embryos are better able to survive during heat stress at early stages of development and more capable of establishing pregnancies following heat stress than Angus embryos.

Although heat stress induces a deleterious effect on *Bos taurus* oocytes and embryos, this sensitivity differs between categories, i.e. heifers (H), high-producing cows in peak lactation (PL) and repeat-breeders (RB; Ferreira *et al.* 2010). In this study, previously cited categories of Holstein cattle were evaluated during summer heat stress. At OPU, heifers had greater number of follicles than PL cows ($H = 18.5 \pm 1.9^a$, $PL = 12.4 \pm 1.1^b$, $RB = 17.2 \pm 2.0^{ab}$, $P = 0.04$). Heifers also had greater number of total oocytes ($H = 9.6 \pm 1.6^a$, $PL = 5.0 \pm 0.9^b$, $RB = 8.8 \pm 1.3^{ab}$, $P = 0.03$) and viable oocytes ($H = 7.6 \pm 1.5^a$, $PL = 3.6 \pm 0.8^b$, $RB = 6.8 \pm 1.2^{ab}$, $P = 0.05$) recovered at OPU than PL cows. During IVP, embryos from heifers performed better than PL and RB embryos (cleavage at Day 3: $H = 47.8\%^a$, $PL = 31.1\%^b$, $RB = 35.4\%^b$, $P = 0.008$; blastocyst at Day 7: $H = 21.0\%^a$, $PL = 4.1\%^b$, $RB = 3.8\%^b$, $P < 0.0001$; and grade I embryos: $H = 1.3 \pm 0.4^a$, $PL = 0.3 \pm 0.2^b$, $RB = 0.5 \pm 0.2^b$, $P = 0.04$). The differences

observed among heifers and cows are probably related to their metabolism under heat stress, comprising oocyte number and quality. Also, although RB had similar results at OPU (number of oocytes) as heifers, they probably had compromised oocytes, because their *in vitro* production or performance was poorer.

Reproductive management

Use of Bos indicus genotype

The utilization of thermo tolerant breeds has been employed by the beef industry in countries with a hot climate. However, the short duration of estrus in Zebu cattle is one of the major factors that limit the widespread use of AI in these breeds. This problem can be overcome with the use of fixed-time artificial insemination (FTAI) protocols, developed or adapted specifically for these cattle. Additionally, *in vivo* and *in vitro* embryo production has been increasing in tropical countries like Brazil, particularly in the Nelore breed (Viana & Camargo 2007).

Fixed-time artificial insemination (FTAI)

Although AI is a good alternative to introduce *Bos taurus* genetics into a *Bos indicus* herd, its traditional use limits the widespread application and success of this breeding technology. Factors already mentioned, such as short duration of estrus and estrus expression during the night reduce the estrus detection rate and consequently decrease pregnancy success. Postpartum cyclicity is influenced primarily by suckling and poor nutrition which are difficult to overcome in *Bos indicus* cattle. Suckling results in inhibition of GnRH/LH pulse frequency and reduces follicular development (reviewed by Willians *et al.* 1996). Poor nutrition delays the development of large ovarian follicles in postpartum cows reducing the maximum diameter and persistence of dominant follicles (reviewed by Bó *et al.* 2003).

For these reasons, FTAI has become a tool for increasing the efficiency of AI, since it eliminates the need for estrus detection. Estradiol and progestogen/progesterone treatments have been used increasingly over the past years in estrus synchronization programs in cattle (Macmillan & Peterson 1993; Macmillan & Burke 1996). This association promotes regression of antral follicles and the emergence of a new follicular wave, on average, 4 d after the beginning of the protocol, depending on the estradiol source utilized (reviewed in Bó *et al.* 2003). However, the successful application of AI in *Bos indicus* cattle, not only has to overcome the problem of estrus detection but also the problem of nutritionally and suckling-induced anestrus. One alternative to increase pregnancy rates in FTAI programs in anestrus *Bos indicus* cattle may be the addition of 300 to 500 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG) at the time of removal of the progesterone releasing devices (Macmillan & Peterson 1993; Macmillan & Burke 1996; Baruselli *et al.*, 2004).

Other differences between *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle emphasize the need for different strategies to manipulate the estrous cycle. Carvalho *et al.* (2008) observed that *Bos indicus* heifers can maintain higher circulating progesterone concentrations than *Bos taurus* or cross-bred heifers. Therefore, these authors hypothesized that *Bos indicus* heifers are more sensitive to high concentrations of circulating progesterone, which may have a suppressive effect on LH pulsatility and, consequently, reduce follicular growth during a synchronization protocol. In this study, the administration of PGF2 α at the beginning of a synchronization protocol in the *Bos indicus* protocol decreased circulating progesterone concentrations during treatment and increased follicular growth rate, dominant follicle diameter and ovulation rate. Another alternative is the use of norgestomet implants in *Bos indicus* heifers instead of progesterone

devices, because of a reduced suppressive effect of norgestomet on LH pulsatility (Kojima *et al.* 1992). In a previous study of follicular dynamics using cyclic Nelore heifers treated with a norgestomet ear implant or progesterone-releasing intravaginal device (CIDR), follicular growth, maximum diameter of the dominant follicle, and ovulation rate were greater in norgestomet-treated heifers (Sá Filho *et al.* 2005).

Treatments to induce multiple ovulations

Barros & Nogueira (2001) examined the efficacy of different superstimulatory protocols in which the expected time of ovulation was postponed by 6 to 12 hours and ovulation was induced by administration of LH or GnRH (Barros & Nogueira 2001; Nogueira *et al.* 2002). Although these protocols did not significantly increase the quantity of viable embryos compared to estrus detection protocols, it was possible to control the time of ovulation with hormonal treatments, allowing the use of FTAI. From these experiments, a new protocol was developed called the P-36 protocol (Barros & Nogueira 2005). The protocol included insertion of a CIDR for 36 hours after PGF2 α administration and induction of ovulation with exogenous LH, administered 12 hours after CIDR removal (48 hours after PGF2 α administration). FTAI was performed 12 and 24 hours later since ovulation occurs between 24 and 36 hours after LH administration (Nogueira & Barros, 2003). The effectiveness of the P-36 protocol has been confirmed (Barros & Nogueira 2001, 2005; Baruselli *et al.* 2006), and more recently, an average of 13.3 ± 0.75 total structures and 9.4 ± 0.63 viable embryos, with a viability rate of 71.0% (1279/1807) following 136 embryo collections in Nelore cows has been reported (Nogueira *et al.* 2007b). These results were comparable to those reported in studies in which Nelore cows were inseminated 12 and 24 hours after onset of behavioral estrus (Nogueira *et al.* 2002; Nogueira & Barros 2003).

A variation of the P-36 protocol in which the progesterone device is removed 24 hours after PGF2 α (protocol P-24) and LH is administered 24 hours later (48 hours after PGF2 α), has been utilized in Nelore females, apparently with comparable results to those obtained with P-36 protocol (Zanenga *et al.* 2003; Baruselli *et al.* 2006).

The use of the P-36 protocol in *Bos taurus* breeds has resulted in a decrease in the number of viable embryos in comparison with conventional protocols with estrus detection. In Holstein (Martins *et al.* 2005; Rodrigues *et al.* 2005; Baruselli *et al.* 2006) and Angus donors (Bó *et al.* 2006; Chesta *et al.* 2007), viable embryo production was increased with the P-36 protocol when the ovulation induction treatment (LH or GnRH) was administered at 60 hours (P-36/LH60), rather than 48 hours (P-36/LH48) after PGF2 α administration. Similarly, the results obtained by Barcelos *et al.* (2006), in Bonsmara donors (5/8 Afrikaner and 3/8 Hereford/Shorthorn) indicated that the P-36/LH60 protocol was more efficacious.

On the other hand, even though delaying ovulation for 12 hours in the P-36 protocol in *Bos taurus* breeds (P-36/LH60 protocol) had positive effects on embryo production, the opposite occurred when used in *Bos indicus* breeds. The P-36/LH60 protocol caused a decrease in embryo production when compared to P-36/LH48 protocol (Baruselli *et al.* 2006). Therefore, it can be inferred that ovulation in superstimulation protocols must be induced earlier in *Bos indicus* donors; whereas, in *Bos taurus* donors, it seems necessary to delay treatment with an ovulation inducer, thereby allowing an increase in follicle size, and acquisition of LH receptors.

Bos indicus breeds have a reduced capacity for LH secretion and a greater sensitivity to exogenous gonadotropins than *Bos taurus* cattle (Randel 1984). Superovulatory response was evaluated in Nelore cows submitted to three different doses of Folltropin-V (100, 133 or 200 mg) in a crossover design. There were no significant differences in any of the variables evaluated, indicating that it is possible to reduce the dose of FSH to 100 mg in Nelore cows

submitted to a FTAI superstimulatory protocol, without compromising superovulatory response and embryo production (Baruselli *et al.* 2006). Others studies in Nelore heifers successfully induced superovulation and embryo production using a smaller dose of FSH (70 mg; Sartori *et al.* 2009), which is very unlikely to be effective in *Bos taurus* cattle.

