

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PRODUÇÃO DE 13,14-DIIDRO 15-CETO PROSTAGLANDINA $F_{2\alpha}$
(PGFM) EM RESPOSTA À OCITOCINA NO PERÍODO PÓS-
PARTO EM VACAS DA RAÇA NELORE

RAFAEL AUGUSTO SATRAPA

BOTUCATU - SP
2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PRODUÇÃO DE 13,14-DIIDRO 15-CETO PROSTAGLANDINA $F_{2\alpha}$
(PGFM) EM RESPOSTA À OCITOCINA NO PERÍODO PÓS-
PARTO EM VACAS DA RAÇA NELORE

RAFAEL AUGUSTO SATRAPA

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção
do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Moraes Barros

BOTUCATU - SP

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Satrapa, Rafael Augusto.

Produção de 13, 14-diidro 15-ceto prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PGFM) em resposta à ocitocina no período pós parto em vacas da raça Nelore / Rafael Augusto Satrapa. – 2006.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.

Orientador: Ciro Moraes Barros

Assunto CAPES: 50504002

1. Bovino - Reprodução

CDD 636.20824

Palavras-chave: Bovino; Ciclo curto; Ocitocina; Progesterona; Prostaglandina

Dedicatória

Dedico este trabalho

Aos meus pais **Rodolpho e Thereza** e as minhas irmãs **Gisele, Patrícia e Raquel**: Parecia estar tão distante, mas enfim, chegou. Não o fim, mas somente uma etapa vencida. Agradeço aos meus familiares e os dedico esta dissertação, pois vocês são o motivo da minha vinda, a alegria do meu dia e a força de que preciso.

Especialmente à minha **mãe Thereza e minhas avós Gisela e Rafaela** (*in memoriam*), pois elas deixaram não só a saudade para quem fica, mas sim os ensinamentos que me fizeram conquistar tudo que tenho até hoje. No amanhã, elas farão falta, mas suas vozes aconchegantes estarão sempre me guiando em bons caminhos.

À minha noiva, **Débora**: “O amor resgata a pobreza, vence o tédio, ilumina o dia e instaura em nossa natureza a imperecível alegria” (Carlos Drummond de Andrade).

Agradecimentos

Especialmente ao meu orientador, Professor Dr. Ciro Moraes Barros: exemplo de profissionalismo e ética científica. Ensinou-me a questionar, a procurar a resposta para a dúvida; mas, sobretudo, ensinou-me a ter paixão pela pesquisa;

À todos os meus familiares, principalmente à Rodolpho, Gisele, Patrícia e Raquel. É impossível expressar em palavras o quanto eu os amo! Essa é mais uma de nossas vitórias;

À família Avellaneda Penatti: Anacleto, Wanda, Carlos Alberto, Nívea Mara e Marco. Considero-lhes minha família e agradeço muito pela colaboração e pela torcida;

À minha noiva Débora. Agradeço por ter sido companheira e carinhosa nos momentos de alegria. Te amo por ter sido ainda mais companheira e carinhosa nos momentos de dificuldades;

Especialmente ao Professor Dr. Mário Binelli, pela colaboração nas dosagens plasmáticas de PGFM, pelo auxílio na interpretação dos resultados e na análise estatística e principalmente pela paciência e amizade demonstradas;

À Professora Dra. Eunice Oba, pela colaboração nas dosagens plasmáticas de estradiol.

Aos meus amigos: Bruno Eberhardt, Walter Cavalcante, Vanessa Valezzi, Evandro Sartorelli, Diego Guerra, Mariana Machado, Marcelo Machado, Alfredo Souza, Marcelo Pegorer, obrigado pelas longas conversas, boas risadas e, sobretudo pela amizade. Agradeço, especialmente, aos amigos Vinícius Pinheiro, Ronaldo Ereno, Marcelo Piagentini e Cláudia Bertan pelo grande auxílio no desenvolvimento do experimento e pela amizade demonstrada;

Aos amigos e companheiros de Pós-Graduação: Ana Cláudia Barcelos, André Mueller, Andrey Teixeira, Marcelo Nogueira, Paulo Fernandes, Thaís Nabban, Renato Simões, Celso, Gabriel, Renata Romão, Débora Saito, Douglas Martins, Edmilson (Edão), Antony Castilho, Isabela Bazzo, Paula Ripamonte e aos que aqui não foram mencionados: vocês fazem parte desta conquista;

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ e do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu, pelos ensinamentos, pela amizade criada e pelos momentos agradáveis durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa;

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ e do Departamento de Farmacologia (Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu): Ana Cristina Murcia de Souza, Ana Maria Serafim, Janete Teixeira, Luiz Antônio de Oliveira e Paulo César Mioni. Obrigado pela amizade e pelos bons momentos compartilhados;

Ao proprietário da fazenda “Boi Verde”, Senhor Vilemondes Garcia de Andrade Filho, por permitir que o experimento fosse realizado em sua propriedade, e ao administrador da fazenda, Eduardo Zaratini, pelo grande auxílio no experimento;

À FAPESP, pelo suporte financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

Sumário

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Capítulo 1..... pag. 15

Resumo pag. 17

Introdução e Objetivo..... pag. 20

Revisão de Literatura..... pag. 24

Referências Bibliográficas pag. 42

Capítulo 2..... pag. 62

Abstract..... pag. 64

Introdução..... pag. 66

Material e Método pag. 68

Resultados..... pag. 74

Discussão pag. 81

Conclusão..... pag. 86

Referências Bibliográficas pag. 87

Listas

Lista de Abreviaturas

μg - Micrograma
AA – Ácido aracdônico
ABCZ – Associação Brasileira dos Criadores de Zebu
BE – Benzoato de estradiol
CE – Ciclo estral
CIDR – *Controlled Internal Drug Release*
CL - Corpo lúteo
CLG – Células lúteas grandes
CLP – Células lúteas pequenas
COX – Ciclooxygenase
E₂ – Estradiol
eCG – Gonadotrofina coriônica eqüina
ER – Receptor de estradiol
FD – Folículo dominante
FSH – Hormônio folículo estimulante
GnRH – Hormônio liberador de Gonadotrofinas
IA – Inseminação artificial
IATF – Inseminação artificial em tempo fixo
IM - Intramuscular
IV - Intravenoso
LH – Hormônio luteinizante
mg - Miligrama
mL -Mililitro
OT – Ocitocina
OTR – Receptores de ocitocina
P₄ – Progesterona
PGF_{2α} - Prostaglandina F_{2α}
PGFM - 13,14-diidro 15-ceto prostaglandina F_{2α}
PR – Receptor de progesterona
RTB – Remoção temporária de bezerros
UI – Unidades internacionais
US – Ultra-som

Lista de Figuras

Figura 1. Tratamentos, ultra-sonografia e colheitas de sangue realizadas nos animais do grupo RTB/GPE.....pag. 71

Figura 2. Concentrações plasmáticas de progesterona (média $\pm$ EPM) nos animais com (–, n=7) e sem (–, n=13) “priming” de progesterona entre os dias -20 (D-20) e 18 (D18).....pag. 77

Figura 3. Concentrações plasmáticas de progesterona (média $\pm$ EPM) nos animais sem “priming” de progesterona dos grupos RTB/GPE (n=3), RTB/GPE/eCG (n=4) e RTB/GPG/eCG (n=6) entre os dias -20 (D-20) e 18 (D18).....pag. 77

Figura 4. Concentrações plasmáticas de progesterona (média $\pm$ EPM) nos animais com “priming” de progesterona dos grupos RTB/GPE (n=2), RTB/GPE/eCG (n=3) e RTB/GPG/eCG (n=2) entre os dias -20 (D-20) e 18 (D18).....pag. 78

Figura 5. Concentrações plasmáticas de estradiol (média $\pm$ EPM) nos animais dos grupos RTB/GPE (n=3), RTB/GPE/eCG (n=4) e RTB/GPG/eCG (n=6) antes (0 h) e 6 horas após a administração de BE (grupos RTB/GPE e RTB/GPE/eCG) ou GnRH (grupo RTB/GPG/eCG).....pag. 79

Figura 6. Concentrações plasmáticas de PGFM (média $\pm$ EPM) nos animais com (+, n=7) e sem (–, n=13) “priming” de progesterona, antes (0') e 30 (30') minutos após a administração de ocitocina (OT) entre os dias 9 (D9) e 18 (D18) do protocolo experimental.....pag. 80

Figura 7. Diferença da concentração plasmática de PGFM antes e 30 minutos após a administração de ocitocina, entre os dias 6 (D6) e 18 (D18) do protocolo experimental, nos animais com (n=7) e sem (n=13) “priming” de progesterona.....pag. 80

Figura 8. Frequência de luteólise nos animais com e sem “priming” de progesterona entre os dias 6 (D6) e 18 (D18) após a administração de BE ou GnRH.....pag. 81

Lista de Tabelas

Tabela 1. Taxa de ovulação após a segunda aplicação de GnRH ou após a administração de BE em animais dos grupos RTB/GPE, RTB/GPE/eCG e RTB/GPG/eCG, com (+) e sem (-) “priming” de progesterona.....pag. 74

Tabela 2. Concentrações plasmáticas de progesterona (P_4 , média $\pm$ EPM) 18 dias após a indução da ovulação com BE ou GnRH em animais com (+) ou sem (-) “priming” de P_4pag. 76

Capítulo 1

Resumo

Introdução e Objetivo

Revisão da Literatura

Referências Bibliográficas

RESUMO

Objetivou-se com o presente estudo avaliar, em vacas Nelore no período pós-parto inicial, se o aumento farmacológico nas concentrações plasmáticas de estradiol no período pré-ovulatório e/ou “priming” de progesterona (P_4) precedendo a ovulação, induzida por tratamentos hormonais, seriam capazes de diminuir a liberação de $PGF_{2\alpha}$ induzida pela administração de ocitocina e, conseqüentemente, evitar a lise prematura do corpo lúteo formado após a primeira ovulação. Vacas Nelore lactantes ($n = 30$) foram divididas aleatoriamente em 3 Grupos: RTB/GPE ($n = 10$), RTB/GPE/eCG ($n = 10$) e RTB/GPG/eCG ($n = 10$). Em estágio aleatório (D-8, 40 a 70 dias pós-parto), os animais do grupo RTB (remoção temporária do bezerro, 48 h antes do início dos tratamentos)/GPE (GnRH – Prostaglandina – Benzoato de Estradiol) receberam 50 μ g de um análogo do GnRH (lecirelina, IM, Gestran plus[®]). Sete dias mais tarde (D-1) os animais receberam injeção de um agente luteolítico (250 μ g de d-cloprostenol, IM, Prolise[®]) e no dia 0 (D0) foi administrado 1,0 mg de benzoato de estradiol (BE, IM, Estrogin[®]). No grupo RTB/GPE/eCG os animais, além de serem tratados com o protocolo GPE, receberam 400 UI de eCG (IM, Novormon[®]), logo após a administração do agente luteolítico (D-1). No grupo RTB/GPG/eCG, os animais foram tratados de acordo com o protocolo RTB/GPE/eCG, exceto que no lugar do BE foi administrada uma segunda dose de GnRH (50 μ g de lecirelina, IM) no D0. Em todos os animais foram realizados exames ultra-sonográficos dos ovários (Aloka SSD-500, probe de 7,5 MHZ) e coletas sanguíneas nos dias das aplicações hormonais, com a finalidade de classificar os grupos de acordo com a presença ou ausência de altas concentrações de P_4 (“priming” de P_4) antes da ovulação do folículo dominante. O desafio com ocitocina (OT, 50 UI, IV, Univet[®]) foi realizado em cada vaca 6, 9, 12, 15 e 18 dias após a aplicação de BE (grupos RTB/GPE e RTB/GPE/eCG) ou GnRH (grupo RTB/GPG/eCG) e as amostras de sangue foram colhidas imediatamente antes e 30 minutos após a administração de ocitocina. Utilizou-se ANOVA para estimar os efeitos de tratamento, priming de P_4 e a interação nas variáveis discretas e utilizou-se split-plot ANOVA para estimar os efeitos de tratamento, “priming” de P_4 , dia do

ciclo estral e interações nas variáveis com repetição no tempo. A taxa de ovulação foi de 50% (5/10), 70% (7/10) e 80% (8/10) nos animais dos grupos RTB/GPE, RTB/GPE/eCG e RTB/GPG/eCG, respectivamente. A média das concentrações plasmáticas de P_4 durante o período de sincronização (antes do desafio com ocitocina) foi maior ($P < 0,01$) para as vacas com ($3,70 \pm 0,51$ ng/mL) em comparação às sem “priming” de P_4 ($1,25 \pm 0,11$ ng/mL). Na vacas sem “priming” de P_4 , houve diminuição das concentrações de P_4 no dia 18 ($1,73 \pm 0,29$ ng/mL), em todos os tratamentos. Entretanto, nos animais com “priming” os tratamentos com BE promoveram manutenção de altas concentrações de P_4 ($8,89 \pm 1,27$ ng/mL), enquanto as vacas que receberam GnRH para indução da ovulação apresentaram queda na P_4 ($2,12 \pm 1,05$ ng/mL) no dia 18 (interação tratamento x “priming” de P_4 x dia; $P < 0,01$). A produção de PGFM em resposta à ocitocina aumentou entre os dias 6 e 18 (efeito de dia; $P < 0,01$) e tal aumento tendeu a ser mais pronunciado nos animais sem “priming” de P_4 (efeito de “priming” de P_4 x dia; $P < 0,06$). Conclui-se que: 1) o aumento nas concentrações plasmáticas de estradiol no período pré-ovulatório, induzida por tratamentos hormonais (grupos RTB/GPE e RTB/GPE/eCG), não foi eficiente em inibir a liberação endógena de PGFM, induzida pela administração de ocitocina; 2) em vacas Nelore, em anestro pós-parto, a liberação endógena de PGFM, em resposta ao desafio com ocitocina e a incidência de luteólise prematura, foi menor nos animais “com” em comparação aos “sem priming” de progesterona; 3) nos animais com “priming” de progesterona, os tratamentos com benzoato de estradiol (RTB/GPE e RTB/GPE/eCG) promoveram manutenção de concentrações elevadas de progesterona 18 dias após a indução de ovulação, indicando um possível efeito benéfico da utilização de protocolos hormonais com benzoato de estradiol em animais com “priming” de progesterona.

Introdução e Objetivo

1. Introdução e Objetivo

Os animais de raças zebuínas (subespécie *Bos taurus indicus*, Meirelles et al. 1999) constituem a maior parte do rebanho bovino de corte em regiões de clima tropical, devido à sua maior adaptação aos climas quentes, alta umidade, maior tolerância ao estresse térmico e resistência aos parasitos, em relação aos animais de raças européias (subespécie *Bos taurus taurus*). No Brasil, entre as raças de corte, a Nelore é a que possui o maior contingente numérico (acima de 90 milhões de cabeças, ACNB, 2006).

Um dos principais fatores que determina o sucesso de um programa de inseminação artificial (IA) é a detecção do cio, a qual requer tempo e pessoal adequadamente treinado. Em fêmeas zebuínas, a curta duração do estro (cerca de 11 horas) dificulta a detecção do mesmo e prejudica a implantação de programas convencionais de IA (Barros et al., 1995, Pinheiro et al., 1998, Mizuta, 2003).

A partir do conhecimento detalhado da dinâmica de crescimento folicular (Pierson & Ginther, 1988; Savio et al., 1988; Sirois & Fortune, 1988) tornou-se possível o desenvolvimento de tratamentos hormonais capazes de regular o crescimento folicular e o momento da ovulação, de forma a viabilizar a inseminação artificial com tempo fixo (IATF, ou seja, IA com tempo pré-determinado, sem a necessidade de observar cio) em taurinos (Twagiramungu et al., 1992a,b; Thatcher et al., 1993; Pursley et al., 1994) e zebuínos (Barros et al., 1998, 2000; Fernandes et al., 2001).

Na América do Sul, principalmente no Brasil e na Argentina, a disponibilidade comercial de hormônios esteróides e protéicos, têm permitido o desenvolvimento de protocolos hormonais visando a IATF.

Dentre os vários tratamentos testados para IATF de bovinos de corte, os protocolos com progesterona (P_4) ou progestágenos têm se mostrado eficazes, principalmente no período pós-parto, quando boa parte dos animais se encontra em anestro (revisto por Bó et al., 2003). O tratamento mais usual consiste na administração de benzoato de estradiol (BE; 2,0 mg, IM) no momento da inserção do dispositivo (Dia 0), aplicação de $PGF_{2\alpha}$ quando o dispositivo intravaginal for removido (Dia 8) e 1,0 mg de BE (via IM) 24h mais tarde. A IATF é realizada 30-36 h após a última administração de BE. Portanto,

neste protocolo são utilizados os seguintes hormônios: progesterona-estrógeno-prostaglandina-estrógeno (protocolo PEPE). Ao passo que protocolos mais econômicos, que utilizam o GnRH para sincronizar a onda folicular, como por exemplo o “Ovsynch” (GPG, GnRH-PGF-GnRH, Wiltbank et al., 1996; Pursley et al., 1997; Barros et al., 2000; Fernandes et al., 2001) e uma de suas variações, o protocolo GPE (GnRH-PGF-Estradiol), têm sido usados com menor frequência (Barros et al., 2000; Fernandes et al., 2001).

Um dos maiores obstáculos ao uso do protocolo GPE em bovinos de corte é sua ineficácia em animais em anestro. Acredita-se que após o parto as vacas necessitam de um primeiro contato com a progesterona (“priming”) para que se desenvolva um corpo lúteo com vida funcional normal (Hunter, 1991; Garverick et al., 1992; Yavas & Walton, 2000a,b). Tanto é que na primeira ovulação pós-parto (isto é, sem o “priming” de progesterona) geralmente se forma um corpo lúteo com vida curta, devido à liberação prematura de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio uterino (Peter et al., 1989; Stagg et al., 1998; Yavas & Walton, 2000a,b).

Mais recentemente, Mann e Lamming (2000) propuseram que a vida curta do primeiro CL pós-parto está relacionada ao fato do folículo dominante não produzir elevadas concentrações de estradiol, que seriam responsáveis pela diminuição (“down regulation”) dos receptores de ocitocina no endométrio uterino. Se houver disponibilidade de receptores no endométrio uterino, a interação da ocitocina com os mesmos desencadeará eventos que resultarão na síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no endométrio uterino e lise prematura do corpo lúteo.

Levando-se em consideração a hipótese formulada por Mann & Lamming (2000), o protocolo GPE foi modificado com o objetivo de se induzir, em vacas de corte no período pós-parto, a formação de um folículo dominante capaz de produzir quantidades suficientes de estradiol para promover “down regulation” dos receptores de ocitocina, de forma a evitar a liberação prematura de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Para tanto, o tratamento GPE foi precedido pela RTB durante 48 horas (RTB/GPE), a fim de diminuir o efeito inibitório da amamentação e presença do bezerro na liberação das gonadotrofinas. Além disso, aplicou-se eCG, logo após a administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$, para acelerar o crescimento e maturação

folicular (RTB/GPE/eCG, Souza et al., 2006). Com esta associação de tratamentos espera-se que a quantidade de estradiol endógeno, produzida, sobretudo, pelo folículo dominante, seja suficiente para diminuir (“down regulation”) os receptores endometriais de ocitocina e, conseqüentemente, evitar a lise prematura do corpo lúteo e favorecer a manutenção da prenhez (Souza et al., 2006).

Objetivou-se com o presente estudo avaliar, em vacas Nelore no período pós-parto inicial, se o aumento nas concentrações plasmáticas de estradiol no período pré-ovulatório e/ou “priming” de progesterona precedendo a ovulação, induzida por tratamentos hormonais, seriam capazes de diminuir a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ induzida pela administração de ocitocina e, conseqüentemente, evitar a lise prematura do corpo lúteo formado após a primeira ovulação.

Observação:

A redação da presente dissertação foi realizada em dois capítulos: Capítulo 1, contendo Introdução e Objetivo, Revisão de Literatura e Referências Bibliográficas; Capítulo 2, em formato de Artigo Científico, contendo Introdução e Objetivo, Material e Método, Resultados, Discussão e Conclusões.

Revisão da Literatura

2. Revisão da Literatura

Ciclo Estral Bovino

O ciclo estral (CE) compreende os eventos reprodutivos que ocorrem entre dois períodos de receptividade sexual (cio). As fêmeas bovinas domésticas são poliéstricas, apresentando estro com intervalos regulares médios de 21 dias, até que a prenhez tenha se estabelecido com sucesso. As raças indianas apresentam ciclo estral com variação entre 17 a 24 dias (Mukasa-Murgewa, 1989; Galina & Arthur, 1990; Pinheiro et al., 1998).

O CE é regulado por mecanismos endócrinos e neuro-endócrinos envolvendo, principalmente os hormônios hipotalâmicos (GnRH), hipofisários (LH e FSH) e gonadais (estradiol, progesterona e inibina).

O GnRH é um decapeptídeo sintetizado por células neuroendócrinas na área pré-óptica do hipotálamo e após ser liberado sob a forma de pulsos (Clarke, 1988) atinge a adenohipófise através do sistema porta-hipotálamo-hipofisário, onde determina a secreção das gonadotrofinas LH e FSH.

As gonadotrofinas são glicoproteínas constituídas de uma sub-unidade α comum e uma sub-unidade β distinta. Essas gonadotrofinas são liberadas de maneira pulsátil na circulação sistêmica e atuam nas gônadas regulando a gametogênese e a secreção dos estrógenos gonadais (Stanislaus et al., 1998).

Trabalhos recentes indicam que peptídeos da família RFamide (Messenger et al., 2006; Kriegsfeld, 2006) parecem desempenhar papel fundamental no controle da liberação do GnRH. O kisspeptídeo age diretamente nos neurônios secretores de GnRH, ativando a liberação deste hormônio (Shahab et al., 2005; Han et al., 2005; Gottsch et al., 2004; Kriegsfeld, 2006), enquanto o hormônio inibidor de gonadotrofinas (GnIH) atua bloqueando esta liberação (Anderson et al., 2005; Johnson et al., 2005; Kriegsfeld, 2006). Além disso, existem evidências que estes peptídeos podem mediar a retroalimentação (positiva ou negativa) dos esteróides sexuais na liberação de GnRH. (Smith et al., 2005a,b, 2006; Kriegsfeld, 2006; Dungan, 2006).

O LH, secretado pela adeno-hipófise, é regulado pela P_4 e E_2 ovarianos. Durante a maior parte do CE, ambos hormônios inibem a secreção de LH por meio de retroalimentação negativa sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário

(Goodman & karsch, 1980; Clarke, 1988; Price & Webb, 1988). O LH é liberado sob a forma de pulsos que variam em frequência e amplitude (Rahe et al., 1980; Wright & Malmo, 1992). Após a luteólise, a concentração sérica de P4 diminui a valores inferiores a 1 ng/ml, o que permite o aumento na frequência dos pulsos de LH (Goodman & Karsch, 1980; Karsch, 1987; Wiltbank et al, 2002).

O aumento na frequência de pulsos de LH estimula a maturação do folículo dominante que passa a secretar quantidades crescentes de 17β -estradiol (Ireland & Roche, 1987; Fortune et al., 2001). O E_2 , na ausência de P4, estimula a síntese de receptores para GnRH na hipófise (Schoenemann et al., 1985) tornando-a mais sensível ao GnRH (Kesner et al., 1981) ao mesmo tempo que aumenta a frequência e amplitude dos pulsos de GnRH (Hansel & Convey, 1983) e estimula a síntese de gonadotrofinas, o que resulta no pico de LH (Hurnik, 1987) e consequentemente, na ovulação do folículo de Degraaf (Clarke, 1988; Mukasa-Mugerwa, 1989, Cassar et al., 2002).

Dinâmica Folicular

A foliculogênese bovina é um processo contínuo de crescimento e atresia dos folículos ovarianos (Matton et al., 1981; Woolums & Peter, 1994) que se inicia na vida fetal, passa pela puberdade (Evans et al., 1994) e continua na vida reprodutiva até a senilidade (Hafez, 1993). Este processo esta presente inclusive no período pós-parto que precede a ciclicidade (Roche et al., 1992; Mcdougall et al., 1995) e durante a prenhez (Taylor & Rajamahendram, 1991).

Os folículos encontrados nos ovários de uma fêmea púbere podem ser classificados em: primordiais em repouso (primário); pré-antrais em crescimento (secundários); antrais em maturação (terciários) e folículo pré-ovulatório (Graaf, Woolums & Peter, 1994). Entre os dias 120 e 140 de gestação nos bovinos, as ovogônias do feto se dividem ativamente e cada ovócito é envolvido por uma camada de células somáticas formando os folículos primários (Wandji et al., 1992; Wiltbank et al., 1996).

Quando o folículo adquire duas camadas de células granulosas cubóides, passa a ser denominado de folículo secundário. Ambos são folículos pré-

antrais. O passo seguinte da foliculogênese é a formação do antro, a partir da secreção do fluido folicular pelas células granulosas.

O fluido folicular é um meio de suporte nutricional e de desenvolvimento do ovócito, bem como um veículo no qual o ovócito é transportado para a tuba uterina durante a ovulação (Woolums & Peter, 1994). O fluido é rico em glicoproteínas, tais como a inibina (inibe a secreção de FSH e o crescimento dos folículos subordinados, Dekrester & Robertson, 1989; Rice, 1991); a folistatina (suprime o crescimento folicular) e a activina (estimula a síntese e/ou a liberação do FSH, Xiao et al., 1992).

O processo contínuo de crescimento e regressão dos folículos antrais ovarianos que induz o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório é conhecido como dinâmica de crescimento folicular, enquanto que o padrão de crescimento e atresia de um grupo de folículos ovarianos é denominado onda de crescimento folicular (Lucy et al., 1992). O crescimento folicular em padrão de ondas ocorre em todos os estágios da vida de uma fêmea, como no período anterior à puberdade (Adams et al., 1992), durante a gestação (Ginther et al., 1996b) e no pós-parto (Murphy et al., 1990; Savio et al., 1990a, b).

A dinâmica de crescimento folicular dos bovinos de raças européias (*Bos taurus taurus*) é caracterizada pela presença de duas (Knopf et al., 1989; Ginther et al., 1989) ou três (Ireland & Roche, 1987; Savio et al., 1988; Sirios & Fortune, 1988) ondas de crescimento folicular e, esporadicamente, uma ou quatro ondas (Savio et al., 1988; Sirios & Fortune, 1988; Murphy et al., 1990). Foram demonstrados, em estudos realizados em bovinos zebuínos (*Bos taurus indicus*) da raça Nelore, a predominância de duas ondas de crescimento folicular para vacas e três ondas de crescimento folicular para novilhas (Barros et al., 1995; Figueiredo et al., 1997). Cada onda de crescimento folicular consiste na emergência simultânea de um grupo de 10 a 50 folículos com diâmetro de aproximadamente 2 a 3 mm.

A emergência da onda folicular, também denominada de recrutamento folicular, é estimulada por um aumento transitório do hormônio folículo-estimulante-FSH (Fortune, 1993). Aproximadamente três dias após a emergência folicular, quando o maior folículo atinge o diâmetro médio de 8,5 mm, para *Bos taurus taurus* (Ginther et al., 1996a) e cerca de 6,1 mm para *Bos taurus indicus* (Sartorelli et al., 2005) ocorre o evento denominado de desvio ou

divergência folicular (Ginther et al., 2001), quando um folículo continua a crescer e se torna o folículo dominante (FD), enquanto os demais folículos, denominados folículos subordinados, sofrem atresia (regressão).

Na presença de um CL funcional e de altas concentrações plasmáticas de progesterona, há decréscimo na frequência de pulsos de LH (Roberson et al., 1989). Conseqüentemente, o FD perde a dominância, sofre atresia e falha em ovular (Ginther et al., 1989; Lucy et al., 1992; Stock & Fortune, 1993). Desta forma, e somente por ocasião da luteólise, quando as condições hormonais são favoráveis ($P_4 < 1$ ng/ml), que o folículo dominante responde ao pico de LH e ovular.

O crescimento e a atresia folicular são influenciados por raça (Figueiredo et al., 1997), estágio reprodutivo (Roche & Boland, 1991), época do ano (Badinga et al., 1994), estresse calórico (Wilson et al., 1998), balanço energético (Rhodes et al., 1995) e escore da condição corporal (ECC, Burke et al., 1998).

Regressão Luteal

O corpo lúteo (CL) sofre regressão morfológica e funcional aproximadamente 17 a 20 dias após a ovulação. Este processo, denominado luteólise, é caracterizado pela queda na produção de progesterona e fragmentação dos componentes celulares, incluindo a redução do suporte vascular, proliferação do tecido conjuntivo, desorganização celular, degeneração e fagocitose das células luteais (Milvae et al., 1996).

Nos bovinos e ovinos a lise do corpo lúteo é causada pela liberação de $PGF_{2\alpha}$ proveniente do endométrio (Horton & Poyser, 1975). O sinal hormonal que leva à liberação de $PGF_{2\alpha}$ em quantidades luteolíticas é o estradiol proveniente dos folículos ovarianos. McCracken et al. (1984), propuseram que o E_2 age estimulando a síntese de receptores para ocitocina no endométrio de ovelhas, e que a ocitocina, proveniente do corpo lúteo ou da neurohipófise, estimula a secreção de $PGF_{2\alpha}$. Wathes et al. (1983 e 1984) e Fields et al. (1985 e 1992) confirmaram esta hipótese demonstrando que a ocitocina é de fato secretada pelo corpo lúteo bovino e que interage com receptores

endometriais próprios (Fuchs et al., 1990) para estimular a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Gross et al., 1988; Putney et al., 1989). A $\text{PGF}_{2\alpha}$ é secretada de forma pulsátil pelo endométrio durante o período da luteólise (Shemesh & Hansel, 1975) e atinge o CL ipsolateral por difusão da veia uterina para a artéria ovariana através de um mecanismo de contracorrente (Ginther & Del Campo, 1974; Hixon & Hansel, 1974; Ginther, 1981).