In vitro embryo production

Especially due to the greater antral follicle population in *Bos indicus* cattle in relation to *Bos taurus* cattle, *in vitro* embryo production is much more successful in *Bos indicus* cattle (Viana & Camargo, 2007). In a recent study, (Pontes *et al.* 2010) Gir, Holstein and crossbreds (1/4 Holstein x 3/4 Gir or 1/2 Holstein-Gir) were compared for total and viable (good and regular quality grades according to Seneda *et al.* 2001) oocyte yield, and *in vitro* embryo production. The number of total and viable oocytes, and embryos produced were greater in Gir than in Holstein cattle (17.1 vs 11.4; 12.1 vs 8.0; 3.2 vs 2.2, respectively). Moreover, embryo production (5.5 blastocysts) was even greater in Holstein-Gir crossbreds compared to the other breeds.

A recent study was conducted comparing *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle in which Nelore and Holstein heifers were submitted to a synchronization protocol to induce the emergence of a new follicular wave. Follicles were aspirated 1, 3 or 5 d after expected wave emergence (Gimenes *et al.* 2010). There was no effect of time of OPU on the variables evaluated. However, more oocytes were recovered and more embryos were produced from Nelore than Holstein heifers, as demonstrated in Table 1.

Table 1. Effect of genetic group on oocyte recovery and quality, and developmental competence of *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers.

	GENETIC GROUP	
	Nelore (n = 9)	Holstein (n = 9)
Number of Replicates	6	6
OOCYTE RECOVERY AND QUALITY		
Visualized follicles	41.0 ± 2.1 ^a	22.1 ± 1.3 ^b
Total oocytes	37.1 ± 2.6 ^a	15.4 ± 1.2 ^b
Recovery rate (%)	82.3 ± 2.5 ^a	66.8 ± 2.8 ^b
Oocytes submitted to IVC	25.6 ± 1.8 ^a	9.1 ± 0.9 ^b
DEVELOPMENTAL COMPETENCE		
Cleaved structures	21.1 ± 1.6 ^a	5.2 ± 0.5 ^b
Cleavage rate (%)	82.6 ± 1.6 ^a	59.9 ± 3.6 ^b
Blastocysts 7 d after IVF	7.3 ± 0.9 ^a	1.1 ± 0.2 ^b
Blastocyst rate (%)	28.3 ± 2.8 ^a	14.1 ± 2.9 ^b

^{a,b}P < 0.05.

Similar results were found in another recent study (Sales *et al.*, 2010). Oocyte quality and quantity of nonlactating cattle was evaluated. In this study, 14 Gir and 14 Holstein cows were submitted to eight successive OPU sessions performed every 14 d. Gir cows had a greater number and better quality of oocytes recovered by OPU than Holstein donors (Table 2).

Ovarian superstimulation with gonadotropins has been reported to increase the number of oocytes retrieved by OPU as compared to nonstimulated *Bos taurus* cattle (Blondin *et al.*, 1997, 2002). However, this beneficial effect of superstimulation has not been confirmed in *Bos indicus* females (Seneda *et al.* 2004; Monteiro *et al.* 2009).

Evidence suggests that when *Bos taurus* cattle experience a “coasting” period (i.e. deprivation of FSH to induce follicle atresia) between hormonal stimulation and slaughterhouse ovary collection (Goodhand *et al.* 1999) and from ovary collection to oocyte aspiration (Blondin *et al.* 1997) in vitro developmental potential of cumulus-oocyte complex (COC) is effected. In both situations, follicles driven into phases of pseudodominance or early atresia provided COC with an ideal environment in which to acquire developmental competence (Blondin *et al.* 2002). A very high blastocyst rate (80%) was reported by Blondin *et al.* (2002) after superstimulating Holstein heifers with FSH and delaying COC retrieval by OPU using a coasting period of 48 hours. Additionally, LH was administered 6 hours before OPU in an attempt to render the COC more competent. Recently, the same protocol proposed by Blondin *et al.* (2002) was simultaneously compared to other protocols used for OPU and in vitro embryo production (IVP) in Nelore cattle (Monteiro *et al.* 2009). Their results indicate that ovarian superstimulation associated with deprivation of FSH and OPU did not increase in vitro embryo production in Nelore cattle. On the contrary, the highest rate of hatched blastocysts was observed in oocytes from nonstimulated cows.

Table 2. Effect of genetic group on oocyte recovery and quality of nonlactating *Bos indicus* (Gir) and *Bos taurus* (Holstein) cows.

	GENETIC GROUP	
	Gir (n = 14)	Holstein (n = 14)
Number of Replicates	8	8
Visualized follicles	25.5 ± 1.2	23.8 ± 1.1
Total oocytes	23.4 ± 1.6 ^a	14.9 ± 0.9 ^b
Recovery rate (%)	91.2 ^a (2604/2856)	61.1 ^b (1633/2673)
Oocyte quality		
Grade 1	5.3 ± 0.5 ^a	1.6 ± 0.2 ^b
Grade 2	9.8 ± 0.7 ^a	5.2 ± 0.4 ^b
Grade 3	4.8 ± 0.5	4.3 ± 0.4
Grade 4	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.2
Apoptosis by TUNEL (%)	16.6 ^b (21/117)	40.6 ^a (34/82)

^{a,b}P < 0.05.

Further experiments are necessary to understand why Nelore cattle did not respond as well as *Bos taurus* breeds to the protocol proposed by Blondin *et al.* (2002). It may be necessary to adjust FSH dosage and the “coasting” period to obtain better results in *Bos indicus* cattle. On the other hand, perhaps the fact that Nelore females usually have a larger number of follicles available for OPU precludes the use of superstimulatory protocols that might be useful for animals with lower number of follicles (*Bos taurus*).

Final considerations

Bos indicus and *Bos taurus* cattle have been mainly used for milk and beef production all over the world. Although, in general, *Bos taurus* cattle have been more intensely selected for production, a better adaptation to the tropical and sub-tropical environments makes *Bos indicus* cattle and crossbreds feasible options for production.

There are, however, significant differences in the reproductive physiology of those genetic groups, as seen in Table 3, that affect the application of adequate tools for reproductive management. For example, *Bos taurus* in general reach puberty sooner and have a shorter gestation length as compared to *Bos indicus* cattle (Paschal et al, 1991). Therefore, in order to have a 12 month calving interval, *Bos indicus* cows must conceive 10 d earlier than *Bos taurus* cattle.

Table 3. Main differences on reproductive physiology of *Bos taurus* and *Bos indicus* females.

Physiology	<i>Bos indicus</i>	References	<i>Bos taurus</i>	References
Age at puberty (months)	16 to 40	Abeygunawardena & Dematawewa (2004) Nogueira (2004)	9 to 12	Fajersson <i>et al.</i> (1991)
Duration of estrus (hours)	10.9 to 12.9	Pinheiro <i>et al.</i> (1998) Mizuta (2003)	16.3	Mizuta (2003)
Number of small follicles	30 to 60	Alvarez <i>et al.</i> (2000) Buratini Jr. <i>et al.</i> (2000) Carvalho <i>et al.</i> (2008) Gimenes <i>et al.</i> (2009) Bastos <i>et al.</i> (2010)	15 to 33	Ginther <i>et al.</i> (1996) Alvarez <i>et al.</i> (2000) Carvalho <i>et al.</i> (2008) Gimenes <i>et al.</i> (2009) Bastos <i>et al.</i> (2010)
Diameter of dominant follicle at deviation (mm)	5.4 to 7.0	Sartorelli <i>et al.</i> (2005) Castilho <i>et al.</i> (2007) Ereno <i>et al.</i> (2008) Gimenes <i>et al.</i> (2008) Bastos <i>et al.</i> (2010)	8.3 to 9.8	Ginther <i>et al.</i> (1996) Sartori <i>et al.</i> (2001) Sartori <i>et al.</i> (2004) Bastos <i>et al.</i> (2010)
Diameter of largest subordinate follicle at deviation (mm)	5.3 to 5.9	Sartorelli <i>et al.</i> (2005) Castilho <i>et al.</i> (2007) Gimenes <i>et al.</i> (2008)	7.2	Ginther <i>et al.</i> (1996)
Diameter related to acquisition of ovulatory capacity (mm)	7.0 to 8.5	Gimenes <i>et al.</i> (2008)	10.0	Sartori <i>et al.</i> (2001)
Diameter of ovulatory follicle (mm)	11.3 to 14.0	Figueiredo <i>et al.</i> (1997) Sartorelli <i>et al.</i> (2005) Mollo <i>et al.</i> (2007)	13.9 to 17.1	Ginther <i>et al.</i> (1989) Sartori <i>et al.</i> (2004)
Diameter of corpus luteum (mm)	17 to 21	Segerson <i>et al.</i> (1984) Rhodes <i>et al.</i> (1995) Figueiredo <i>et al.</i> (1997) Bastos <i>et al.</i> (2010)	20 to 30	Ginther <i>et al.</i> (1989) Kastelic <i>et al.</i> (1990) Bastos <i>et al.</i> (2010)

Differences in estrus behavior and ovarian function also make some adjustments of reproductive management necessary, such as the use of FTAI in postpartum cows. These strategies are also very useful for high milk-producing cows, due to their lower circulating estradiol. Moreover, the greater antral follicle population and sensitivity to gonadotropins in *Bos indicus* cattle, make the use of superovulation much more affordable than in *Bos taurus* cattle especially in vitro situations. Finally, greater sensitivity to the negative feedback of steroid hormones on the hypothalamus/pituitary makes a dose reduction necessary during hormone treatments in *Bos indicus* cattle.