Aproximadamente 98% da $\text{PGF}_{2\alpha}$ produzida é transformada em 13,14 diidro 15-ceto prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ (PGFM) na primeira passagem pelos pulmões (Piper et al., 1970). Dessa forma, a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ é geralmente mensurada, *in vivo*, através da PGFM. A concentração basal de PGFM em vacas durante a fase luteínica varia entre 10 e 100 pg/ml. No momento da luteólise, a PGFM é produzida em picos com durações variando entre 2 a 5 horas, espaçados por intervalos que duram de 2 a 30 horas, durante um período de 2 a 3 dias (Nancarrow et al., 1973; Thorburn et al., 1973; Peterson et al., 1975; Kindahl et al., 1976; Fredrickson et al., 1984; Danet-Desnoyers et al., 1995), atingindo concentrações plasmáticas de 150 a 500 pg/ml (Kindahl et al., 1976; Kotwica et al., 1998; Oyedipe et al., 1984). Em ovelhas ocorre uma série de pulsos que duram 1 hora e ocorrem em intervalos de aproximadamente 6 a 9 horas (McCracken et al., 1973; Barcikowski et al., 1974).

Experimentos realizados tanto “*in vivo*” quanto “*in vitro*” demonstraram que a administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ promove vários efeitos: decréscimo no fluxo sanguíneo (Nett et al., 1976), alterações na atividade das enzimas esteroidogênicas (Caffrey et al., 1979; Rao et al., 1984), alterações na conformação da cromatina nuclear (Chegini et al., 1991), diminuição no número de células lúteas pequenas (CLP, Braden et al., 1988), liberação de ocitocina luteal (Flint & Sheldrick, 1982), decréscimo da prostaciclina luteal (Milvae & Hansel, 1983), ativação do sistema fosfolipase C, aumento do inositol trifosfato e do cálcio intracelular (Davis et al., 1988; Alila et al., 1989; Duncan & Davis, 1991) e alterações na atividade da proteína kinase C (Orwig et al., 1994).

As células lúteas grandes (CLG) possuem maior número de receptores de alta afinidade para $\text{PGF}_{2\alpha}$ em sua membrana plasmática que as CLP (Powell et al., 1976; Wiltbank et al., 1995). A observação de Davis et al. (1988), que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ aumenta a atividade da enzima fosfolipase C tanto nas CLP quanto nas

CLG sugere que as CLP podem ter receptores suficientes para responder à $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Rodgers, 1990).

Até recentemente, os mecanismos luteolíticos descritos para ovinos e bovinos eram idênticos. Entretanto, Okuda et al. (2002) demonstraram que, embora nos ruminantes a $\text{PGF}_{2\alpha}$ pulsátil é gerada pelo mecanismo de retroalimentação positiva entre ocitocina luteínica e/ou hipofisária e $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina, o endométrio bovino pode possuir outros mecanismos para a iniciação da liberação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ luteolítica. Kotwica e colaboradores (1997) demonstraram que o bloqueio dos receptores de ocitocina através de um antagonista específico (CAP-527) não impediu a ocorrência da secreção pulsátil de $\text{PGF}_{2\alpha}$ nem da luteólise, comparando-se com os animais controle.

Em 1998, Kotwica e colaboradores relataram que durante a luteólise espontânea em bovinos somente 54% das pulsações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estavam associadas a pulsações de ocitocina. Ainda assim acredita-se que a ocitocina atue de forma a modular a amplitude dos pulsos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante a luteólise em bovinos (Kotwica et al., 1998, 1999; Okuda et al., 2002).

A progesterona (P_4) regula a luteólise de diferentes formas. A exposição prolongada à P_4 promove o acúmulo de ácido araquidônico (AA) e ciclooxigenase (COX), elementos essenciais à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Silvia et al., 1991; Goff, 2004). Segundo Garret et al. (1988), a suplementação com P_4 no início do ciclo estral promove redução na duração do ciclo estral, provavelmente devido a um acúmulo precoce de AA e COX no endométrio, causando secreção prematura de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Entretanto, até a segunda metade do ciclo estral, a P_4 exerce efeito supressivo à secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Silvia et al., 1991). Esse efeito supressivo é devido à ação inibitória da P_4 na expressão do gene dos OTR (Fuchs et al., 1990; Mann & Lamming, 1994) e bloqueadora ao E_2 (Mccracken et al., 1999).

Villa-Godoy et al. (1985) demonstraram a importância do E_2 na regulação da luteólise ao observarem, após a remoção dos folículos ovarianos, maior duração do ciclo estral. Além disso, Hixon & Flint (1987) observaram que a administração do E_2 na metade da fase luteal eleva as concentrações plasmáticas de PGFM, dando início à luteólise, possivelmente através da elevação das concentrações de OTR endometriais. Esse efeito do E_2 é

dependente da P_4 , pois é observado somente após o endométrio ter sido previamente exposto ("priming") à P_4 (Lafrance & Goff, 1988; Lamming & Mann, 1995a). Outro fator determinante na regulação dos OTR pelo E_2 é a sua concentração plasmática. Após a metade da fase luteal, as concentrações dos receptores de E_2 (ER) aumentam, possivelmente devido a uma "up regulation" pelo E_2 de seus próprios receptores endometriais (Xiao & Goff, 1999), elevando conseqüentemente as concentrações de OTR. Já nos momentos que antecedem a ovulação, altos níveis de E_2 secretados pelo folículo ovulatório resultam no decréscimo das concentrações dos OTR ("down regulation"), produzindo uma situação de ausência de resposta do endométrio à OT nos primeiros dias do ciclo estral (Lamming & Mann 1995a,b).

De acordo com estes dados, a regulação dos receptores de ocitocina (OTR) pode ocorrer de três formas diferentes no decorrer do ciclo estral: 1) na fase inicial, quando a P_4 ainda é baixa, os OTR encontram-se em baixas concentrações devido à "down regulation" causada pelos altos níveis de E_2 pré-ovulatório (Mann & Lamming, 2000); 2) na metade da fase luteal, quando a "down regulation" do E_2 possivelmente não exerce mais influência, a P_4 encontra-se em níveis mais elevados e inibe a expressão dos OTR endometriais (McCracken et al., 1999; Goff, 2004; Silvia et al., 1991); 3) no final da fase luteal, os receptores de progesterona sofrem "down regulation" e o folículo dominante secreta E_2 em concentrações intermediárias, propiciando a expressão dos OTR no endométrio e permitindo o estímulo da OT à secreção de $PGF_{2\alpha}$ (McCracken et al., 1999; Goff, 2004; Silvia et al., 1991).

Fase Folicular

A fase folicular tem início após a luteólise induzida pela $PGF_{2\alpha}$ com conseqüente queda nos valores séricos de P_4 (<1 ng/ml) entre 24 e 36 após o início da luteólise, seja ela natural ou induzida por $PGF_{2\alpha}$ exógena (Dieleman et al., 1986). O incremento na frequência de pulsos de LH estimula a maturação do folículo dominante que secreta quantidades crescentes de E_2 induzindo o comportamento estral (Clarke, 1988; Mukasa-Mugerwa, 1989).

O cio é caracterizado pelo comportamento sexual, onde a fêmea permite ser montada (Blockey, 1980; Esslemont et al., 1980). Entretanto, existem outros sinais como muco vaginal abundante, edema vulvar, micção freqüente, inquietação, monta em outras companheiras, queda na produção de leite, perda de apetite e afastamento do rebanho, que auxiliam na identificação do animal em cio (Hafez, 1993). A simples observação diária do comportamento sexual de vacas e novilhas permite a identificação do cio, entretanto, a freqüência (2 a 4 vezes ao dia) e o tempo (15 a 60 minutos) despendido nesta observação influenciam na acurácia da detecção do cio (Vaca et al., 1985).

Nas raças européias (*Bos taurus*) o cio dura cerca de 16 a 18 horas e a ovulação ocorre, em média, entre 28 e 31 h após o início do cio (Escobedo et al., 1989; Galina & Arthur, 1990; Stock & Fortune, 1993), ou seja, entre 10 e 12 horas após o final do cio (Hansel & Echterkamp, 1972; Wishart, 1972; Hunter & Wilmut, 1984). Por outro lado, em zebuínos, a receptividade sexual é, em média, de apenas 11 horas (Mukasa-Mugerwa, 1989; Galina & Arthur, 1990), podendo variar de 1,3 a 20 horas (Mukasa-Mugerwa, 1989; Galina & Arthur, 1990).

Pinheiro et al. (1998), utilizando a técnica de ultra-sonografia, verificaram que o intervalo entre início do cio e a ovulação era de $26,6 \pm 0,44$ horas e a duração do cio de aproximadamente 11 horas em vacas Nelore, com estro natural ou induzido por tratamentos hormonais. Estes resultados foram confirmados por Mizuta (2003), utilizando o sistema Heat-Watch para detectar o estro e a ultra-sonografia para observar a ovulação. Além dos zebuínos apresentarem estro de menor duração em relação às raças européias, existe uma elevada incidência de estro no período noturno (30 a 50%), o que dificulta ainda mais a detecção do estro nos zebuínos (Pinheiro et al., 1998).

Fase Lútea

O pico pré-ovulatório de LH estimula o crescimento e a maturação folicular, a ovulação e a formação do corpo lúteo (CL). O CL é uma glândula temporária cuja função é o elemento chave para muitos processos reprodutivos, incluindo a ovulação, o comprimento do ciclo estral, o reconhecimento da gestação e a sobrevivência embrionária em todas as

espécies de mamíferos (Estergreen et al., 1967; Niswender et al., 1994; Milvae et al., 1996).

O folículo contém uma camada avascular de células granulosas envolvidas por uma membrana basal, uma camada de células da teca interna e outra da teca externa. Na ovulação, a membrana basal se rompe e o ovócito junto com o fluido folicular é eliminado criando uma cavidade para o desenvolvimento do CL a partir das células da teca interna e da granulosa que invadem a cavidade folicular, onde crescem (hipertrofia) e se dividem (hiperplasia) formando as CLP e as CLG, respectivamente (Milvae et al., 1996). Esta transformação das células da teca interna e da granulosa é referida como luteinização e representa o estágio final de desenvolvimento destas células. O crescimento do CL é muito rápido e seu peso aumenta em até 6 vezes na primeira metade do CE (Zheng et al., 1994). O LH é o fator luteotrófico mais importante na vaca (Hansel & Convey, 1983; Niswender et al., 1994).

Em bovinos, as CLP e as CLG variam de 12 a 22 μm e de 25 a 50 μm de diâmetro, respectivamente (Alila & Hansel, 1984; Fields et al., 1992). No início do CE as CLG se desenvolvem a partir das células da granulosa, porém nos estágios finais do CE e durante a gestação podem se desenvolver a partir das CLP (Hansel et al., 1987). As CLG produzem mais progesterona por célula que as CLP, porém as CLP possuem maior quantidade de receptores para LH e por isto, respondem mais intensamente ao LH na secreção de progesterona que as CLG (Fitz et al., 1982). Além disso, as CLG produzem ocitocina, a qual tem papel importante na luteólise dos ruminantes (Wathes et al., 1983 e 1984; Fields et al., 1985 e 1992).

Na fase luteínica o CL produz progesterona em quantidades crescentes do 4º ao 10º dia do CE, e a secreção se mantém estável até que ocorra a luteólise, em torno do 15º ao 20º dia (Luque et al., 1983, Hafez, 1993).

Anestro pós-parto em fêmeas bovinas

Anestro pós-parto é o período de completa inatividade sexual que se estende desde o parto até o aparecimento do primeiro estro, caracterizado por ausência de manifestação de cio. Neste período, também conhecido por

puerpério, ocorre a involução uterina e o restabelecimento da atividade ovariana (Hafez, 1993).

A duração do anestro pós-parto é influenciada, principalmente, pela amamentação e nutrição, embora outros fatores, como a estação do ano, idade e raça da vaca, número de partos, presença de touros (Short et al., 1990), estresse, partos gemelares, distocia e retenção de placenta (Yavas & Walton, 2000a) também influenciem na duração do anestro. Segundo Yavas & Walton (2000a), o período pós-parto seria o período de transição durante o qual a funcionalidade do eixo hipotálamico-hipófisario-gonadal-úterino se recupera da gestação anterior.

A pulsatilidade e a concentração sangüínea de FSH aumentam logo após o parto, por volta do quarto dia (Williams et al., 1983) e posteriormente mantém padrão semelhante a vacas cíclicas (Williams et al., 1982). A secreção de FSH requer uma estimulação mínima de GnRH e sua liberação é controlada principalmente por efeito de retroalimentação dos esteróides ovarianos. Como a secreção de GnRH não é totalmente suprimida, a retomada precoce dos pulsos de FSH ocorre devido à baixa frequência inicial dos pulsos de GnRH, enquanto que, os pulsos de LH reiniciam relativamente mais tarde no pós-parto, quando a frequência dos pulsos de GnRH aumenta (Lamming et al., 1981). O padrão pulsátil de liberação do LH pós-parto se caracteriza por baixa frequência, menos de um pulso de LH a cada quatro horas (Williams et al., 1983). Essa frequência aumenta durante o período imediatamente anterior a ovulação até aproximadamente um pulso de LH a cada uma ou duas horas (Schallenberger, 1985).

Nas primeiras três semanas após o parto ocorre o início do crescimento de ondas foliculares, a involução uterina e a reposição dos estoques hipofisários de LH. A liberação de FSH e desenvolvimento de FD iniciam logo após o parto, porém esses folículos não atingem a maturação final, um pré-requisito para a ovulação, devido à ausência de pulsos apropriados de LH, desta forma, os folículos tornam-se atrésicos (Yavas & Walton, 2000a).

Primeira ovulação pós-parto

A formação do primeiro FD ocorre geralmente de dez a doze dias pós-parto em vacas de corte e de leite (Murphy et al., 1990; Savio et al., 1990a; Stagg et al., 1995). Em vacas de corte com bezerro ao pé a ciclicidade geralmente é restabelecida dentro de 35 a 60 dias pós-parto em animais que apresentam ECC adequados podendo, este período, se estender em condições desfavoráveis (Yavas & Walton, 2000b). Na grande maioria das vezes a primeira ovulação pós-parto é seguida por um ciclo curto e não é precedida pela manifestação de estro (Savio et al., 1990a; Murphy et al., 1990; Stagg, 1995; Looper et al., 1997), devido ao fato da capacidade do FD produzir estradiol ser limitada durante o período de anestro pós-parto (Spicer et al., 1986).