Acknowledgements

We thank all the students, institutions and companies that have collaborated with our research groups, as well as EMBRAPA and the funding agencies FAPESP, CNPq and CAPES of Brazil.

References

- Abdennebi L, Lesport AS, Remy JJ, Grebert D, Pisselet C, Monniaux D & Salesse R 2002 Differences in splicing of mRNA encoding LH receptor in theca cells according to breeding season in ewes. *Reproduction* **123** 819-826.
- Abeygunawardena H & Dematawewa CMB 2004 Pré-pubertal and postpartum anestrus in tropical Zebu cattle. *Animal Reproduction Science* **82-83** 373-387.
- Adeyemo O, Heath E, Adadevoh BK, Steinbach J & Olaloku EA 1979 Some physiological and behavioral responses in *Bos indicus* and *Bos taurus* heifers acclimatized to the hot humid seasonal equatorial climate. *International Journal of Biometeorology* **23** 231-241.
- Al-Katanani YM, Drost M, Monson RL, Rutledge JJ, Krininger CE 3rd, Block J, Thatcher WW & Hansen PJ 2002 Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified in vitro produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. *Theriogenology* **58** 171-182.
- Al-Katanani YM, Webb DW & Hansen PL 1999 Factors affecting seasonal variation in 90 day non-return rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. *Journal of Dairy Science* **82** 2611-2615.
- Alvarez P, Spicer LJ, Chase Jr CC, Payton ME, Hamilton TD, Stewart RE, Hammond AC, Olson TA & Wetteman RP 2000 Ovarian and endocrine characteristics during the estrous cycle in Angus, Brahman and Senepol cows in a subtropical environment. *Journal of Animal Science* **78** 1291-1302.
- Bacich DJ, Earl CR, O'Keefe DS, Norman RJ & Rodgers RJ 1999 Characterization of the translated products of the alternatively spliced luteinizing hormone receptor in the ovine ovary throughout the oestrous cycle. *Molecular and Cellular Endocrinology* **147** 113-124.
- Bacich DJ, Rohan RM, Norman RJ & Rodgers RJ 1994 Characterization and relative abundance of alternatively spliced luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the ovine ovary. *Endocrinology* **135** 735-744.
- Bagley CP 1993 Nutritional management of replacement beef heifers: A Review. *Journal of Animal Science* **71** 3155-3163.
- Bao B, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Salfen BE & Youngquist RS 1997 Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biology of Reproduction* **56** 1158-1168.
- Barcelos ACZ, Satrapa RA, Nogueira MFG & Barros CM 2006 Superstimulatory protocol P-36 in Bosmara breed: use of eCG and delay on induction of ovulation with LH. *Acta Scientiae Veterinariae* **34** 513 (abstract).
- Barros CM, Ereno R, Machado MF, Buratini Jr J, Pegorer MF, Simões RAL & Satrapa R 2009 Gene expression of luteinizing hormone receptor (LHR) isoforms in granulosa cells of follicles from Nelore heifers before, during and after follicular deviation. *Reproduction Fertility and Development* **21** 245 (abstract).
- Barros CM, Ereno RL, Simões RA, Fernandes P, Buratini J & Nogueira MF 2010 Use of knowledge regarding LH receptors to improve superstimulatory treatments in cattle. *Reproduction Fertility and Development* **22** 132-137.
- Barros CM & Nogueira MFG 2001 Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* **56** 1483-1496.
- Barros CM & Nogueira MFG 2005 Superovulation in zebu cattle: protocol P-36. *Embryo Transfer Newsletter* **23** 5-9.
- Barros CM, Pegorer MF, Vasconcelos JL, Eberhardt BG & Monteiro FM 2006 Importance of sperm genotype (*indicus* versus *taurus*) for fertility and embryonic development at elevated temperatures. *Theriogenology* **65** 210-218.
- Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF & Bó GA 2004 The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Animal Reproduction Science* **82-83** 479-486.
- Baruselli PS, de Sá Filho MF, Martins CM, Nasser LF, Nogueira MFG, Barros CM & Bo GA 2006 Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* **65** 77-88.
- Bastos MR, Mattos MCC, Meschiatti MAP, Surjus RS, Guardieiro MM, Mourão GB, Pires AV, Pedrosa AM, Santos FAP & Sartori R 2010 Ovarian function and circulating hormones in nonlactating Nelore versus Holstein cows. *Acta Scientiae Veterinariae (Abstract in press)*.
- Beg MA, Bergfelt DR, Kot K, Wiltbank MC & Ginther OJ 2001 Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biology of Reproduction* **64** 432-441.
- Bennett IL, Finch VA & Holmes CR 1985 Time spent in shade and its relationship with physiological factors of thermoregulation in three breeds of cattle. *Applied Animal Behavior Science* **13** 227-236.
- Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F &

- Sirard MA 2002 Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biology of Reproduction* **66** 38-43.
- Blondin P, Guilbault LA & Sirard MA 1997 The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. *Theriogenology* **48** 803-813.
- Bó GA, Baruselli PS, Chesta PM & Martins CM 2006 The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology* **65** 89-101.
- Bó GA, Baruselli PS & Martinez MF 2003 Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science* **78** 307-326.
- Buratini Jr J, Price CA, Visintin JA & Bó GA 2000 Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology* **54** 421-431.
- Byerley DJ, Staigmiller RB, Berardinelli JG & Short RE 1987 Pregnancy rates of beef heifers bred either on puberal or third estrus. *Journal of Animal Science* **65** 645-650.
- Carvalho JB, Carvalho NA, Reis EL, Nichi M, Souza AH & Baruselli PS 2008 Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology* **69** 167-175.
- Castilho C, Garcia JM, Renesto A, Nogueira GP & Brito LF 2007 Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Animal Reproduction Science* **98** 189-196.
- Chesta P, Tribulo L, Tribulo H, Balla E, Baruselli P & Bó G 2007 Effect of time of ovulation induction by gonadotropin-releasing hormone or pituitary luteinizing hormone on ova/embryo production in superstimulated beef cows inseminated at a fixed time. *Reproduction Fertility and Development* **19** 307 (abstract).
- Day ML, Imakawa K, Wolfe PL, Kittok RJ & Kinder JE 1987 Endocrine mechanism of puberty in heifers. Role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. *Biology of Reproduction* **37** 1054-1065.
- De La Sota RL, Lucy MC, Staples CR & Thatcher WW 1993 Effects of recombinant bovine somatotropin (Sometribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **76** 1002-1013.
- Eler JP, Ferraz JB, Balieiro JC, Mattos EC & Mourão GB 2006 Genetic correlation between heifer pregnancy and scrotal circumference measured at 15 and 18 months of age in Nelore cattle. *Genetics and Molecular Research* **5** 569-580.
- Eler JP, Silva Jr JA, Ferraz JBS, Dias F, Oliveira HN, Evans JL & Golden BL 2002 Genetic evaluation of the probability of pregnancy at 14 months for Nelore heifers. *Journal of Animal Science* **80** 951-954.
- Erberhardt BC, Satrapa RA, Capinzaiki CRL, Trinca LA & Barros CM 2009 Influence of the breed of bull (*Bos taurus indicus* vs. *Bos taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* and cross-bred) on the resistance of bovine embryos to heat. *Animal Reproduction Science* **114** 54-61.
- Ereno RL 2008 Gene expression of luteinizing hormone receptor (LHR) isoforms in granulosa cells of follicles from Nelore heifers before, during and after follicular deviation. PhD thesis, University of Sao Paulo State (Brazil).
- Evans AC & Fortune JE 1997 Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology* **138** 2963-2971.
- Fajersson P, Barradas HV, Romanponce H & Cook RM 1991 The effects of dietary protein on age and weight at the onset of puberty in Brown Swiss and Zebu heifers in the tropics. *Theriogenology* **35** 845-855.
- Ferreira RM, Ayres H, Ferraz ML, Araújo AB, Chiaratti MR, Sá Filho MF, Calomeni G, Rodrigues CA, Watanabe YF, Vireque AA & Baruselli PS 2010 Ovum pick up and in vitro embryo production during the summer: differences between holstein heifers, high producing holstein cows in peak lactation and repeat breeder Holstein cows. *Reproduction, Fertility and Development* **22** 290 (abstract).
- Figueiredo RA, Barros CM, Pinheiro OL & Sole JMP 1997 Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology* **47** 1489-1505.
- Forni S & Albuquerque LG 2005 Estimates of genetic correlations between days to calving and reproductive and weight traits in Nelore cattle. *Journal of Animal Science* **83** 1511-1515.
- Fortune JE, Rivera GM, Evans AC & Turzillo AM 2001 Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biology of Reproduction* **65** 648-654.
- Gambini ALG, Moreira MBP, Castilho C & Barros CM 1998 Follicular development and synchronization of ovulation in Gir cows. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* **22** 201-210.
- Garverick HA, Baxter G, Gong J, Armstrong DG, Campbell BK, Gutierrez CG & Webb R 2002 Regulation of expression of ovarian mRNA encoding steroidogenic enzymes and gonadotrophin receptors by FSH and GH in hypogonadotrophic cattle. *Reproduction* **123** 651-661.
- Gaughan JB, Mader TL, Holt S, Josey MJ & Rowan KJ 1999 Heat tolerance of Boran and Tuli crossbred steers. *Journal of Animal Science* **77** 2398-2405.
- Gimenes LU, Fantinato Neto P, Arango JSP, Ayres H & Baruselli PS 2009 Follicular dynamics of *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Bubalus bubalis* heifers treated with norgestomet ear implant associated or not to injectable progesterone. *Animal Reproduction* **6** 256.
- Gimenes LU, Ferraz ML, Araújo AB, Fantinato Neto P, Chiaratti MR, Mesquita LG, Arango JSP, Raposo M, Souza DC, Calomeni GD, Gardinal R, Rodriguez CLV, Trinca LA, Meirelles FV & Baruselli PS 2010 OPU at different times of a synchronized follicular wave did not affect IVP in *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Bubalus bubalis*. *Reproduction, Fertility and Development* **22** 293.