Em vacas de corte com bezerro ao pé observou-se que apenas 10% dos animais ovularam o FD da primeira onda de crescimento folicular (Murphy et al., 1990) e a maior parte dos animais apresentam duas a três ondas de crescimento folicular antes da primeira ovulação (Stagg, 1995; Henao et al., 2000).

A fase luteal, após a primeira ovulação pós-parto geralmente tem duração de 8 a 12 dias, independente se foi espontânea (Looper et al., 1997) ou induzida por desmame precoce, GnRH ou hCG (Short et al., 1990). O ciclo curto é composto por uma única onda de crescimento folicular, CL de diâmetro menor e baixas concentrações circulantes de progesterona quando comparado ao um ciclo estral normal (Yavas & Walton, 2000b).

Stagg et al. (1998) observaram a ocorrência de ciclos curtos (< 16dias) após a primeira ovulação em 85% das vacas, 12% das vacas tiveram ciclos de duração normal (18-24 dias) e 3% de ciclos longos (>24dias). Quando compararam vacas inseminadas, na primeira ovulação pós-parto, com vacas inseminadas após o primeiro estro, precedido de um ciclo curto, observaram taxas de concepção de 41 e 76% ($p<0,05$), respectivamente.

A regressão prematura do CL, após a primeira ovulação pós-parto, ocorre devido à liberação precoce de $\text{PGF}_2\alpha$ pelo endométrio uterino, devido à maior concentração de receptores de ocitocina neste tecido em animais que apresentam ciclo curto (Zollers et al., 1993). A exposição previa a altos níveis

de progesterona diminui o número dos receptores de ocitocina no endométrio e previne o ciclo curto (Zollers et al., 1993). Acredita-se que, após o parto, as vacas necessitem de um primeiro contato com a progesterona (“priming”) para que se desenvolva um corpo lúteo com vida funcional normal (Hunter, 1991; Garverick et al., 1992; Yavas & Walton, 2000b).

Mais recentemente, Mann & Lamming (2000) propuseram que a vida curta do primeiro CL pós-parto está relacionada ao fato do folículo dominante não produzir elevadas concentrações de estradiol, que seriam responsáveis pela diminuição dos receptores de ocitocina no endométrio uterino. Se houver disponibilidade de receptores de ocitocina no endométrio uterino, a interação da ocitocina com os mesmos resultarão na síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no endométrio uterino e lise prematura do corpo lúteo.

Sincronização da ovulação

No final de década de oitenta, quando o advento da ultra-sonografia permitiu a caracterização do desenvolvimento folicular bovino, Thatcher et al. (1989) e Macmillan & Thatcher (1991), utilizaram um análogo do GnRH para alterar a dinâmica de crescimento folicular e forneceram a base para o desenvolvimento de um novo sistema de sincronização da ovulação.

Brown & Reeves, (1983) e Ireland et al. (1990), demonstraram a ausência de receptores para GnRH no ovário bovino. Posteriormente descobriu-se que o GnRH e seus análogos agem indiretamente induzindo a liberação de LH e FSH que promovem o desenvolvimento dos folículos ovarianos e do corpo lúteo (Conn & Crowley, 1990). A administração do GnRH aumenta os níveis plasmáticos de LH e FSH dentro de 2 a 4 horas (Chenault et al., 1990; Rettmer et al., 1992; Stevenson et al., 1993).

Quando administrado em estágios aleatórios do ciclo estral, o GnRH causa a ovulação do folículo dominante e induz a emergência de uma nova onda de crescimento folicular dentro de 2 a 3 dias após o tratamento (Thatcher et al., 1989; Guilbault et al., 1990; Macmillan & Thatcher, 1991; Twagiramungu et al., 1994; Pursley et al., 1995; Kastelic & Mapletoft, 1998). Assim, os animais apresentam homogeneidade no estágio de desenvolvimento dos folículos ovarianos no momento da indução da luteólise. Consequentemente, a precisão

na determinação do cio (Twagiramungu et al., 1992a,b; Thatcher et al., 1993) e a sincronização do pico de LH entre os animais são melhorados significativamente.

É relatado por vários autores que, a administração de GnRH, seguida 6 ou 7 dias após pela injeção de $\text{PGF}_{2\alpha}$, é um sistema eficaz para a sincronização do cio e resulta em boa fertilidade (taxa de concepção entre 65 e 85%, Guilbault et al., 1991; Twagiramungu et al., 1992b; Thatcher et al., 1993; Wolfenson et al., 1994). O intervalo de 6 a 7 dias entre o GnRH e a $\text{PGF}_{2\alpha}$, permite tempo suficiente para a maturação e responsividade do novo CL à $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Wiltbank et al., 1996).

A administração de uma segunda dose de GnRH 1 a 2 dias após a $\text{PGF}_{2\alpha}$ sincroniza o momento da ovulação e os animais, tanto de raças européias (Pursley et al., 1995; Twagiramungu et al., 1995; Burke et al., 1996) quanto de zebuínas (Barros et al., 1998; Barros et al., 2000; Fernandes et al., 2001), podem ser inseminados com horário predeterminado. O GnRH injetado 24 ou 48 horas após a $\text{PGF}_{2\alpha}$ concentra as ovulações dentro de um período de 8 a 12 horas o que permite a realização da IA com tempo fixo 16 a 24 horas após a segunda dose de GnRH (Pursley et al., 1994, 1995, 1997; Wiltbank et al., 1996; Burke et al., 1996, Barros et al., 2000; Fernandes et al., 2001). Esta seqüência de tratamentos hormonais (GnRH-PGF-GnRH), que permite a inseminação artificial em tempo fixo, passou a ser conhecida como protocolo "ovsynch".

Uma forma de diminuir o custo do protocolo GPG é substituir a segunda dose de GnRH por benzoato de estradiol (BE, 1,0 mg para vacas e 0,75 mg para novilhas; via IM, Protocolo GPE). Neste caso, após a luteólise induzida pela $\text{PGF}_{2\alpha}$, o BE, por meio de retroalimentação positiva no hipotálamo/hipófise, induz o pico pré-ovulatório de LH cerca de 40 a 44 h após sua administração, ou seja, cerca de 10 a 12 horas mais tarde do que quando se utiliza GnRH (Barros et al., 2000). Portanto, os animais devem ser inseminados, sem observação de cio, 30 a 36 horas após a aplicação de BE.

O protocolo GPE foi tão eficiente quanto o GPG em sincronizar a ovulação de vacas Nelore ciclando, resultando em taxas de prenhez de 40 a 45% após uma única inseminação com tempo fixo (Barros et al., 2000; Fernandes et al., 2001). Entretanto, quando os protocolos GPG ou GPE foram testados em vacas em

anestro, as taxas de prenhes após a IATF foram bem mais baixas: 14,9% no grupo GPG (n = 67) e 19,1 % no GPE (n = 68). Portanto, estes tratamentos não foram efetivos em animais em anestro e devem ser utilizados somente em vacas que estão ciclando (Fernandes et al., 2001). Além disso, as taxas de prenhez em novilhas (entre 21 e 43%) geralmente são menores do que as observadas em vacas (de 41 a 48%) após a utilização destes protocolos (Fernandes et al., 2001; Williams et al., 2002).

Dentre os vários tratamentos testados para IATF de bovinos de corte, os protocolos com progesterona ou progestágenos têm se mostrado eficazes, principalmente no período pós-parto, quando boa parte dos animais se encontra em anestro (revisto por Bó et al., 2003). A ação da progesterona na sincronização do ciclo estral em bovinos tem sido relatada há décadas (Lamond, 1964; Gordon, 1976). Os animais recebiam doses diárias de progesterona por períodos de até 20 dias. Estes tratamentos resultavam em altas taxas de sincronização do estro, no entanto apresentavam baixa fertilidade, além de serem pouco práticos (Macmillan e Peterson, 1993). Com o passar do tempo foram desenvolvidos métodos mais práticos de administração de progesterona com a utilização de dispositivos (intravaginais ou auriculares) liberadores de progesterona/progestágenos (Bo et al., 2003; Barros & Ereno, 2004; Baruselli et al 2004).

Bó e colaboradores (1995, 2003) demonstraram que a associação de estrógenos a dispositivos que liberam progesterona/progestágeno promove atresia do folículo dominante e induz a emergência de uma nova onda de crescimento folicular cerca de 4 dias após a aplicação destes esteróides . A regressão do CL é alcançada pela aplicação de estradiol no início do tratamento ou pela administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no momento da remoção do implante. Esta possibilidade de sincronizar a onda de crescimento folicular por meio do uso concomitante de progesterona/progestágenos e estrógenos possibilitou o desenvolvimento de vários protocolos hormonais, especialmente úteis para realização de IATF em animais que se encontram em anestro e, portanto, não respondem bem a protocolos que não utilizam progesterona exógena (Bo et al., 2003; Barros & Ereno, 2004; Baruselli et al., 2005).

Uso da gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) na IATF

A eCG é uma gonadotrofina glicoproteica produzida pela placenta de eqüinos durante a gestação (Combarnous, 1992). Apresenta em sua estrutura duas cadeias, a “ α ”, idêntica em todas as gonadotrofinas existentes e a β , diferente entre elas, sendo esta última responsável pela ação de cada gonadotrofina (Combarnous, 1992). Na égua, a eCG estimula a formação das glândulas luteais acessórias para auxiliarem na manutenção da gestação (Lunn; Vagnani; Ginther, 1996).

Quando administrada em outras espécies, a eCG se liga aos receptores de FSH e de LH, sendo a única gonadotrofina capaz de ligar simultaneamente aos receptores de LH e FSH em mamíferos, exceto nos eqüinos (Murphy & Martinuk, 1991). Nos bovinos essa gonadotrofina apresenta longo tempo de ação variando de 50 a 100 horas devido à proporção de ácido siálico (10 a 15%) presente na sua molécula (Schams et al., 1978 apud Kuran; Hutchinson; Broadbent, 1996).

A eCG estimula o crescimento folicular através de sua ação FSH e LH, aumenta a taxa de ovulação e a concentração plasmática de progesterona no diestro do ciclo subsequente a IATF, por se ligar aos receptores de LH no CL (Stewart & Allen, 1981), proporcionando melhor desenvolvimento embrionário e manutenção da gestação (Marques et al., 2003; Sá Filho et al., 2004). Cavalieri et al. (1997) observaram melhor sincronização da ovulação, quando administraram 400 UI de eCG na retirada do implante de norgestomet. De forma semelhante, Sá Filho et al. (2004) verificaram que o uso da eCG em protocolos de IATF, após a retirada do implante auricular de progestágeno, aumenta o diâmetro máximo do folículo dominante, além de aumentar as taxas de ovulação e concepção.

A utilização da eCG em programas de IATF pode ser útil em vacas de corte amamentando, com baixa condição corporal (Roche et al., 1992), vacas tratadas precocemente no período pós-parto (Rossa, 2002), com alta incidência de anestro (Bó et al., 2003) e com baixa taxa de ciclicidade (Baruselli et al., 2004), mas pode ser desnecessária em vacas ciclando ou com boa condição corporal (Kastelic et al., 1999; Pinheiro, et al., 2006).

Remoção Temporária de Bezerros (RTB)

A remoção temporária de bezerros tem sido utilizada como um artifício para incrementar as taxas de sincronização da ovulação em protocolos de IATF.

Stagg et al. (1998) sugeriram que o comportamento maternal é mais importante que o ato da sucção em si para regular a frequência de pulsos de LH. A percepção inguinal do bezerro pela vaca durante a sucção, aumenta a sensibilidade do centro gerador de pulsos de GnRH no hipotálamo ao efeito de retroalimentação negativa do 17β -estradiol ovariano, pela liberação de peptídeos de opióides endógenos pelo hipotálamo (Stevenson et al., 1994), ocasionando a supressão da liberação de pulsos de LH, falha no desenvolvimento final do FD e da ovulação, proporcionando a manutenção do anestro pós-parto. O efeito supressivo da amamentação parece influenciar a duração do período pós-parto do momento que os estoques de LH hipofisário se recompõem (15 a 30 dias pós-parto) até aproximadamente 45 dias pós-parto. O desmame ou as interrupções temporárias da amamentação possuem pouca influência sobre o intervalo pós-parto quando praticadas fora desse período (Yavas & Walton, 2000b).

Williams et al., (1983) verificaram aumento nos pulsos de LH em vacas que tiveram os bezerros removidos por 48 horas comparadas aquelas que ficaram juntas com seus bezerros ($3,0 \pm 0,6$ vs. $1,2 \pm 0,3$ pulsos em 6 horas, respectivamente).

Meneghetti et al., (2001) observaram que a RTB por 48 horas proporcionou aumento do maior folículo ovariano, e por sua vez o diâmetro do maior folículo influenciou a taxa de ovulação nos animais que sofreram estímulo exógeno (GnRH) para ovulação (85,4 vs. 51,0%, para os grupos com ou sem RTB, respectivamente). Quintans et al. (2002), relataram taxa de ovulação de 33% ($n = 9$) e 66% ($n = 9$) após RTB por 96 h e 144 h, respectivamente. A RTB, juntamente com a administração de GnRH, foi eficiente em induzir a ovulação (100%, $n=12$).

Vasconcelos et al. (2004) utilizaram a RTB, em vacas Nelore lactantes, antes da inserção do implante intravaginal de progesterona e da primeira aplicação de GnRH (D0) e voltaram a utilizar a RTB após a retirada do implante (D7) até o momento da IATF e segunda dose de GnRH (D9). Observaram

interação ($p < 0.05$) entre ciclicidade e a RTB; nas vacas ciclando a RTB diminui a taxa de concepção (29.9% vs. 61.0%). Porém, nos animais em anestro pós-parto a RTB melhorou a taxa de concepção (53.8% vs. 35.3%).

A condição corporal (Alberio et al., 1984), a idade dos bezerros no ato da separação (Bonavera et al., 1990) e estágio do desenvolvimento folicular (Sinclair et al., 2002) são fatores que estão envolvidos na variabilidade de resposta da remoção temporária dos bezerros.