- Gimenes LU, Sá Filho MF, Carvalho NAT, Torres-Junior JRS, Souza AH, Madureira EH, Trinca LA, Sartorelli ES, Barros CM, Carvalho JBP, Mapletoft RJ & Baruselli PS 2008 Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology* **69** 852-858.
- Ginther OJ, Knopf L & Kastelic JP 1989 Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. *Journal of Reproduction and Fertility* **87** 223-230.
- Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR & Kot K 1996 Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction* **55** 1187-1194.
- Goodhand KL, Watt RG, Staines ME, Hutchinson JSM & Broadbent PJ 1999 In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine oocyte donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology* **51** 951-961.
- Gromoll J, Eiholzer U, Nieschlag E & Simoni M 2000 Male hypogonadism caused by homozygous deletion of exon 10 of the luteinizing hormone (LH) receptor: differential action of human chorionic gonadotropin and LH. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **85** 2281-2286.
- Hammond AC, Olson TA, Chase Jr CC, Bowers EJ, Randel RD & Murphy CN 1996 Heat tolerance in two tropically adapted *Bos taurus* breeds, Senepol and Romosinuano, compared with Brahman, Angus, and Hereford cattle in Florida. *Journal of Animal Science* **74** 295-303.
- Ireland JJ & Roche JF 1982 Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotropin receptors. *Endocrinology* **111** 2077-2086.
- Kamwanja LA, Chase Jr CC, Gutierrez JA, Guerriero VJ, Olson TA & Hammond AC 1994 Responses of bovine lymphocytes to heat shock as modified by breed and antioxidant status. *Journal of Animal Science* **72** 438-744.
- Kawate N 2004 Studies on the regulation of expression of luteinizing hormone receptor in the ovary and the mechanism of follicular cyst formation in ruminants. *Journal of Reproduction and Development* **50** 1-8.
- Kojima N, Stumpf TT, Cupp AS, Werth LA, Roberson MS, Wolfe MW, Kittok RJ, & Kinder JE 1992. Progestins and exogenous progesterone do not mimic the corpus luteum in regulation in LH and 17 β -estradiol in circulation of cows. *Biology of Reproduction* **47** 1009.
- Landaeta-Hernández AJ, Palomares-Naveda R, Soto-Castillo G, Atencio A, Chase Jr CC & Chenoweth PJ 2004 Social and breed effects on the expression of a PGF $_{2\alpha}$ induced oestrus in beef cows. *Reproduction in Domestic Animals* **39** 315-320.
- Lopez-Gatius F 2003 Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain. *Theriogenology* **60** 89-99.
- Lopez H, Satter LD & Wiltbank MC 2004 Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science* **81** 209-223.
- Macmillan KL & Burke CR 1996 Effects of oestrus cycle control on reproductive efficiency. *Animal Reproduction Science* **42** 307-320.
- Macmillan KL & Peterson AJ 1993 A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for oestrus synchronisation, increasing pregnancy rates and the treatment of postpartum anoestrus. *Animal Reproduction Science* **33** 1-25.
- Malayer JR & Hansen PJ 1990 Differences between Brahman and Holstein cows in heat-shock induced alterations of protein synthesis and secretion by oviducts and uterine endometrium. *Journal of Animal Science* **68** 266-280.
- Martin LC, Brinks JS, Bourdon RM & Cundiff LV 1992 Genetic effects on beef heifer puberty and subsequent reproduction. *Journal of Animal Science* **70** 4006-4017.
- Martins CM, Castricini ESC, Reis EL, Torres-Júnior JRS, Gimenes LU, Sa Filho MF & Baruselli PS 2005 Produção embrionária de vacas holandesas a diferentes protocolos de superovulação com inseminação em tempo fixo. *Acta Scientiae Veterinariae* **33** 286 (abstract).
- Membrive CMB 2000 *Estudo da sincronização das ondas foliculares e das características de estros, por radiotelemetria, em novilhas cruzadas (Bos indicus x Bos taurus) tratadas com acetato de melengestrol e prostaglandina associados a hCG, GnRH ou 17 β estradiol + progesterona*. São Paulo, 2000. 156p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Mizuta K 2003 *Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, progesterona e estradiol que precedem a ovulação em fêmeas bovinas Nelore (Bos taurus indicus), Angus (Bos taurus taurus) e Nelore x Angus (Bos taurus indicus x Bos taurus taurus)*. São Paulo, 2003. 98 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Mollo MR, Rumpf R, Martins AC, Mattos MCC, Lopes Jr, G, Carrijo LHD & Sartori R 2007 Ovarian function in Nelore heifers under low or high feed intake. *Acta Scientiae Veterinariae* **35** 958 (abstract).
- Monteiro F, Ferreira M, Potiens J, Eberhardt B, Trinca L & Barros C 2009 Influence of superovulatory protocols on in vitro production of Nelore (*Bos indicus*) embryos. *Reproduction of Domestic Animals* Apr 1 [Epub ahead of print].
- Muller T, Gromoll J & Simoni M 2003 Absence of exon 10 of the human luteinizing hormone (LH) receptor impairs LH, but not human chorionic gonadotropin action. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. **88** 2242-2249.
- National Research Council 2000 Nutrient requirements of beef cattle. 7 rev. ed., update 2000. Washington: National Academy Press 232p.
- Negussie B, Brannang E & Rottmann OJ 1999 Reproductive performance and herd life of dairy cattle at Asella

- livestock farm, Arsi, Ethiopia. II. Crossbreds with 50, 75 and 87.5% European inheritance. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **116** 225-234.
- Nogueira GP** 2004 Puberty in south american *Bos indicus* (Zebu) cattle. *Animal Reproduction Science* **82** 361-372.
- Nogueira MFG, Barros BJP, Teixeira AB, Trinca LA, D'Occhio MJ & Barros CM** 2002 Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in superstimulated beef cows. *Theriogenology* **57** 1625-1634.
- Nogueira MFG & Barros CM** 2003 Timing of ovulation in Nelore cows superstimulated with P36 protocol. *Acta Scientiae Veterinariae* **31** 509 (abstract).
- Nogueira MFG, Buratini J, Jr., Price CA, Castilho AC, Pinto MG & Barros CM** 2007a Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. *Molecular Reproduction & Development* **74** 680-686.
- Nogueira MFG, Fragnito PS, Trinca LA & Barros CM** 2007b The effect of type of vaginal insert and dose of pLH on embryo production, following fixed-time AI in a progestin-based superstimulatory protocol in Nelore cattle. *Theriogenology* **67** 655-660.
- Paschal JC, Sanders JO & Kerr JL** 1991 Calving and weaning characteristics of Angus-, Gray Brahman-, Gir-, Indu-Brazil-, Nellore-, and Red Brahman-sired F1 calves. *Journal of Animal Science* **69** 2395-2402.
- Pegorer MF, Vasconcelos JLM, Trinca LA, Hansen PJ & Barros CM** 2007 Influence of sire and sire breed (Gyr versus Holstein) on establishment of pregnancy and embryonic loss in lactating Holstein cows during summer heat stress. *Theriogenology* **67** 692-697.
- Pereira E, Oliveira HN, Eler JP, Silva JA II de V & Van Melis MH** 2007 Comparison among three approaches for evaluation of sexual precocity in Nellore cattle. *Animal* **1** 411-418.
- Pierson RA & Ginther OJ** 1984 Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology* **21** 495-504.
- Pinheiro OL, Barros CM, Figueredo RA, Valle ER, Encarnação RO & Padovani CR** 1998 Estrous behaviour and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F_{2α} or norgestomet and estradiol valerate. *Theriogenology* **49** 667-681.
- Pontes JHF, Silva KCF, Basso AC, Ferreira CR, Santos GMG, Sanches BV, Porcionato JPF, Vieira PHS, Sterza FAM & Seneda MM** 2010 Comparison of oocyte and embryo production among *Bos taurus*, *Bos indicus* and *indicus-taurus* donor cows. *Reproduction, Fertility and Development* **22** 248.
- Rae DO, Chenoweth PJ, Giangreco MA, Dixon PW & Bennet FL** 1999 Assessment of estrus detection by visual observation and electronic detection methods and characterization of factors associated with estrus and pregnancy in beef heifers. *Theriogenology* **51** 1121-1132.
- Randel RD** 1976 LH and ovulation in Brahman, Brahman x Hereford and Hereford heifers. *Journal of Animal Science* **43** 300.
- Randel RD** 1984 Seasonal effects on female reproductive functions in the bovine (Indian breeds). *Theriogenology* **21** 70-85.
- Rawlings NC, Evans ACO, Honaramooz A & Bartlewski PM** 2003 Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. *Animal Reproduction Science* **78** 259-270.
- Rhodes FM, De'ath G & Entwistle KW** 1995 Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. *Animal Reproduction Science* **38** 265-277.
- Robert C, Gagne D, Lussier JG, Bousquet D, Barnes FL & Sirard MA** 2003 Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. *Reproduction* **125** 437-446.
- Rocha A, Randel RD, Broussard JR, Lim JM, Blai RM, Roussel JD, Godke RA & Hansel W** 1998 High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology* **49** 657-665.
- Rodrigues CA, Ayres H, Nichi M, Bo GA & Baruselli PS** 2004 Artificial insemination and embryo transfer pregnancy rates in high production Holstein breeding under tropical conditions. In 'Proceedings of the 15th International Congress of Animal Reproduction' (Eds P. K. Basrur, P. J. Broadbent, M. Henry and L. E. Pinheiro.) 396 (Elsevier: Porto Seguro, Brazil.) (abstract).
- Rodrigues CA, Mancilha RF, Reis EL, Ayres H, Gimenes LU & Sá Filho MF** 2005 Efeito do número de implantes de norgestomet e do momento da administração do indutor de ovulação em vacas holandesas superovuladas (abstract). *Acta Scientiae Veterinariae* **33** 229.
- Rodrigues HD, Kinder JE & Fitzpatrick LA** 2002 Estradiol regulation of luteinizing hormone secretion in heifers of two breed types that reach puberty at different ages. *Biology of Reproduction* **66** 603-609.
- Sá Filho MF, Gimenes LU, Ayres H, Carvalho NAT, Carvalho JB & Baruselli PS** 2005 Dinâmica folicular de novilhas *Bos indicus* tratadas com implante auricular de norgestomet ou com dispositivo intravaginal de progesterona. *Acta Scientiae Veterinariae* **33** 266 (abstract).
- Sales JNS, Iguma LT, Batista RITP, Gama MAS, Camargo LSA, Gimenes LU, Marques MG, Simões R, Fernandes CB, Viana JHM & Baruselli PS** 2010 Effect of different energy levels diet on oocyte quantity and quality of non lactating cows (*Bos indicus* and *Bos taurus*) submitted to ovum pick-up. *Acta Scientiae Veterinariae* (Abstract in press).
- Sangsrivavong S, Combs DK, Sartori R, Armentano LE & Wiltbank MC** 2002 High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol 17 beta in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* **85** 2831-2842.
- Sartorelli ES, Carvalho LM, Bergfelt DR, Ginther OJ & Barros CM** 2005 Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology* **63** 2382-2394.