Referências Bibliográficas

- ADAMS, G. P., MATTERI, R. L., KASTELIC, J. P., KO, J. C. H., GINTHER, O. J. Association between surges of FSH and emergence of follicular waves in heifers. **J. Reprod. and Fertil.**, Cambridge, v.94, p.177-88, 1992.
- ALBERIO, R.H., BUTLER, H.M., PALMA, G., SCHIERSMANN, G., ALGORTA, D., ORTIZ, A. Reproductive behaviour and fertility after a temporary weaning in multiparous beef cows with different body condition. **Rev. Arg. Prod. Anim.**, v.4 (5), p.555–566, 1984.
- ALILA, H.W., HANSEL, W. Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific mononuclear antibodies. **Biol. Reprod.**, v.31, p.1015-25, 1984.
- ANDERSON, G.M., STEYN, F.J., TSUTSUI, K., UKENA, K., BENTLEY, G.E., HERBISON, A.E. Is there a gonadotrophin-inhibitory hormone system in mammals? **Soc. Neurosci. HH12**, 2005.
- ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES DE NELORE DO BRASIL – ACNB, <http://www.nelore.org.br>
- BADINGA, L., THATCHER, W.W., WILCOX, C.J., MORRIS, G., ENTWISTLE, K., WOLFENSON, D. Effect of season on follicular dynamics and plasma concentrations of estradiol 17 β , progesterone and luteinizing in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, New York, v.42, n. 8, p.1263-1274, 1994.
- BARCIKOWSKI, B., CARLSON, J.C., WILSON, L. The effect of endogenous and exogenous estradiol-17beta on the release of prostaglandin F2alpha from the ovine uterus. **Endocrinology**, v. 95, n.5, p. 1340-1349, 1974.
- BARROS, C.M., MOREIRA, M.B.P., FIGUEIREDO, A.R., TEIXEIRA, A.B., TRINCA, L.A. Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using GnRH, PGF₂ α and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v.53, p.1121-1134, 2000.
- BARROS, C.M., ERENO, R.L. Avanços em tratamentos hormonais para inseminação artificial com tempo fixo (IATF) em bovinos de corte. **Act. Sci. Veter.**, supl.32, p.23-34, 2004.
- BARROS, C.M., MOREIRA, M.B.P., FERNANDES, P. Manipulação farmacológica do ciclo estral para melhorar programas de inseminação artificial ou de transferência de embriões. **Arq. Fac.Vet.**, UFRGS, supl.26, p.179-89, 1998.

BARROS, C.M., FIGUEIREDO, R.A., PINHEIRO, O.L. Estro, ovulação e dinâmica folicular em zebuínos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.19, p. 9-22, 1995.

BARUSELLI, P.S., BO, G.A., REIS, E.L., MARQUES, M.O., SÁ FILHO, M.F. Introduction de la IATF em el manejo reproductivo de rebaños de ganado de engorde em Brasil. **Congreso Internacional de Reproducción Bovina**, Bogotá – Colombia, p. 125-127, 2005.

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

BLOKEY, M.A. Sheep and cattle mating behavior. **Ver. Rural. Sci.**, v.4, p.53-62, 1980.

BO, G.A., BARUSELLI, P.S., MARTINEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in Bos Indicus cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v.78, p.307-326, 2003.

BO, G.A., ADAMS, G.P., CACCIA, M., MARTINEZ, M., PIERSON, R.A., MAPLETOFT, R.J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v.39, p.193-204, 1995.

BONAVERA, J.J., SCHIERSMANN, G.C.S., ALBERIO, R.H., MESTRE, J. A note on the effects of 72-hour calf removal and/or bull exposure upon postpartum reproductive performance of Angus cows. **Anim. Prod.**, v.50, p.202–206, 1990.

BRADEN, T., BAMBONI, F., NISWENDER, G.D. Effects of PGF₂ α -induced luteolysis on the populations of cells in the ovine corpus luteum. **Biol. Reprod.**, v.39, p.245-53, 1988.

BROWN, J.L., REEVES, J.J. Absence of specific luteinizing hormone realising hormone receptors in ovine, bovine and porcine ovaries. **Biol. Reprod.**, v. 29, p.1179-84, 1983.

BURKE, J.M., HAMPTON, J.H., STAPLES, C.R., THATCHER, W.W. Body condition influences maintenance of a persistent first wave dominant follicle in dairy cattle. **Theriogenology**, New York, v.49, n.4, p.751-760, 1998.

BURKE, J.M., DE LA SOTA, R.L., RISCO, C.A., STAPLES, C.R., SCHIMITT, E.J.P., THATCHER, W.W. Evaluation of timed insemination using a

gonadotropin-releasing hormone agonist in lactating dairy cows. **J. Anim. Sci.**, v.79, p.1385-93, 1996.

CAFFREY, J., NETT, T.M., ABEL, J., NISWENDER, G.R. Activity of 3- β -hydroxy- Δ^4 steroids dehydrogenase/ Δ^4 Δ^5 -isomerase in the ovine corpus luteum. **Biol. Reprod.**, v.20, p.279-87, 1979.

CASSAR, C.A., DOW, M.P.D., PURSLEY, J.R., SMITH, G.W. Effect of the prevulatory LH surge on bovine follicular progesterone receptor mRNA expression. **Dom. Anim. Endocrinol.** v.22, p.179-187, 2002.

CAVALIERI, J., RUBIO, L., KINDER, J.E., ENTWISTLE, K.W., FITSPATRICK, L.A. Synchronization of estrus and ovulation and associated endocrine changes in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v.47, p.801-814, 1997.

CHEGINI, N., LEI, Z.M., RAO, C.V. Nuclear volume and chromatin conformation of small bovine luteal cells effect of gonadotropins and prostaglandins and dependence on luteal phase. **Cell Tissue Res.**, v.264, p.453-60, 1991.

CHENAULT, J.R., KRATZERT, D.D., RZEPKOWSKI, R.A., GOODWIN, M.C. LH and FSH response of Holstein heifers to fertirelin acetate, gonadorelin and buserelin. **Theriogenology**, v.34, p.81, 1990.

CLARKE, J.J. GnRH secretion. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 5, 1988. *Anais* Dublin. 1988. p.1-9.

COMBARNOUS, Y. Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. **Endocrine Reviews**, v.13, n.4, p.670-691, 1992.

CONN, P.M., CROWLET, W.F., JR. Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. **N. Engl. J. Med.**, v.323, p.56, 1990.

CUTAIA, L., TRÍBULO, R., MORENO, D., BÓ, G.A. Pregnancy rates in lactating beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and equine chorionic gonadotropin (eCG). **Theriogenology**, v.59, p.216 (abstract), 2003.

DANET-DESNOYERS, G., MEYER, M.D., GROSS, T.S., JOHNSON, J.W., THATCHER, W. W. Regulation of endometrial prostaglandin synthesis during early pregnancy in cattle: effects of phospholipase and calcium in vitro. **Prostaglandins**, v. 50, p. 313-330, 1995.

- DAVIS, J., ALILA, H.W., WEST, L.A., CORRADINO, R.A., HANSEL, W. Acute effects of PGF₂ α on inositol lipid hydrolysis in the large and small cells of the bovine corpus luteum. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.58, p.43-50, 1988.
- DEKRESTER, D.M., ROBERTSON, P.M. The isolation and physiology of inhibin and related proteins. **Biol. Reprod.**, v.40, p.33-47, 1989.
- DIELEMAN, S.J., BEVERS, M.M., VAN TOL, H.T.M., WILLEMSE, A.H. Peripheral plasma concentrations of estradiol, progesterone, cortisol, LH and prolactin during the estrous cycle in the cow, with emphasis on the peri-oestrous period. **Anim. Reprod. Sci.**, v.10, p.275-92, 1986,
- DUNCAN, R., DAVIS, J. PGF₂ α stimulates inositol 1,4,5-triphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrahydrophosphate formation in bovine luteal cells. **Endocrinology**, v.128, p.1519-26, 1991.
- DUNGAN, H.M., CLIFTON, D.K., STEINER, R.A. Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. **Endocrinology**, v. 147, p. 1154–1158, 2006.
- ESCOBEDO, F., ENCISO, A., GOMEZ, G., SISNEROS, E., COPUY, A, CALLEGOS, J., KINDER, J.E., GARCIA-WINDER, M. Norgestomet induces estrous but not ovulation in prepubertal Bos taurus x Bos indicus. **J. Anim. Sci.**, v.67, p.410, 1989.
- ESSLEMONT, R.J., GLENCROSS, R.G., BRYANT, M.J., POPE, G.S. A quantitative study of pre-ovulatory behavior in cattle (British Friesian heifers). **Appl. Anim. Ethol.**, v.6, p.1-17, 1980.
- ESTERGREEN-JUNIOR, V.L., FROST, O.L., GOMES, W.R., ERB, R.E., BULLARD, J.F. Effect of ovariectomy on pregnancy maintenance and parturition in dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.50, p.1293-5, 1967.
- EVANS, A.C.O., ADAMS, G.P., RAWLINGS, N.C. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. **J. Reprod. Fertil.**, v.103, p.463-70, 1994.
- FERNANDES, P., TEIXERIA, A.B., CROCCI, A.J., BARROS, C.M. Timed artificial insemination in beef cattle using GnRH agonist. PGF₂ α and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v.55, p.1521–1532, 2001.
- FIELDS, M.J., BARROS, C.M., WATKINS, W.B., FIELDS, P.A. Characterization of large luteal cells and their secretory granules during the estrous cycle of the cow. **Biol. Reprod.**, v.46, p.535-45, 1992.

FIELDS, M.J., DUBOIS, W., FIELDS, P.A. Dynamic features of luteal granules ultrastructural changes during the course of pregnancy in the cow. **Endocrinology**, v.117, p.1675-82, 1985.

FIGUEIREDO, R.A., BARROS, C.M., PINHEIRO, O.L., SOLER, J.M.P. Ovarian follicular dynamics in Nelore Breed (*Bos indicus*). **Theriogenology**, v.47, p.1489-505, 1997.

FITZ, T.A., MAYAN, M.H., STAWYER, H.R., NISWENDER, G.D. Characterization of two steroidogenic cell types in the corpus luteum. **Biol. Reprod.**, v.27, p.703-11, 1982.

FLINT, A.P.F., SHELDRIK, E.L. Ovarian secretion of oxytocin is stimulated by prostaglandin. **Nature**, v.297, p.587-8, 1982.

FORTUNE J.E.; RIVERA G.M.; EVANS, A. C.O.; TURZILLO, A.M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**. v., p.648-654, 2001.

FORTUNE, J.E. Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: a limiting factor in improvement of fertility? **Anim. Reprod. Sci.**, v.33, p.111–125, 1993.

FREDRICKSON, G., KINDHAL, H., EDQVIST, L.E. 11- Ketotetranor PGF metabolites, a suitable indicator for measuring prostaglandin release during the normal oestrus cycle and early pregnancy in the goat. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 7, p. 537, 1984.

FUCHS, A.R., BEHRENS, O., HELMER, H., LIU, C.H., BARROS, C.M., FIELDS, M.J. Oxytocin and vasopressin receptors in bovine endometrium and myometrium during the estrous cycle and early pregnancy. **Endocrinology**, v.127, p.629-36, 1990.

GALINA, C.S., ARTHUR, G.H. Review on cattle reproduction in the tropics. Part4. Oestrus cycles. **Anim. Breed. Abst.**, v.58, p.697-707, 1990.

GARRET, J.E., GEISERT, R.D., ZAVY, M.T., GRIES, L.K., WETTEMANN, R.P., BUCHANAN, D.S. Effect of exogenous progesterone on prostaglandin $F_{2\alpha}$ release and the interestrous interval in the bovine. **Prostaglandins**, v. 36, p. 85-88, 1988.

GARVERICK, H.A., ZOLLERS, W.G., SMITH, M.F. Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. **Anim. Reprod. Sci.**, v.28, p.111-124, 1992.

- GINTHER, O.J., BEG, M.A., BERGFELT, D.R., DONADEU, F.X., KOT, K. Follicle selection in monovular species. **Biol. Reprod.**, v.65, p.638–647, 2001.
- GINTHER, O.J., WILTBANK, M.C., FRICKE, P.M., GIBBONS, J.R., KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biol. Reprod.**, Madison, v.55, p.1187-94, 1996a.
- GINTHER, O.J., KOT, K., KULICK, L.J., MARTIN, S., WILTBANK, M.C. Relationships between FSH and ovarian follicular waves during last six months of pregnancy in cattle. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v.108, p.271-279, 1996b.
- GINTHER, O.J., KNOPF, L., KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and three follicular waves. **J. Reprod. Fert.**, v.887, p.223-30, 1989.
- GINTHER, O.J. Local versus systemic utero-ovarian relationships in farm animals. **Acta Vet. Scand.**, v.77, p.103-15, 1981.
- GINTHER O.J.; DEL CAMPO, C.H. Vascular anatomy of the uterus and ovaries and the unilateral luteolytic effect of the cattle uterus. **Anim. J. Vet. Res.**, v.35, p.193-203, 1974.
- GOODMAN, R.L., KARSCH, F.J. Pulsatile secretion luteinizing hormone: differential suppression by ovarian steroids. **Endocrinology**, v.107, p.1286-90, 1980.
- GOOF, A.K. Steroid hormone modulation of prostaglandin secretion in the ruminant endometrium during the estrous cycle. **Biol. Reprod.**, v. 71, p. 11-16, 2004.
- GORDON, I. Controlled breeding in cattle. Part.1. Hormones in the regulation, oestral control, and set-time artificial insemination. **Anim. Breed.**, v.44, p.265-75, 1976. (abstract)
- GOTTSCH, M. L., CUNNINGHAM, M. J., SMITH, J. T., POPA, S. M., ACOHIDO, B. V., CROWLEY, W. F., SEMINARA, S., CLIFTON, D. K. & STEINER, R. A. **Endocrinology**, v. 145, p. 4073-4077, 2004.
- GROSS, T.S., THATCHER, W.W., HANSEN, P.J. et al. Prostaglandin secretion by perfused bovine endometrium: secretion towards the myometrial and luminal sides at day 17 post-estrus as altered by pregnancy. **Prostaglandins**, v.35, p.342-57, 1988.

- GUILBAULT, L.A., VILLENEUVE, P., LAVERDIERE, G., PROULX, J., DUFOUR, J.J. Estrus synchronization in beef cattle using a potent GnRH analog (buserelin) and cloprostenol. **J. Anim. Sci.**, v.69, p.419, 1991.
- GUILBAULT, L.A., LUSSIER, J.G., GRASSO, F., MATTON, P. Influence of a GnRH analogue on follicular dynamics in cow pretreated or not with FSH-P. **Theriogenology**, v.33, p.240, 1990.
- HAFEZ, E.S.E. Reproduction in farm animal. 6. ed. **Philadelphia**, Lea & Febiger, 585p, 1993.
- HAN, S.K., GOTTSCH, M.L., LEE, K.J., POPA, S.M., SMITH, J.T., JAKAWICH, S.K., CLIFTON, D.K., STEINER, R.A., HERBISON, A.E. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. **J. Neurosci.**, v. 25, p. 11349–11356, 2005.
- HANSEL, W., ALILA, H.W., DOWD, J.P., YANG, X. Control of steroidogenesis in small and large bovine luteal cells. **Aust. J. Biol. Sci.**, v.40, p.331-47, 1987.
- HANSEL, W., CONVEY, E.M. Physiology of the estrus cycle. **J. Anim. Sci.**, v.57, p.404-24, 1983.
- HANSEL, W., ECHTERNKAMP, S.E. Control of ovarian functions in domestic animals. **Am. Zool.**, v.12, p.225-43, 1972.
- HENAO, G., OLIVEIRA-ANGEL M., MALDONADO, J.G. Follicular dynamics during postpartum anestrus and the first estrous cycle in suckled or non-suckled Brahman (*Bos indicus*) cows. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.63, p.127-136, 2000.
- HIXON, J.E., FLINT, A.P.F. Effects of a luteolytic dose of oestradiol benzoate on uterine oxytocin receptor concentrations, phosphoinositide turnover and prostaglandin F-2alpha secretion in sheep. **J. Reprod. Fertil.**, v.79, p.457-467, 1987.
- HIXON, J., HANSEL, W. Preferential transfer of prostaglandin F₂ α to ipsilateral ovarian artery following intrauterine administration in cattle. **Biol. Reprod.**, v.11, p.543-52, 1974.
- HORTON, E.W., POYSER, N.L. Uterine luteolytic hormone: a physiological role for prostaglandin F₂ α . **Physiol. Rev.**, v.56, p.595, 1975.
- HUNTER, M.G. Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. **J. Reprod. Fertil.**, v.43, p.91-99, 1991.

- HUNTER, R.H.F., WILMUT, I. Sperm transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.24, p.597-608, 1984.
- HURNIK, J.F. Sexual behavior of female domestic mammals. **Vet. Clin. North Am.**: Food Anim. Pract., v.3, p.423-61, 1987.
- IRELAND, J.J., MILVAE, R.A., MARTIN, T.L., ATEN, R.F., BEHRMAN, H.R. Effect of histone H2A on progesterone production by bovine luteal cells. **Biol. Reprod.**, v.43, p.1058-65, 1990.
- IRELAND, J.J., ROCHE, J.F. Hypotheses regarding development of dominant follicles during a bovine estrous cycle. In: Roche J.F., O' Callaghan, D. (Eds) **Follicular growth and ovulation rate in farm animals**. Boston: Martinus Nijhoff Publishers, MA, p.1-18, 1987.
- JOHNSON, M.A., BENTLEY, G.E., UKENA, K., TSUTSUI, K., FRALEY, G.S. Diurnal differences in the effects of gonadotropin-inhibitory hormone on reproduction in the male rat. **Soc. Neurosc. GG28**, 2005.
- KARSCH, F.J. Central actions of ovarian steroids in feed back regulation of pulsatile secretion of luteinizing hormone. **Ann. Rev. Physiol.**, v.49, p.365-82, 1987.
- KASTELIC, J.P., OLSON, W.O., MARTINEZ, M.A., COOK, R.B., MAPLETOFT, R.J. Synchronization of estrous in beef cattle with norgestomet and estradiol valerate. **Canadian Veterinary Journal**, v.40, p.173-8, 1999.
- KASTELIC, J.P., MAPLETOFT, R.J. Ovarian follicular responses in dairy cattle treated with GnRH and cloprostenol. **Can. Vet. J.** v.39, p.107-9, 1998.
- KESNER, J.S., CONVEY, E.M., ANDEERSOM, C.R. Evidence that estradiol induces the pre-ovulatory LH surge in cattle by increasing pituitary sensitivity to LHRH and then increasing LHRH release. **Endocrinology**, v.108, p.1386-91, 1981.
- KINDAHL, H., EDQVIST, L.E., GRANSTROM, E. The release of prostaglandin F2 alpha as reflected by 15-keto-13-14-dihydroprostaglandin F2 alpha in the peripheral circulation during normal luteolysis in heifers. **Prostaglandins**, v. 11, n.5, p. 871-878, 1976.
- KNOPF, L., KASTELIC, J.P., SCHALLENBERGER, E., GINTHER, O.J. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically

monitoring individual follicles. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.6, p.111-19, 1989.

KOTWICA, G., FANKZAC, A., OKRASA, S., KOTWICA, J. Effect of an oxytocin antagonist on prostaglandin 2a secretion and the course of luteolysis in sows. **Act. Vet. Hung.**, v. 47, n.2, p.249-262, 1999.

KOTWICA, J., SKARZYNSKI, D., JAROSZEWSKI, J., WILLIAMS, G.L., BOGACKI, M. Uterine secretion of prostaglandin F_{2α} stimulated by different doses of oxytocin and released spontaneously during luteolysis in cattle. **Reprod. Nut. Dev.**, v.38, p. 217-226, 1998.

KOTWICA, J., SKARZYNSKI, D., BOGACKI, M., MELIN, P., STAROSTKA, B. The use of an oxytocin antagonist to study the function of ovarian oxytocin during luteolysis in cattle. **Theriogenology**, v. 48, p. 1287-1299, 1997.

KRIEGSFELD, L.J. Driving reproduction: RFamide peptides behind the wheel. **Hormones and Behavior**, v.50, p.655–666, 2006.

KURAN, M., HUTCHINSON, J.S.M., BROADBENT, P.J. The response of bovine granulosa cells to different gonadotrophins in culture. **Anim. Reprod. Sci.**, v.45, n.1-2, p1-12, 1996.

LAFRANCE, M., GOFF, A.K. Effects of progesterone and oestradiol-17P on oxytocin-induced release of prostaglandin F_{2α}. **J. Reprod. Fertil.**, v.82, p.429-436, 1988.

LAMMING, G.E., MANN, G.E. A dual role for progesterone in the control of cyclicity in domestic ruminants. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl.49, p.561-566, 1995a.

LAMMING, G.E., MANN, G.E. Control of endometrial oxytocin receptors and prostaglandin F_{2α} responses to oxytocin in ovariectomized cows by progesterone and oestradiol. **J. Reprod. Fertil.**, v.103, p.69-73, 1995b.

LAMMING, G.E., WATHES, D.C., PETERS, A.R. Endocrine patterns in the post-partum cow. **J. Reprod. Fert.**, v.30, p.155–170, 1981.

LAMOND, D.R. Synchronization of ovarian cycles in sheep and cattle. **Anim. Breed.**, v.32, p.269-285, 1964. (abstract)

LOOPER, M.L., LENTS, C.A., VIZCARRA, J.A., WETTEMANN, R.P. Evaluation of the effects of body condition on luteal activity and estrus in postpartum beef cows. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v.74, n. 1, p.223, 1997. (abstract)

LUCY, M.C., SAVIO, J.D., BADINGA, L., DE LA SOTA, R.L., THATCHER, W.W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **J. Anim. Sci.**, v.70, p.3615-26, 1992.

LUNN, P., VAGNANI, K.E., GINTHER, O.J. The equine response to endometrial cups. **J. Reprod. Immunol.**, v.34, n. 3, p.203-216, 1996.

LUQUE, E.H., HUTTER, J.C., MONTES, G.S. Regulación hormonal de los ciclos reproductivos en la vaca. **Rev. Med. Vet.**, v.64, p.190-211, 1983.

MACMILLAN, K.L., PETERSON, A.J. A new intravaginal progesterone realising device for cattle (CIDR - B) for estrous synchronization, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anestrous. **Anim. Reprod. Sci.**, v.33, p.1-25, 1993.

MACMILLAN, K.L., THATCHER, W.W. Effect of an agonist of gonadotropin releasing hormone on ovarian follicles in cattle. **Biol. Reprod.**, v.45, p.883-9, 1991.

MANN, G.E., LAMMING, G.E. The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrus cycle in the cow. **Anim. Reprod. Sci.**, v.64, p.171-180, 2000.

MANN, G.E., LAMMING, G.E. Use of repeated biopsies to monitor endometrial oxytocin receptors in the cow. **Vet Rec**, v. 135, p. 403-405, 1994.

MARQUES, M.O., REIS, E.L., CAMPOS FILHO, E.P., BARUSELLI, P.S. Efeitos da administração de eCG e de Benzoato de Estradiol para sincronização da ovulação em vacas zebuínas no período pós-parto. In: Proceedings 5. **Simposio Internacional de Reproducción Animal**, Córdoba, Argentina, pp. 392, 2003. (abstract)

MATTON, P., ADELAOUN, V., COUTURE, Y., DUFOUR, J.J. Growth and replacement of the bovine ovarian follicles during the estrous cycle. **J. Anim. Sci.**, v.52, p.813-20, 1981.

MCCRACKEN, J.A., CUSTER, E.E., LAMSA, J.C. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. **Physiol. Rev.**, v.79, p.263-323, 1999.

MCCRACKEN, J.A., SCHRAM, W., OKULICZ, W.C. Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF2 α from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. **Anim. Reprod. Sci.**, v.7, p.31-56, 1984.

- MCCRACKEN, J.A., BARCKOWSKI, B., CARLSON, J.C. The physiological role of prostaglandin F₂ alpha in corpus luteum regression. **Adv. Biosc.**, v. 9, p. 599-624, 1973.
- MCDUGALL, S., BURKE, C.R., MACMILLAN, K.L., WILLIAMSON, N.B. Patterns of follicular development during periods of anovulation in pasture-fed dairy cows after calving. **Res. Vet. Sci.**, v.58, 212-6, 1995.
- MCNEILLY, A.S. Suckling and the control of gonadotropin secretion. In: Knobil E, Neill J (eds), **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, p.2323-2349, 1988.
- MEIRELLES, F.V., ROSA, A.J.M., LÔBO, B.R. Is the American Zebu really *Bos indicus*? **Genetics and Molecular Biology**, v.22, p.543-547, 1999.
- MENEGHETTI, M., VILELA, E.R., VASCONCELOS, J.L.M. Efeito da remoção dos bezerros nos folículos dominante e na taxa de ovulação ao primeiro GnRH em protocolos de sincronização em vacas Nelore em anestro. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.25, n.3, p.286-288, 2001.
- MESSAGER, S., CHATZIDAKI, E.E., MA, D., HENDRICK, A.G., ZAHN, D., DIXON, J., THRESHER, R.R., MALINGE, I., LOMET, D., CARLTON, M.B., COLLEDGE, W.H., CARATY, A., APARICIO, S.A., 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. **Proc.Natl. Acad Sci.**, v. 102, p. 1761–1766, 2005.
- MILVAE, R.A., HINCKLEY, S.T., CARLSON, J.E. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v.45, p.1327-43, 1996.
- MILVAE, R.A., HANSEL, W. Prostacylin, PGF₂ α and progesterone production by bovine corpus luteum during the estrous cycle. **Biol. Reprod.**, v.29, p.1063-8, 1983.
- MIZUTA, K. 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, 98p. Dissertação (doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Departamento de Reprodução Animal – Universidade de São Paulo.

- MUKASA-MUGERWA, E. A review of reproductive performance of female *Bos indicus* (Zebu) cattle. **ILCA monog.**, v.6, p.1-34, 1989.
- MURPHY, B.D., MARTINUK, S.D. Equine chorionic gonadotrophin. **Endocrine Reweius**, v.12, p.27-44, 1991.
- MURPHY, M.G., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. **J. Reprod. Fert.**, v.90, p.523-33, 1990.
- NANCARROW, CD., BUCKMASTER, I., CHAMELEY, W. Hormonal changes around oestrus in the cow. **J. Reprod. Fertil.**, v. 32, p. 320-321, 1973.
- NETT, T.M., MCCLELLAN, M., NISWENDER, G.D. Effects of the prostaglandins in the ovine corpus luteum blood flow, secretion of progesterone, and morphology. **Biol. Reprod.**, v.15, p.66-78, 1976.
- NISWENDER, G.D., JUENGEL, J.L., MCGUIRE, W.J., WILTBANK, M.C. Luteal function: The estrous cycle and early pregnancy. **Biol. Reprod.**, v.50, p.239-47, 1994.
- OKUDA, K., MIYAMOTO, Y., SKARZYNSKY, DJ. Regulation of endometrial prostaglandin $F_{2\alpha}$ synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. **Dom. Anim. End.**, v. 23, p. 255-264, 2002.
- ORWIG, K.E., GERTRAND, J.E., BOR-RUNG, O., FORSBEG, N.E., STORMSHAK, F. Involvement of protein kinase C, calpains, and calpastatin in $PGF_{2\alpha}$ -induced oxytocin secretion from the bovine corpus luteum. **Endocrinology**, v.134, p.78-83, 1994.
- OYEDIPE, E.O., GUSTAFSSON, B., KINDAHL, H. Blood levels of progesterone and 15-keto-13, 14-dihydro prostaglandin $F_{2\alpha}$ during the estrous cycle of oxytocin-treated cows. **Theriogenology**, v.22, n.4, p.329-339, 1984.
- PETER, A.T, BOSU, W.T.K., LIPTRAP, R.M., Cummings, E. Temporal changes in serum prostaglandin $F_{2\alpha}$ and oxytocin in dairy cows with short luteal phases after the first postpartum ovulation. **Theriogenology**, v.32, p.277-284, 1989.
- PETERSON, A.J., FAIRCLOUGH, R.J., PAYNE, E. Hormonal changes around bovine luteolysis. **Prostaglandins**, v. 10, p. 675-685, 1975.
- PIERSON, R. A., GINTHER O. J. Ultrasonographic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, v.29, p.21-37, 1988.

- PINHEIRO, O.L., BARROS, C.M., FIGUEREDO, R.A., VALLE, E.R. DO, ENCARNÇÃO, R.O., PADOVANI, C.R. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin $F_{2\alpha}$ or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v.49, p.667-81, 1998.
- PINHEIRO, V.G., SOUZA, A.F., PEGORER, M.F., ERENO, R.L., BARROS, C.M. Do temporary calf removal (TCR) and/or eCG administration increase pregnancy rates in lactating nelore cows treated with progesterone release intravaginal device? **Reproduction, Fertility and Development**, v.18, p.117, 2006 (abstract).
- PIPER, P.J., VANE, J.R., WYLLE, J.H. Inactivation of prostaglandins by the lungs. **Nature**, v.225, p.600-604, 1970.
- POWELL, W.S., HAMMERSTROM, S., SAMUELSSON, B. Localization of a $PGF_{2\alpha}$ receptor in bovine corpus luteum plasma membranes. **Eur. J. Biochim.**, v.61, p.605-11, 1976.
- PRICE, C.A., WEBB, R. Steroid control of gonadotropin secretion and ovarian function in heifers. **Endocrinology**, v.122, p.2222-31, 1988.
- PURSLEY, J.R., WILTBANK, M.C., STEVENSON, J.S., OTTOBRE, J.S., GARVERICK, H.A., ANDERSON, L.L. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. **J. Dairy Sci.** 80, 295–300, 1997.
- PURSLEY, J.R., MEE, M.O., WILTBANK, M.C. Synchronization of ovulation in dairy cattle using GnRH and $PGF_{2\alpha}$. **Theriogenology**, v.44, p.915-23, 1995.
- PURSLEY, J.R., MEE, M.O.K., BROWN, M.D., WILTBANK, M.C. Synchronization of ovulation in dairy cattle using GnRH and $PGF_{2\alpha}$. **J. Anim. Sci.**, v.72, p.230, 1994.
- PUTNEY, D.J., TORRES, C.A.A., GROSS, T.S. et al. Modulation of uterine prostaglandin biosynthesis by pregnant and nonpregnant cows at day 17 post-estrus in response to in vivo and in vitro heat stress. **Anim. Reprod. Sci.**, v.20, p.31-47, 1989.
- QUINTANS, G., VÁZQUEZ, A.I. Effect of premature weaning and suckling restriction with nose plates on the reproductive performance of primiparous cows under range conditions. In: Proceedings of the **Sixth International**

Symposium in Domestic Ruminants, Crieff-Scotland, p.14–17, A65, 2002.
(abstract)

RAHE, C.H., OWENS, R.E., FLEEGER, J.L., NEWTON, H.J., HARMS, P.G. Patterns of luteinizing hormone in the cycling cow dependence upon period of the cycle. **Endocrinology**, v.107, p.498-503, 1980.