- Sartorelli ES, Satrapa RA, Barcelos ACZ, Potiens JR & Barros CM 2006 Influence of heat stress on apoptosis rate of in vitro produced bovine embryos (*indicus* vs *taurus*) and in their capacity to originate pregnancies. *Acta Scientiae Veterinariae* **34** 474 (abstract).
- Sartori R, Fricke PM, Ferreira JC, Ginther OJ & Wiltbank MC 2001 Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biology of Reproduction* **65** 1403-1409.
- Sartori R, Guardieiro MM, Barros CM, Bastos MR, Machado GM, Leme LO & Rumpf R 2009 Lack of improvement on embryo production by the replacement of the last two doses of pFSH by eCG in superstimulated Nelore heifers. *Reproduction Fertility and Development* **21** 245 (abstract).
- Sartori R, Gumen A, Guenther JN, Souza AH, Caraviello D & Wiltbank MC 2006 Comparison of artificial insemination versus embryo transfer in lactating dairy cows. *Theriogenology* **65** 1311-1321.
- Sartori R, Haughian JM, Shaver RD, Rosa GJM & Wiltbank MC 2004 Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *Journal of Dairy Science* **87** 905-920.
- Sartori R, Rosa GJM & Wiltbank MC 2002 Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science* **85** 2813-2822.
- Savio JD, Boland MP & Roche JF 1990 Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in post-partum dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility* **88** 581-591.
- Savio JD, Keenan L, Boland MP & Roche JF 1988 Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* **83** 663-671.
- Segerson EC, Hansen TR, Libby DW, Randel RD & Getz WR 1984 Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. *Journal of Animal Science* **59** 1026-1046.
- Seneda MM, Blaschi W, Andrade ER, Nonato I, Pontes JHF, Ereno JC & Uvo S 2004 Use of Pluset before follicular aspiration (OPU). Impact on in vitro embryo production in *Bos indicus* cows. *Acta Scientiae Veterinariae* **2** 186 (abstract).
- Seneda MM, Esper CR, Garcia JM, Oliveira JA & Vantini R 2001 Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Animal Reproduction Science* **67** 37-43.
- Simões RAL 2009 Determinação da taxa de ovulação e sua correlação com diâmetro folicular e isoformas de RNAm para receptor de LH, em vacas da raça Nelore. Botucatu, 2009. 86 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.
- Sirois J & Fortune JE 1988 Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biology of Reproduction* **39** 308-317.
- Torres-Júnior JRS, Pires MFA, de Sá WF, Ferreira AM, Viana JHM, Camargo LSA, Ramos AA, Folhadella IM, Polisseni J, Freitas C, Clemente CAA, Sá Filho MF, Paula-Lopes FF & Baruselli PS 2008 Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* **69** 155-166.
- Townson DH, Tsang PCW, Butler WR, Frajblat M, Griel Jr LC, Johnson CJ, Milvae RA, Niksic GM & Pate JL 2002 Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. *Journal of Animal Science* **80** 1053-1058.
- Viana JHM & Camargo LSA 2007 Bovine embryo production in Brazil: A new scenario. *Acta Scientiae Veterinariae* **35** 920-924.
- Viana JHM, Ferreira AM, Sá WF & Camargo LSA 2000 Follicular dynamics in zebu cattle. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **35** 2501-2509.
- Webb R & England BG 1982 Identification of the ovulatory follicle in the ewe: associated changes in follicular size, thecal and granulosa cell luteinizing hormone receptors, antral fluid steroids, and circulating hormones during the preovulatory period. *Endocrinology* **110** 873-881.
- Willians GL, Gazal OS, Guzmán Vega GA & Stanko RL 1996 Mechanisms regulating suckling-mediated anovulation in the cow. *Animal Reproduction Science* **42** 289-297.
- Wiltbank MC, Lopez H, Sartori R, Sangsritavong S & Gümen A 2006 Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology* **65** 17-29.
- Wolfenson D, Inbara G, Rotha Z, Kaimb M, Blocha A & Braw-Tal R 2004 Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology* **62** 1042-1055.
- Wolfenson D, Roth Z & Meidan R 2000 Impaired reproduction in heat stressed cattle: basic and applied aspects. *Animal Reproduction Science* **60-61** 535-547.
- Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA & Youngquist RS 1995 Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biology of Reproduction* **53** 951-957.
- Zanenga CA, Pedrosa MF, Lima GF, Marques MO, Santos ICC, Valentim R & Baruselli PS 2003 Comparison between two superovulation protocols associated with FTAI, in Nelore cows (*Bos taurus indicus*) *Acta Scientiae Veterinariae* **31** 626-627 (abstract).
- Zeitoun MM, Rodriguez HF, Randel RD 1996 Effect of season on ovarian follicular dynamics in Brahman cows. *Theriogenology* **45** 1577-1581.

ANEXO II

Segue trabalho científico publicado durante o período do doutorado.

INFLUÊNCIA DA ALTA INGESTÃO DE MATÉRIA SECA NA RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA EM VACAS MISTIÇAS

MICHELE RICIERI BASTOS,¹ ALEXANDRE FLORIANI RAMOS,² KATLEN DRIESSEN,² ALINE CARVALHO MARTINS,¹ RODOLFO RUMPF² E ROBERTO SARTORI³

1. Departamento de Reprodução Animal e Radiologia,, Veterinária, FMVZ, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Botucatu, SP, Brasil, CEP 18618-000

2. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CEP 70770-900, Brasília, DF, Brasil

3. Departamento de Zootecnia, ESALQ, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP, Brasil, CEP 13418-900. E-mail: sartori@esalq.usp.br

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da alta ingestão de matéria seca (AIMS) sobre a resposta superovulatória de vacas mestiças Nelore x Simental. Quatorze vacas não lactantes, com escore de condição corporal (ECC) igual a 4,0 (escala de 1 a 5), foram divididas aleatoriamente em dois grupos (Manutenção=M ou alta ingestão de matéria seca=AIMS). De sete dias antes do início da superovulação (SOV) até o final das aplicações de FSH, as vacas do grupo AIMS receberam dieta com 180% da manutenção. O grupo M recebeu dieta de manutenção. Sete dias após a IA, os embriões foram colhidos e avaliados. Quarenta dias após, inverteram-se os

tratamentos e realizou-se uma nova SOV. Para comparação entre os grupos, utilizou-se o teste t pareado. Os resultados estão apresentados em média \pm erro-padrão. O número de folículos recrutados detectados por ultrassonografia ($19,6\pm 1,8$ e $16,4\pm 2,0$) e ovulados ($15,0\pm 1,6$ e $13,0\pm 1,6$) não diferiu entre os grupos M e AIMS, respectivamente ($P>0,10$). Entretanto, os números de estruturas totais ($14,1\pm 2,3$ e $9,5\pm 1,5$) e embriões viáveis ($10,1\pm 2,1$ e $6,7\pm 1,5$) colhidos foram maiores no grupo M ($P<0,05$). Conclui-se que, nas condições deste estudo, AIMS previamente à SOV pode comprometer a produção embrionária em vacas de elevado ECC.

PALAVRAS-CHAVES: Bovinos, embrião, nutrição, superovulação.

ABSTRACT

INFLUENCE OF HIGH DRY MATTER INTAKE ON THE SUPEROVULATORY RESPONSE OF CROSSBRED COWS

This study investigated the effect of high dry matter intake (Flushing) on the superovulatory response of crossbred Nelore x Simmental cows. Fourteen non-lactating cows, with a mean body condition score (BCS) of 4.0 (scale from 1 to 5) were randomly assigned into two groups (Maintenance=M or Flushing=F). Seven days prior to onset of superovulation (SOV) until the last day of treatment with FSH, group F cows were fed a diet to achieve 180% of maintenance. Group M cows were fed a maintenance diet. Seven days after AI, embryos were collected and evaluated. Forty days later, the treatment groups were inverted and another

SOV was realized. Variables were compared by paired t test and data are presented as mean \pm SEM. The number of recruited (19.6 ± 1.8 and 16.4 ± 2.0) and ovulated (15.0 ± 1.6 and 13.0 ± 1.6) follicles detected by ultrasonography did not differ between the M and F groups, respectively ($P>0.10$). However, the total number of embryos/ova (14.1 ± 2.3 and 9.5 ± 1.5) and the number of viable embryos (10.1 ± 2.1 and 6.7 ± 1.5) recovered were greater in group M ($P<0.05$). Under the conditions of this study, we conclude that nutritional flushing previously to SOV may compromise embryo production in cows with high BCS.

KEY WORDS: Bovine, embryo, nutrition, superovulation.

INTRODUÇÃO

Um dos maiores entraves dos programas comerciais de transferência de embriões (TE) é a grande variação individual ao tratamento superestimulatório (MAPLETOFT et al., 2002; NOGUEIRA et al., 2002; BARROS & NOGUEIRA, 2004), observada tanto em vacas e novilhas *Bos indicus* (BARUSELLI et al., 2003) quanto em *Bos taurus* (SARTORI et al., 2003, 2004). A variabilidade na resposta ovariana está relacionada aos diferentes protocolos de superovulação (SOV), mas também ao estado nutricional do animal (YAAKUB et al., 1999). Em geral, fêmeas de elevado mérito genético, que são utilizadas como doadoras de embriões, não estão sob um manejo nutricional adequado, o que pode comprometer os resultados de TE.

Além das alterações nutricionais, o escore de condição corporal (ECC) e o nível energético da dieta também estão entre os fatores que mais afetam o desempenho reprodutivo da fêmea bovina (WEBB et al., 2004). Estes podem influenciar, de forma sinérgica ou antagônica, diversos fatores que regulam o desenvolvimento folicular ovariano e a esteroidogênese, refletindo quali e quantitativamente na produção de embriões (RHODES et al., 1995; ADAMIÁK et al., 2005).

Dessa forma, pode-se afirmar que a resposta superovulatória pode ser influenciada por fatores intrínsecos (relacionados ao animal) e extrínsecos (ambiente), dentre eles a nutrição (WEBB et al., 2004). Trabalhos que foram desenvolvidos com o objetivo de aumentar o número de folículos recrutados mostraram que a população folicular presente na fase de recrutamento é pré-requisito para melhorar a resposta aos protocolos de SOV e, conseqüentemente, melhorar a eficiência reprodutiva dos animais domésticos (FORTUNE, 2003). Até o presente momento, o *flushing* nutricional (curto período de superalimentação) (GUTIERREZ et al., 1997; ARMSTRONG et al., 2001; GONG et al., 2002) e o uso do rbST (somatotropina bovina recombinante) (GONG et al., 1991; BURATINI et al., 2000) mostraram ser os principais fatores capazes de influenciar positivamente o número de folículos recrutados e/ou a resposta aos protocolos de SOV.

Embora o aumento da ingestão energética possa alterar o perfil dos hormônios metabólicos, principalmente IGF-I e insulina, e afetar o desenvolvimento folicular (ARMSTRONG et al., 2001), o período mínimo necessário para que este aporte energético tenha efeito sobre o número de folículos recrutados ainda precisa ser determinado.

Objetivou-se com este trabalho avaliar a influência da alta ingestão de matéria seca (AIMS) sete dias antes do início e durante a superestimulação ovariana com FSH, sobre a resposta superestimulatória, superovulatória e produção embrionária, em vacas mestiças F1 Nelore x Simental.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas quatorze vacas não lactantes, mestiças F1 Nelore x Simental, com idade entre cinco e seis anos, peso médio de 500,0 kg e ECC 4,0 (escala de 1 a 5; HOUGHTON et al., 1990), que passaram por exame ginecológico antes do início do experimento e encontravam-se sem alterações reprodutivas detectáveis.

As vacas foram divididas aleatoriamente em dois grupos experimentais (Manutenção e AIMS) e mantidas em sistema de pastejo com *Brachiaria decumbens*, mineralização adequada e água à vontade, em um delineamento experimental *cross-over*.

Três semanas antes do início da SOV, as vacas passaram a receber uma dieta de adaptação a fim de se evitar complicações ruminais durante o experimento, devido ao maior aporte nutricional. Durante essa adaptação, os animais permaneceram em um piquete com pouca oferta de gramíneas e com suplementação à base de silagem de milho e fonte proteica à base de NNP, em níveis próximos aos de manutenção. Sete dias antes do início da SOV as vacas foram transferidas para piquetes sem gramíneas e passaram a ser alimentadas exclusivamente com dieta balanceada, sal mineral e água à vontade. A dieta do grupo Manutenção foi ajustada para 100% das necessidades diárias de manutenção, totalizando uma ingestão de 2,03% do peso vivo (PV) por dia. O grupo AIMS recebeu uma dieta ajustada para 180% em relação

à manutenção (ingestão total de 3,65% do PV/dia). O encerramento da AIMS coincidiu com a última aplicação de FSH, totalizando onze dias de duração. Para que houvesse pouca competição pela dieta fornecida, e para assegurar um consumo alimentar relativamente uniforme entre as vacas, respeitou-se uma medida mínima de comprimento de cocho de 70 cm por animal.

Após esse período, as vacas do grupo AIMS retornaram à dieta de manutenção até o momento da colheita dos embriões e, após as colheitas,

todas as vacas retornaram ao sistema de pastejo em *Brachiaria decumbens*, com suplementação mineral adequada e água à vontade. Quarenta dias após, foi realizada uma outra repetição do experimento, e os tratamentos foram invertidos, ou seja, o grupo Manutenção passou a ser o grupo AIMS e vice-versa.

A composição centesimal e as percentagens de matéria seca (MS), nutrientes digestíveis totais (NDT) e proteína bruta (PB) da dieta oferecida estão ilustradas na Tabela 1.

TABELA 1. Composição centesimal, percentagens de matéria seca (MS), nutrientes digestíveis totais (NDT), e proteína bruta (PB) da dieta experimental¹

Componentes	% na dieta	% de MS	% de NDT	% de PB
Feno de <i>coast-cross</i>	36,7	85,0	50,0	10,0
Silagem de milho	18,0	25,0	62,8	7,5
Milho moído	24,4	90,0	80,0	9,0
Farelo de trigo	12,4	90,0	70,0	14,0
Concentrado*	8,5	90,0	65,0	22,0
Dieta total	-	76,5	63,4	10,8

1. Valores calculados por tabela. *Quantidades por quilo do produto (Boião PPU, Integral Nutrição Animal, Goiânia, GO): antioxidante (320,0 mg), cálcio (39,4 g), cobalto (32,0 mg), cobre (240,0 mg), enxofre (14,4 g), ferro (320,0 mg), flúor (máx) (542,0 mg), fósforo (32,8 g), iodo (48,0 mg), magnésio (99,6g), manganês (160,0 mg), nitrogênio não proteico (80,87 g), NNP equiv. proteína (máx) (50,50 %), palatabilizante (200 g), proteína bruta mínima (52,6 %), selênio (4,8 mg), sódio (118,8 g), solub.do fósforo (P) em ácido cítrico a 2% (mín) (90,0%), vitamina A (4000,0 UI/kg), vitamina E (40,0 UI/kg), zinco (960,0 mg), relação cálcio: fósforo (mín) (1,2:1).