RAO, C.V., IRELAND, J.J., ROCHE, J.F. Decrease of various luteal enzyme activities during PGF₂ α induced luteal regression in the bovine. **Mol. Cell Endocrinol.**, v.34, p.99-105, 1984.

reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. **Reproduction**, v. 131, p. 623–630, 2006.

RETTMER, I., STEVENSON, J.S., CORAH, L.R. Endocrine responses and ovarian changes in inseminated dairy heifers after an injection of a GnRH agonist 11 to 13 days after estrus. **J. Anim. Sci.**, v.70, p.508-17, 1992.

RHODES, F.M., FITZPATRICK, L.A., ENTWISTLE, K.W., DEATH, G. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrus. **J. Reprod. Fert.**, Cambridge, v.104, n. 1, p.41-49, 1995.

RICE, C.A. The control of FSH secretion in the larger domestic species. **J. Endocrinol.**, v.131, p.177-84, 1991.

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

ROCHE, J.F., CROWE, M.A., BOLAND, M.P. Postpartum anestrus in dairy and beef cows. **Anim. Reprod. Sci.**, v.28, p.371-8, 1992.

ROCHE, J.F., BOLAND, M.P. Turnover of dominant follicles in cattle of different reproductive states. **Theriogenology**, New York, v.35, n.1, p.81-90, 1991.

RODGERS, R. Cell-cell communication in corpora lutea. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.2, p.281-9, 1990.

ROSSA, L.A.F. Sincronização da ovulação por eCG ou benzoato de estradiol em vacas de corte tratadas com Crestar no período pós-parto. Tese (mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 80f. 2002.

- SÁ FILHO, M.F., REIS, E.L., VIEL JR, J.O., NICHI, M., Madureira, E.H., Baruselli, P.S. Dinâmica folicular de vacas Nelore lactantes em anestro tratadas com progestágeno, eCG e GnRH. **Act. Sci. Veter.**, supl.32, p.235, 2004.
- SARTORELLI, E.S., CARVALHO, L.M., BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J., BARROS, C.M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, New York, v.63, p.2382-2394, 2005.
- SAVIO, J.D., BOLAND, M.P., HYNES, N., ROCHE, J.F. Resumption of follicular activity in the early postpartum period of dairy cows. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v.88, p.569-579, 1990a.
- SAVIO, J.D., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F. Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in postpartum dairy cows. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v.88, p.581-591, 1990b.
- SAVIO, J.D., KEENAN, L., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle of heifers. **J. Reprod. Fert.**, v.83, p.663-71, 1988.
- SCHALLENBERGER, E., PROKOPP, S. Gonadotrophins and ovarian steroids in cattle. IV. Re-establishment of the stimulatory feedback action of oestradiol-17-beta on LH and FSH. **Acta Endocrinol.**, v.109, p.44-49, 1985.
- SCHOENEMANN, H.M., HUMPHREY, W.D., CROWDER, M.E, NETT, T.M., REEVES, J.J. Pituitary luteinizing hormone releasing receptors in ovariectomized cows after challenge with ovarian steroids. **Biol. Reprod.** v.32, p.574-83, 1985.
- SHAHAB, M., MASTRONARDI, C., SEMINARA, S.B., CROWLEY, W.F., OJEDA, S.R., PLANT T.M. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.102, p.2129-2134, 2005.
- SHEMESH, M.; HANSEL, W. Levels of PGF $_{2\alpha}$ in bovine endometrium uterine venous, ovarian arterial and jugular plasma during the estrous cycle. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.148, p.123-126, 1975.
- SHORT, R.E., BELLOWS, R.A., STAIGMILLER, R.B., BERARDINELLI, J.G., CUSTER, E.E., Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v.68, p.799-806, 1990.

SILVIA, W.J., LEWIS, G.S., McCRACKEN, J.A., THATCHER, W.W., WILSON, Jr. L. Hormonal regulation of uterine secretion of PGF₂ α during luteolysis in ruminants. **Biol. Reprod.**, v. 45, p. 655-663, 1991.

SINCLAIR, K.D., MOLLE, G., REVILLA, R., ROCHE, J.F., QUINTANS, G., MARONGUI, L., SANZ, A., MACKEY, D.R., DISKIN, M.G. Ovulation of the first dominant follicle arising after day 21 post partum in suckling beef cows. **Anim. Sci.** 75, 115–126, 2002.

SIROIS, J., FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrus cycle in heifers monitored by Real-Time Ultrasonography. **Biol. Reprod.**, v.39, p.308-17, 1988.

SMITH, J.T., CUNNINGHAM, M.J., RISSMAN, E.F., CLIFTON, D.K., STEINER, R.A. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. **Endocrinology**, v. 146, p. 3686–3692, 2005a.

SMITH, J.T., DUNGAN, H.M., STOLL, E.A., GOTTSCH, M.L., BRAUN, R.E., EACKER, S. M., CLIFTON, D.K., STEINER, R.A. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. **Endocrinology**, v. 146, p. 2976–2984, 2005b.

SOUZA, A.F., PINHEIRO, V.G., ERENO, R.L., BARROS, C.M. Synchronization of ovulation in anestrus Nelore cows treated with hormonal protocol without progesterone or progestagens. **Reproduction, Fertility and Development**, v.18, p.117, 2006 (abstract).

SPICER, L.J., LEUNG, K., CONVERY, E.M., GINTHER, J., SHORT, R.E., TUCKER, H.A., Anovulation in postpartum suckled beef cows. I. Associations among size and numbers of ovarian follicles, uterine involution, and hormones in serum and follicular fluid. **J. Anim. Sci.**, v.62, p.734-741, 1986.

STAGG, K., SPICER, L.J., SREENAN, J.M., ROCHE, J.F., DISKIN, M.G. Effect of calf isolation on follicular wave dynamics, gonadotropin and metabolic hormone changes, and interval to first ovulation in beef cows fed either of two energy levels postpartum. **Biol. Reprod.**, v.59, p.777-783, 1998.

STAGG, K., DISKIN, M.G., SREENAN, J.M., ROCHE, J.F. Follicular development in long-term anoestrous suckler beef cows fed two levels of energy postpartum. **Anim. Reprod. Sci.**, v.38, p.49-61, 1995.

STANISLAUS D., PINTER J.H., JANOVICK J.A., CONN P.M. Mechanisms mediating multiple physiological responses to gonadotropin-releasing hormone. **Mol. Cell Endocrinol**, v. 144, p. 1-10, 1998.

STEVENSON, J.S., KNOPPEL, E.L., MINTON, J.E., SALFEN, B.E. and GARVERICK, H.A. Estrus, ovulation, luteinizing hormone, and suckling-induced hormones in mastectomized cows with and without unrestricted presence of the calf. **J. Anim. Sci.**, v.72, p.690-699, 1994.

STEVENSON, J.S., PHATAK, A.P., RETTMER, I. Post-insemination administration of oestrone: follicular dynamics, duration of cycle, hormonal responses, and pregnancy rates. **J. Dairy Sci.**, v.76, p.2536-47, 1993.

STEWART, F., ALLEN, W.R. Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophins. **J. Reprod. Fertil.**, v.62, n.2, p.527-536, 1981.

STOCK, J., FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. **Endocrinology**, v.132, p.1108-16, 1993.

TAYLOR, C., RAJAMAHENDRAM, R. Follicular dynamics and corpus luteum growth and function pregnant versus nonpregnant dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.74, p.115-23, 1991.

THATCHER, W.W., DROST, M., SAVIO, J.D., MACMILLAN, K.L., ENTWISTLE, K.W., SCHIMITT, E.J., DE LA SOTA, R.L., MORRIS, G.R. New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v.33, p.27-49, 1993.

THATCHER, W.W., MACMILLAN, K.L., HANSEN, P.J., DROST, M. Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. **Theriogenology**, v.31, p.149-64, 1989.

THORBURN, G.D., COX, R.I., CURRIE, W.B. Prostaglandin F and progesterone concentrations in the utero-ovarian venous plasma of the ewe during the oestrous cycle and early pregnancy. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v. 18, p. 151-158, 1973.

TWAGIRAMUNGU, H., GUILBAULT, L.A., DUFOUR, J.J. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: A review. **J. Anim. Sci.**, v.73, p.3141-51, 1995.

- TWAGIRAMUNGU, H., GUIBAULT, L.A., PROULX, J., DUFOUR, J.J. Influence of corpus luteum and induced ovulation on ovarian follicular dynamics in postpartum cyclic cows treated with buserelin and cloprostenol. **J. Anim. Sci.**, v.72, p.1796, 1994.
- TWAGIRAMUNGU, H., GUIBAULT, L.A., PROULX, J., VILLEUVE, P., DUFOUR, J.J. Synchronization of estrus and fertility in beef cattle with two injections of buserelin and prostaglandin. **Theriogenology**, v.38, p.1131-44, 1992a.
- TWAGIRAMUNGU, H., GUIBAULT, L.A., PROULX, J., VILLEUVE, P., DUFOUR, J.J. Influence of an agonist of Gonadotropin-Releasing Hormone (Buserelin) on estrus synchronization and fertility in beef cows. **J. Anim. Sci.**, v.70, p. 1904-10, 1992b.
- VACA, L.A., GALINA, C., FERNANDEZ, B.S. Oestrus cycle, oestrus and ovulation of the zebu in the Mexican tropics. **Vet. Rec.**, v.117, p.434-7, 1985.
- VASCONCELOS, J.L.M., PEREZ, G.C., SANTOS, R.M., SA FILHO, O.G. Effects of progesterone intravaginal device and calf removal on conception in suckled Nelore cows. In: **15th International Congress on Animal Reproduction**, v.15, p.120, 2004. (abstract).
- VILLA-GODOY A., IRELAND, J.J., WORTMAN, J.A., AMES, N.K., HUGHES, T.L., FOGWELL, R.L. Effect of ovarian follicles on luteal regression in heifers. **J. Anim. Sci.**, v.60, p.517-527, 1985.
- WANDJI, S.A., FORTIER, M.A., SIRARD, M.A. Differential response to gonadotropins and prostaglandin E₂ in ovarian tissue during prenatal and postnatal development in cattle. **Biol. Reprod.**, v.46, p.1034-41, 1992.
- WATHES, D.C., SWANN, R.W., PICKERING, B.T. Variations in oxytocin, vasopressin and neurophysin concentrations in the bovine corpus ovary during the oestrous cycle and pregnancy. **J. Reprod. Fertil.**, v.71, p.551-7, 1984.
- WATHES, D.C., SWANN, R.W., BIRKETT, S.D. et al. Characterization of oxytocin, vasopressin and neurophysin from the bovine corpus luteum. **Endocrinology**, v.113, p.693-8, 1983.
- WILLIAMS, S.W., STANKO, R.L., AMSTALDEN, M., WILLIAMS, G.L. Comparison of three approaches for synchronization of ovulation for timed artificial insemination in *Bos indicus* influenced cattle managed on the Texas gulf coasts. **J. Anim. Sci.** v.80, p.1173-1178, 2002.

- WILLIAMS, G.L., TALAVERA, F., PETERSEN, B.J., KIRSCH, J.D., TILTON, J.E. Coincident secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in early postpartum beef cows: effects of suckling and low-level increases of systemic progesterone. **Biol. Reprod.**, v.29, p.362–373, 1983.
- WILLIAMS, G.L., KOTWICA, J., SLANGER, W.D., OLSON, D.K., TILTON, J.E., JOHNSON, L.J. Effect of suckling on pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone throughout the early postpartum period of beef cows. **J. Anim. Sci.** 54, 592–602, 1982.
- WILSON, S.J., MARION, R.S., SPAIN, J.N., SPIERS, D.E., KEISLER, D.H., LUCY, M.L. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating cows. **J. Dairy Science**, Champaign, v.81, n.8, p.2124-2131, 1998.
- WILTBANK, M.C., GUMEN, A., SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 21-52, 2002.
- WILTBANK, M.C.; PURSLEY, J.R.; FRICKE, P.M.; VASCONCELOS, J.; GUENTHER, J.N., GIBBONS, J.R.; GINTHER, O.J. Development of IA and ET programs that do not require detection of estrus using recent information on follicular growth. In: Annual Convention Portland, 15, Oregon. *Proceedings...Oregon: American Embryo Transfer Association*, 1996, p.23-44, 1996.
- WILTBANK, M.C., SHIAO, T.F., BERGFELT, D.R. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ receptors in the early bovine corpus luteum. **Biol. Reprod.**, v.52, p.74-8, 1995.
- WISHART, D.F. Observations on the oestrous cycle of the Friesian heifers. **Vet. Rec.**, v.90, p.595-7, 1972.
- WOLFENSON, D., THATCHER, W.W., SAVIO, J.D., BADINGA, L., LUCY, M.C. The effect of a GnRH analogue on the dynamics of follicular development and synchronization of estrus in lactating cyclic dairy cows. **Theriogenology**, v.42, p.633-44, 1994.
- WOOLUMS, A.R., PETER, A.T. Cystic ovarian condition in cattle: Part I. Folliculogenesis and ovulation. **Compend. Cont. Educ. Article**, v.16, p.935-43, 1994.
- WRIGHT, P.J., MALMO, J. Pharmacological manipulation of fertility. **Appl. Food Anim Pract.**, v.8, p.57-89, 1992.

- XIAO, C, GOFF, A.K. Hormonal regulation of estrogen and progesterone receptors in cultured bovine endometrial cells. **J. Reprod. Fertil.**, v. 115, p. 101-109, 1999.
- XIÃO, S., ROBERTSON, D.M., FINDLAY, J.K. Effects of activin and FSH-suppressing protein/folistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. **Endocrinology**, v.131, p.1009-16, 1992.
- YAVAS, Y.; WALTON, J.S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. **Theriogenology**, New York, v.54, p.1-23, 2000a.
- YAVAS, Y., WALTON, J.S. Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: a review. **Theriogenology**, New York, v.54, p.25-55, 2000b.
- ZHENG, J., FRICKE, P.M., REYNOLDS, L.P., REDMER, D.A. Evaluation of growth, cell proliferation and cell death in bovine corpora lutea throughout the estrous cycle. **Biol. Reprod.**, v.51, p.623-32, 1994.
- ZOLLERS, W.G. JR., GARVERICK, H.A., SMITH, M.F. Concentrations of progesterone and oxytocin receptors in endometrium of postpartum cows expected to have a short or normal oestrus cycle. **J. Reprod. Fertil.**, v.97, p.329-337, 1993.