Três dias após o início do fornecimento das dietas experimentais (Manutenção ou AIMS), todas as vacas foram sincronizadas com dispositivo intravaginal de progesterona (P4; DIB, Sintex S.A., Argentina) e 2,0 mg de benzoato de estradiol (BE; Ric-BE, Syntex S.A., Argentina) e foram superovuladas com FSH seguindo o protocolo de TE em tempo fixo descrito na Figura 1. Cada vaca recebeu oito injeções im de FSH a cada doze horas, em doses decrescentes, utilizando-se uma dose total de 250 UI de FSH (Pluset, Calier, S.A., Barcelona, Espanha) e 0,150 mg de prostaglandina F2 α (PG F2 α ; D-Cloprostenol; Prolise; ARSA S. R. L., Buenos Aires, Argentina) simultânea à sexta e sétima aplicação de FSH. A retirada do dispositivo intravaginal de progesterona foi simultânea à sexta aplicação do FSH. Doze horas após a última

aplicação de FSH, induziu-se a ovulação com 0,05 mg de GnRH (acetato de gonadorelina; Gestran Plus; ARSA S. R. L., Buenos Aires, Argentina). Doze e 24 horas após a aplicação do indutor da ovulação, as vacas foram inseminadas artificialmente com sêmen congelado de uma mesma partida de um mesmo touro, e os embriões foram colhidos sete dias após a injeção para indução da ovulação. Após a colheita, as vacas receberam 0,150 mg de PGF2 α (D-Cloprostenol; Prolise) e retornaram ao pasto.

Os exames ultrassonográficos foram realizados por um único operador, mediante um aparelho de ultrassom em tempo real (Aloka SSD-500 V; Corometrics Medical Systems Inc., Wallingford, CT, USA) com transdutor linear transretal de 7,5 MHz.

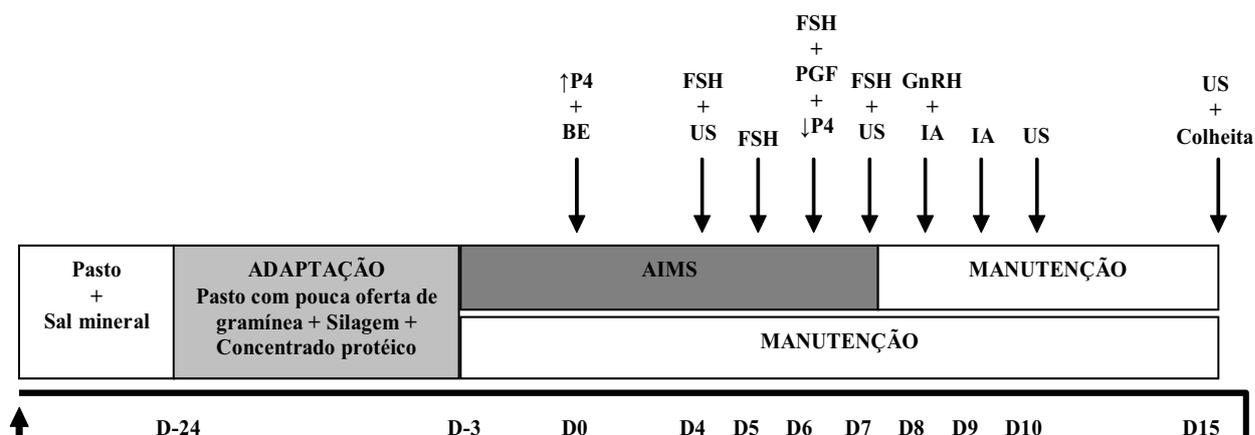


FIGURA 1. Esquema representativo do delineamento experimental, mostrando o período das dietas experimentais, o protocolo de superestimulação ovariana e os exames ultrassonográficos. Legenda: D-24 a D15 = dias em relação ao início do protocolo de superestimulação (D0); P4 = implante de progesterona, BE = benzoato de estradiol, FSH = hormônio folículo estimulante; PGF = prostaglandina F2 α , GnRH = hormônio liberador de gonadotrofina; IA = inseminação artificial; US = exame ultrassonográfico. AIMS = alta ingestão de matéria seca (180% em relação à dieta de manutenção).

Exames ultrassonográficos ovarianos foram realizados no ato da primeira e da última aplicação de FSH, e dois e sete dias após a indução da ovulação (Figura 1). Na avaliação realizada no dia da primeira aplicação de FSH, contaram-se apenas folículos pequenos (3,0 a 5,0 mm de diâmetro), e na avaliação do dia da última aplicação de FSH e dois dias após a indução da ovulação, contaram-se apenas os folículos com diâmetro $\geq 6,0$ mm.

Para realização das colheitas dos embriões, as vacas foram contidas em tronco individual e procedeu-se à anestesia peridural com 4,0 mL de lidocaína 2,0%. Aplicou-se a técnica de colheita dupla, relatada por CASTRO NETO et al. (2005), em que se posicionou o balão do catéter de Foley no corpo uterino justaposto ao óstio cranial da cérvix, empregando-se, em média, 1.000 mL de Dulbecco Phosphate Buffered Saline (DPBS) por animal. Após a lavagem uterina, o útero foi preenchido com DPBS e o catéter mantido no local com sua abertura lacrada com uma presilha de filtro de coleta. Em seguida, as vacas foram soltas e retornaram ao tronco vinte minutos depois, para a remoção do DPBS que estava no útero e para a realização de um segundo lavado com um volume extra de 500 mL de DPBS. O lavado uterino foi colhido em filtro de 75 μ m, com devida identificação para cada animal e transportado para o

laboratório, onde os embriões foram rastreados e avaliados em estereomicroscópio (Zeiss – Stemi SV6, Holanda). Classificaram-se os embriões segundo o grau de desenvolvimento e qualidade, de acordo com o manual da International Embryo Transfer Society – IETS (STRINGFELLOW & SIEDEL, 1999). Embriões de graus 1 a 3 foram considerados viáveis.

Todas as variáveis apresentaram homoscedasticidade pelo teste de Cochran e distribuição normal pelo teste de Lilliefors, exceto o número de corpos lúteos, que sofreu transformação logarítmica, passando a ter distribuição normal. Para comparar as variáveis entre os grupos, utilizou-se o teste t pareado. Os resultados estão apresentados sob a forma de média \pm erro-padrão da média.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, utilizando sete dias de fornecimento da AIMS antes do início da SOV, não foi observada diferença entre os tratamentos Manutenção e AIMS ($P > 0,10$) quanto ao número de folículos recrutados na onda folicular sincronizada, quanto à resposta superestimulatória (número de folículos no final do tratamento com FSH) e resposta superovulatória (número de corpos lúteos). No entanto, o número de estruturas totais e o

número de embriões viáveis mostraram-se maiores ($P \leq 0,05$) no grupo Manutenção, comparado ao grupo AIMS (Tabela 2).

TABELA 2. Resultados (média \pm EPM) da população folicular, corpos lúteos e embriões colhidos em vacas recebendo dieta de Manutenção ou com alta ingestão de matéria seca (AIMS)

	Manutenção (n = 14)	AIMS (n = 14)
Folículos de 3 a 5 mm (início do FSH); n	19,5 \pm 1,8	16,4 \pm 2,0
Folículos \geq 6 mm (final do FSH); n	17,6 \pm 1,8	18,9 \pm 2,6
Corpos lúteos; n	15,0 \pm 1,6	13,0 \pm 1,6
Estruturas totais; n	14,1 \pm 2,3 ^a	9,5 \pm 1,8 ^b
Embriões viáveis; n	10,7 \pm 2,1 ^a	6,7 \pm 1,5 ^b

^{a,b}Diferença entre os grupos ($P < 0,05$).

Trabalhos desenvolvidos com novilhas cruzadas (Hereford x Holandês) demonstraram que o fornecimento de AIMS (200%) por um curto período de tempo (duas ou três semanas) foi capaz de aumentar o número de folículos recrutados (GUTIERREZ et al., 1997; GONG et al., 2002) e, conseqüentemente, melhorou a resposta aos protocolos de superovulação à base de FSH (GONG et al., 2002). No entanto, alguns trabalhos observaram efeito nulo (FRERET et al., 2006) ou negativo (NOLAN et al., 1998; YAAKUB et al., 1999; WRENZYCKI et al., 2000; SIDDIQUI et al., 2002; LOZANO et al., 2003; ADAMIAK et al., 2005; MOLLO et al., 2007) da alta ingestão alimentar sobre o número de folículos recrutados e sobre a produção de ovócitos e de embriões.

O efeito positivo da alta ingestão sobre a população folicular normalmente é atribuído ao aumento das concentrações circulantes de IGF-I e, principalmente, insulina. Ambos atuam como potentes estimuladores da proliferação de células da granulosa e da esteroideogênese em bovinos, além de aumentar a resposta ovariana às gonadotrofinas (WEBB et al., 2004). No entanto, a insu-

lina responde de forma mais aguda às alterações na dieta do que o IGF-I (WEBB et al., 2004). Até o presente momento, o período mínimo de AIMS em que se detectou diferença nas concentrações de insulina e de IGF-I foi de dez dias, mas não se sabe se esta diferença já estava presente antes, uma vez que não foram feitas dosagens prévias (ARMSTRONG et al., 2001). Com base nos resultados de ARMSTRONG et al. (2001), o presente estudo optou por aumentar a ingestão alimentar por apenas sete dias antes do início do protocolo de SOV, a fim de se verificar se esse período de AIMS seria suficiente para elevar o número de folículos recrutados e, conseqüentemente, a resposta superovulatória, de forma que também resultasse em menor ganho de peso dos animais durante o tratamento e menor custo. No entanto, sete dias de AIMS, antes do início da SOV, não foi suficiente para alterar a população de folículos recrutados no início de uma onda. O fato de não ter sido encontrada diferença no número de folículos recrutados na onda sincronizada, possivelmente, ocorreu pelo elevado ECC dos animais utilizados neste experimento. De fato, ADAMIAK et al. (2005) observaram que animais hiperinsulinêmicos (fêmeas com elevado ECC e submetidas à alta ingestão alimentar) apresentaram menor número de folículos totais no ovário e menor número de ovócitos maturados e blastocistos produzidos após cultivo *in vitro*. Provavelmente, neste estudo, a associação AIMS e elevado ECC dos animais impediu um possível efeito positivo sobre o número de folículos recrutados. Além disso, esse período de sete dias de AIMS antes da SOV talvez não tenha sido suficientemente longo para alterar o recrutamento folicular, como descrito por ADAMIAK et al. (2005).

Com relação à produção embrionária, o fornecimento de AIMS por sete dias antes e mais quatro dias durante a superestimulação ovariana reduziu o número de estruturas totais e embriões viáveis colhidos. Apesar de a insulina e o IGF-I não terem sido dosados neste trabalho, acredita-se que sete dias de AIMS tenham sido suficiente para alterar a concentração circulante desses hormônios, principalmente a de insulina, em virtude do efeito negativo sobre a produção embrionária,

observado neste trabalho. Dados publicados sugerem que a AIMS associada a um elevado ECC nos animais possa exercer um efeito deletério sobre a maturação ovocitária e produção de embriões, possivelmente pelo excesso de IGF-I (WEBB et al., 2004) e pela hiperinsulinemia (ADAMIAK et al., 2005), o que pode ter ocorrido neste experimento, por terem sido usados animais com ECC médio igual a 4,0. Além disso, deve-se considerar que a permanência da AIMS durante as aplicações de FSH também possa ter resultado num efeito deletério sobre os ovócitos.

Corroborando os resultados negativos observados sobre a produção e qualidade embrionária nos animais submetidos à AIMS, YAAKUB et al. (1999) e WRENZYCKI et al. (2000) mostraram que novilhas que receberam quantidade restrita de concentrado produziram maior número de embriões e de qualidade superior quando comparadas a novilhas que receberam dieta à vontade. Similarmente, trabalhos com novilhas da raça Nelore (MOLLO et al., 2007) observaram que o número de embriões colhidos foi superior no grupo de baixa ingestão alimentar.

Dessa forma, acredita-se que o efeito positivo da AIMS sobre a população folicular, a resposta superovulatória e a produção embrionária seja dependente do estado metabólico em que o animal se encontra no momento em que a dieta é fornecida. SIDDIQUI et al. (2002) sugeriram que um nível nutricional que limite o ECC em 2,5 a 3,0 (escala de 1 a 5), em vacas zebus antes de um tratamento de superovulação, seja melhor do que um alto nível nutricional. Em concordância, ADAMIAK et al. (2005), além de mostrarem efeito negativo da hiperinsulinemia na qualidade dos ovócitos, sugeriram que o efeito do nível nutricional sobre as qualidades ovocitária e embrionária é dependente do ECC inicial da fêmea bovina. Outra possibilidade a ser considerada é que esses animais estavam a pasto antes do experimento e, durante parte do experimento, ficaram totalmente confinados com dieta exclusivamente no cocho. Portanto, não se pode descartar a possibilidade de o confinamento desses animais, mesmo que apenas com dieta de manutenção, durante o período de adaptação experimental, ter resultado no efeito semelhante

ao esperado com a AIMS e, após o período de adaptação, quando passaram a receber a dieta de alta ingestão, este maior aporte energético tenha sido excessivo, comprometendo a produção embrionária desses animais.

CONCLUSÕES

A alta ingestão de matéria seca, previamente à SOV, pode comprometer a produção embrionária em vacas de elevado ECC.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo auxílio financeiro, à FAPESP, pela concessão de bolsa, e à Integral Nutrição Animal, pelo fornecimento do concentrado.

REFERÊNCIAS

- ADAMIAK, S. J.; MACKIE, K.; WATT, R. G.; WEBB, R.; SINCLAIR, K. D. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hiperinsulinemia in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 918-926, 2005.
- ARMSTRONG, D. G.; MCEVOY, T. G.; BAXTER, G.; ROBINSON, J. J.; HOGG, C. O.; WOAD, K. J.; WEBB, R. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production *in vitro*: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1624-1632, 2001.
- BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. G. SOV em zebuínos de corte. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA. 1., 2004, Londrina. **Anais...** Londrina, 2004. p. 212-222. Disponível em: <<http://www.geraembryo.com.br/t.tecnicos/16%20Ciro%20Moraes%20Barros.pdf>>
- BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; REIS, E. L.; NASSER, L. F. T.; SILVA, R. C. P.; MENEGATTI, J. A.; VALENTIN, R.; SANTOS, I. C. C. Adequação da dose de FSH (Folltropin-v) em protocolos de superovulação de vacas nelore (*Bos taurus indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo (SOTF). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31 (supl), p. 244-245, 2003.
- BURATINI JR, J.; PRICE, C. A.; VISINTIN, J. A.; BO, 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.
- CASTRO NETO, A. S.; SANCHES, B. V.; BINELLI, M.; SENEDA, M. M.; PERRI, S. H.; GARCIA, J. F. Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. **Theriogenology**, v. 63, p. 1249-1255, 2005.
- 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.
- FRERET, S.; GRIMARD, B.; PONTER, A. A.; JOLY, C.; PONSART, C.; HUMBLLOT, P. Reduction of body-weight gain enhances *in vitro* embryo production in overfed superovulated dairy heifers. **Reproduction**, v. 131, p. 783-794, 2006.
- GONG J. G.; BRAMLEY, T.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: Follicular populations and peripheral hormones. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 941-949, 1991.
- GONG, J. G.; ARMSTONG, D. G.; BAXTER, G.; HOGG, C. O.; GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. The effect of dietary intake on superovulatory response to FSH in heifers. **Theriogenology**, v. 57, p. 1591-1602, 2002.
- GUTIERREZ, C. G.; OLDHAM, J.; BRAMLEY, T. A.; GONG, J. G.; CAMPBELL, B. K.; WEBB, R. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1876-1884, 1997.
- HOUGHTON, P. L.; LEMENAGER, R. P.; HENDRIX, K. S.; MOSS, G. E.; STEWART, T. S. Effects of body composition, pre- and postpartum energy intake and stage of production on energy utilization by beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 1447-1456, 1990.
- LOZANO, J. M.; LONERGAN, P.; BOLAND, M. P.; O'CALLAGHAN, D. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. **Reproduction**, v. 125, p. 543-553, 2003.
- MAPLETOFT, R. J.; STEWARD, K. B.; ADAMS, G. P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reproduction, Nutrition and Development**, v. 42, p. 601-611, 2002.
- MOLLO, M. R.; RUMPF, R.; MARTINS, A. C.; CARRIJO, L. H. D.; SAUERESSIG, M. G.; SARTORI, R. Produção de embriões em novilhas nelore superovuladas submetidas à baixa ou alta ingestão alimentar. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35 (supl.), p. 1241, Resumo, 2007.
- NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, B. J. P.; TEIXEIRA, A. B.; TRINCA, L. A.; D'OCCHIO, M. J.; BARROS, C. M. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in superstimulated beef cows. **Theriogenology**, v. 57, p. 1625-1634, 2002.
- NOLAN, R.; O'CALLAGHAN, D.; DUBY, R. T.; LONERGAN, P.; BOLAND, M. P. The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following superovulation in beef heifers. **Theriogenology**, v. 50, p. 1263-1274, 1998.
- RHODES, F. M.; FITZPATRICK, L. A.; ENTWISTLE, K. W.; DE'ATH, G. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrous. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 104, p. 41-49, 1995.
- SARTORI, R.; SUÁREZ-FERNÁNDEZ, C. A.; MONSON, R. L.; GUENTHER, J. N.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M. C. Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. **Theriogenology**, v. 60, p. 1319-1330, 2003.
- SARTORI, R.; SOUZA, A. H.; GUENTHER, J. N.; CARAVIELLO, D. GEIGER, L. N.; SCHENK, J.; WILTBANK, M. C. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. **Animal Reproduction**, v. 1, p. 86-90, 2004.
- SIDDIQUI, M. A. R.; SHAMSUDDIN, M.; BHUIYAN, M. M. U.; AKBAR, M. A.; KAMARUDDIN, K. M. Effect of feeding and body condition score on multiple ovulation and embryo production in zebu cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 37-41, 2002.
- STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. (Ed.). **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3. ed. Brasília: Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, Biblioteca do Congresso, 1999.
- WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; GONG, J. G.; ARMSTRONG, D. G. Control of follicular interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, v. 82 (Supl.), p. E63-E74, 2004.
- WRENZYCKI, C.; DE SOUZA, P.; OVERSTROM, E. W.; DUBY, R. T.; HERRMANN, D.; WATSON, A. J.; NIEMANN, H.; O'CALLAGHAN, D.; BOLAND, M. P. Effects of superovulated heifer diet type and quantity on relative mRNA abundances and pyruvate metabolism in recovered

embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 18, p. 69-78, 2000. and embryo yield in beef heifers. **Theriogenology**, v. 51, p. 1259-1266, 1999.

YAAKUB, H.; O'CALLAGHAN, D. O.; BOLAND, M. P.
Effect of type and quantity of concentrates on superovulation

Protocolado em: 7 maio 2008. Aceito em: 9 set. 2009.