CAPÍTULO 2

Produção de 13,14-diidro 15-ceto prostaglandina $F_2\alpha$ (PGFM) em resposta
à ocitocina no período pós-parto em vacas da raça Nelore

Este artigo científico está de acordo com as normas para publicação na Theriogenology,
exceto a apresentação das figuras e o idioma.

Produção de 13,14-diidro 15-ceto prostaglandina F₂α
(PGFM) em resposta à ocitocina no período pós-parto
em vacas da raça Nelore

Running title:

Resposta à ocitocina no período pós-parto

Rafael A. Satrapa¹; Vinícius G. Pinheiro²; Ronaldo L. Ereno¹; Cláudia M. Bertan⁴;

Marcelo Piagentini¹; Mário Binelli³; Ciro M. Barros^{2*}

*Depto. de Reprodução Animal – FMVZ¹, Depto. de Farmacologia, IB-UNESP,
Botucatu-SP²; VRA-FMVZ-USP, Pirassununga-SP³; UNESP, Dracena-SP⁴.*

^aCorresponding author: Ciro M. Barros; fax: +55 14 3815-3744; e-mail:

cmbarros@ibb.unesp.br

Abstract

The purpose of the present study was to evaluate, in early postpartum anestrus of Nelore cows, if the increase of estradiol plasma concentrations in pre-ovulatory period and/or high concentrations of progesterone (P_4) preceding ovulation (P_4 priming), induced by hormonal treatment, reduces endogenous releasing of $PGF_2\alpha$ and, consequently, prevents premature lysis of corpus luteum formed after ovulation. Nelore lactating cows (40 to 70 d postpartum, $n = 30$), were randomly divided into 3 Groups: GPE ($n = 10$), GPE/eCG ($n = 10$) and GPG/eCG ($n = 10$). At random stage of the estrous cycle (D-8), the animals of GPE group (GnRH – Prostaglandin – Estradiol Benzoate) were treated with a GnRH agonist (50 μ g lecorelin, IM, Gestran Plus[®]). Seven days later (D-1) the cows received a luteolytic dose of $PGF_2\alpha$ (250 μ g d-cloprostenol, IM, Prolise[®]), and on day 0 (D0) 1.0 mg of estradiol benzoate (EB, IM, Estrogen[®]). Cows from GPE/eCG group received the GPE treatment associated with 400 IU of eCG (IM, Novormon[®]) on D-1, right after $PGF_2\alpha$ administration. The GPG/eCG group was similar to GPE/eCG, except that EB was replaced with a second dose of GnRH (50 μ g lecorelin, IM). Ovarian ultrasonography were performed (Aloka 500 SSD with a 7.5 MHZ transducer) and blood samples were collected at the days of hormones administration, in order to classify the groups based upon the presence or absence of progesterone (P_4 priming), before ovulation. All animals were challenged with oxytocin (OT, 50 IU, IV, Univet[®]) 6, 9, 12, 15 and 18 days after BE (RTB/GPE and RTB/GPE/eCG groups) or GnRH (RTB/GPG/eCG group) administration and blood samples were collected before and 30 minutes after oxytocin challenge. Moreover, the calves were removed from the cows, during 48 h before the beginning of the treatments. ANOVA was used to estimate the effect of treatment, P_4 priming and interactions in the discrete variables and split-plot

ANOVA was used to estimate effect of treatment, P₄ priming, day of the estrous cycle and interactions in the variables with time repetition. The mean P₄ plasma concentration during the period of synchronization was higher ($P < 0.01$) in cows with (3.70 ± 0.51 ng/mL) than cows without (1.25 ± 0.11 ng/mL) P₄ priming. A decline on P₄ concentration on day 18 (1.73 ± 0.29 ng/mL) was observed in all treatments for cows without P₄ priming. However, animals with P₄ priming, treatments with EB maintained high P₄ concentrations (8.89 ± 1.27 ng/mL), whereas there was a decline on P₄ on day 18 (2.12 ± 1.05 ng/mL) for cows that received GnRH (instead of EB) to induce ovulation (interaction treatment x P₄ priming x day; $P < 0.01$). PGFM production in response to oxytocin increased between days 6 and 18 (day effect; $P < 0.01$), and this increase tended to be more evident in animals without P₄ priming (effect of P₄ priming x day; $P < 0.06$). The increase on estradiol plasma concentrations in pre-ovulatory period, induced by hormonal treatments (RTB/GPE and RTB/GPE/eCG groups), was not efficient to inhibit the endogenous releasing of PGFM, induced by oxytocin administration; 2) in Nelore cows, in postpartum anestrus, the endogenous releasing of PGFM, in response to oxytocin challenge and premature luteolysis incidence, was lower in animals “with” in comparison to the ones “without priming of progesterone”; 3) in progesterone priming animals, the treatments with estradiol benzoate (RTB/GPE and RTB/GPE/eCG groups) promoted high concentrations of progesterone 18 days after ovulation induction, indicating a possible beneficial effect using hormonal protocols with estradiol benzoate in animals with progesterone priming.

Palavras-chave: bovino, período pós-parto, prostaglandina, ocitocina, ciclo curto

1. Introdução

Os animais de raças zebuínas (subespécie *Bos taurus indicus*, [1]) constituem a maior parte do rebanho bovino de corte em regiões de clima tropical, devido a sua maior adaptação aos climas quentes, alta umidade, maior tolerância ao estresse térmico e resistência aos parasitos, em relação aos animais de raças européias (subespécie *Bos taurus taurus*). No Brasil, entre as raças de corte, a Nelore é a que possui o maior contingente numérico (acima de 90 milhões de cabeças), sendo considerada o alicerce da cadeia produtiva pecuária [2].

Um dos principais fatores que determinam o sucesso de um programa de inseminação artificial (IA) é a detecção do cio, a qual requer tempo e pessoal adequadamente treinado. Em fêmeas zebuínas, a curta duração do estro (cerca de 11 horas) dificulta a detecção do mesmo e prejudica a implantação de programas convencionais de IA [3,4,5].

A partir do conhecimento detalhado da dinâmica folicular [6,7,8] tornou-se possível o desenvolvimento de tratamentos hormonais capazes de regular o crescimento folicular e o momento da ovulação, de forma a viabilizar a inseminação artificial com tempo fixo (IATF, ou seja, IA com tempo pré-determinado, sem a necessidade de observar cio) em taurinos [9,10,11,12] e zebuínos [13,14,15].

Na América do Sul, principalmente no Brasil e na Argentina, a disponibilidade comercial de diversos hormônios esteróides e protéicos, têm permitido o desenvolvimento de inúmeros protocolos hormonais visando a IATF.

Dentre os vários tratamentos testados para IATF de bovinos de corte, os protocolos com progesterona (P_4) ou progestágenos têm se mostrado eficazes, principalmente no período pós-parto, quando boa parte dos animais se encontra em anestro [16]. O

tratamento mais usual consiste na administração de benzoato de estradiol (BE; 2,0 mg, IM) no momento da inserção do dispositivo (Dia 0), aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ quando o dispositivo intravaginal for removido (Dia 8) e 1,0 mg de BE (via IM) 24h mais tarde. A IATF é realizada 30-36 h após a última administração de BE. Portanto, neste protocolo são utilizados os seguintes hormônios: progesterona-estrógeno-prostaglandina-estrógeno (protocolo PEPE). Ao passo que protocolos mais econômicos, que utilizam o GnRH para sincronizar a onda folicular, como por exemplo o “Ovsynch” (GPG, GnRH-PGF-GnRH, [17,18,14,15] e uma de suas variações, o protocolo GPE (GnRH-PGF-Estradiol), têm sido usados com menor frequência [14,15].

Um dos maiores obstáculos ao uso do protocolo GPE em bovinos de corte é sua ineficácia em animais em anestro. Acredita-se que após o parto as vacas necessitam de um primeiro contato com a progesterona (“priming”) para que se desenvolva um corpo lúteo com vida funcional normal [19,20,21,22]. Tanto é que na primeira ovulação pós-parto (isto é, sem o “priming” de progesterona) geralmente se forma um corpo lúteo com vida curta, devido à liberação prematura de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio uterino [23,24,22,23].

Mais recentemente, Mann & Lamming [25] propuseram que a vida curta do primeiro CL pós-parto está relacionada ao fato do folículo dominante não se desenvolver o suficiente para produzir elevadas concentrações de estradiol, que seriam responsáveis pela diminuição (“down regulation”) dos receptores de ocitocina no endométrio uterino. Se houver disponibilidade de receptores no endométrio uterino, a interação de ocitocina com os mesmos desencadeará eventos que resultarão na síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no endométrio uterino e lise prematura do corpo lúteo.

Levando-se em consideração a hipótese formulada por Mann & Lamming [25], o protocolo GPE foi modificado com o objetivo de se induzir, em vacas de corte no

período pós-parto, a formação de um folículo dominante capaz de produzir quantidades suficientes de estradiol para promover “down regulation” dos receptores para ocitocina, de forma a evitar a liberação prematura de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Para tanto, o tratamento GPE foi precedido pela RTB durante 48 horas (RTB/GPE), a fim de diminuir o efeito inibitório da amamentação e presença do bezerro na liberação das gonadotrofinas. Além disso, aplicou-se eCG, logo após a administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$, para acelerar o crescimento e maturação folicular (RTB/GPE/eCG, [26]). Com esta associação de tratamentos espera-se que a quantidade de estradiol endógeno, produzido, sobretudo, pelo folículo dominante, seja suficiente para diminuir (“down regulation”) os receptores endometriais de ocitocina e, conseqüentemente, evitar a lise prematura do corpo lúteo e favorecer a manutenção da prenhez [26].

Objetivou-se com o presente estudo avaliar, em vacas Nelore no período pós-parto inicial, se o aumento nas concentrações plasmáticas de estradiol no período pré-ovulatório e/ou “priming” de progesterona precedendo a ovulação, induzida por tratamentos hormonais, seriam capazes de diminuir a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ induzida pela administração de ocitocina e, conseqüentemente, evitar a lise prematura do corpo lúteo formado após a primeira ovulação.

2. Material e Método

2.1 Localização e Animais

O experimento foi realizado na Fazenda Boi Verde, localizada no município de Avaré, região centro-oeste do estado de São Paulo (Latitude: $-23,10^\circ$; Longitude: $-48,93^\circ$; Altitude: 766 m) nos meses de dezembro de 2004 a janeiro de 2005.

No início do experimento (D-20), vacas Nelore lactantes (40 a 70 dias pós-parto, n=100) foram examinadas por meio de ultra-sonografia (US, aparelho Aloka SSD-500, sonda transretal de 7,5 MHz) para detecção da presença de CL e amostras de sangue foram colhidas da veia jugular para determinação das concentrações plasmáticas de progesterona. Dez dias mais tarde (D-10), os animais sem CL no D-20 (n=50) foram novamente examinados por meio de US e amostras de sangue foram colhidas somente dos animais sem CL (Figura 1).

As vacas sem CL (n=30) foram distribuídas aleatoriamente em três grupos experimentais: RTB/GPE (n=10), RTB/GPE/eCG (n=10) e RTB/GPG/eCG (n=10), e mantidas em pastagens de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha*, com suplemento mineral e água a vontade. O peso e o índice de escore corporal destes animais variaram de 350 a 363 Kg e de 2,5 a 3,5 (escala de 0 a 5, [27]), respectivamente.

Após a determinação das concentrações plasmáticas de progesterona, as vacas dos 3 grupos experimentais foram subdivididas em animais com (+) ou sem (-) “priming” de progesterona, ou seja, vacas que apresentaram, antes da administração de $\text{PGF}_2\alpha$, concentrações elevadas (+) ou baixas (-) de progesterona, respectivamente.

2.2 Tratamentos Hormonais

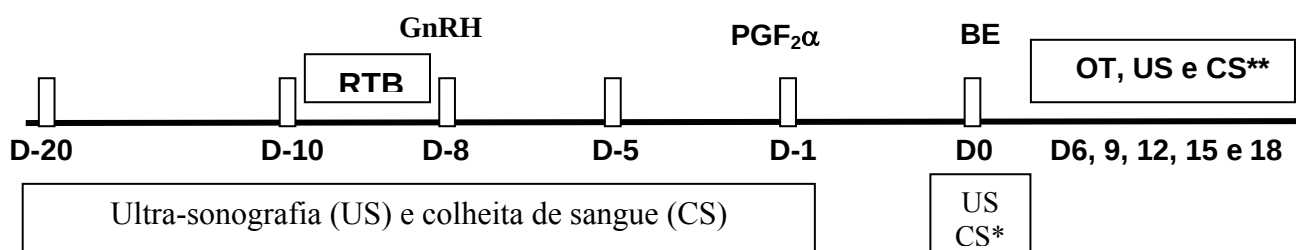
Grupo RTB/GPE:

No D-10, os bezerros foram removidos de suas respectivas mães por 48 horas (RTB = remoção temporária dos bezerros), para eliminar o efeito negativo da presença do bezerro sobre o eixo hipotálamo-hipófise-ovário.

No dia -8 (D-8), a presença de folículos pré-ovulatórios foi determinada por meio de ultra-sonografia e a ovulação e o recrutamento de uma onda de crescimento folicular foram induzidos pela administração de um análogo do GnRH (50 µg de lecorelina, via IM, Gestran plus[®]). No dia -5 (D-5) as ovulações, induzidas pelo GnRH, foram confirmadas através de ultra-sonografia, pela visualização de corpo lúteo recém formado. Quatro dias mais tarde (D-1) os animais receberam injeção IM de um agente luteolítico (250 µg de dl-cloprostenol, via IM, Prolise[®]) e no dia 0 (D0) foi administrado 1,0 mg de benzoato de estradiol (BE, via IM, Estrogin[®]) para induzir ovulação do folículo dominante. Neste mesmo dia foram coletadas duas amostras de sangue, uma antes e a segunda, seis horas após a administração de BE, para determinar-se a concentração plasmática de estradiol 17-β por meio de radioimunoensaio.

Nos dias 6, 9, 12, 15 e 18 após a aplicação de BE (D6, 9, 12, 15 e 18, respectivamente, Figura 1) foram administradas 50 UI de Ocitocina (IV, Ocitocina Univet[®], Univet, São Paulo, Brasil) e as amostras de sangue foram colhidas imediatamente antes e 30 minutos após a administração da ocitocina, para determinação das concentrações plasmáticas de PGFM (13,14-diidro 15-ceto prostaglandina F₂α).

Os níveis de estradiol induzidos por este tratamento deverão ser suficientes para evitar a lise prematura do CL formado após a ovulação induzida pelo BE. Em outras palavras, espera-se que após a administração de BE, o desafio com ocitocina (realizado entre os dias 6 e 18) não provoque elevação acentuada nos níveis plasmáticos de PGFM, devido à falta de receptores para este peptídeo.



BE: benzoato de estradiol; OT: ocitocina.

CS*: colheita de sangue antes e 6 horas após administração de BE.

CS**: colheita de sangue antes e 30 minutos após a administração de OT.

Figura 1. Tratamentos, ultra-sonografia e colheitas de sangue realizadas nos animais do grupo RTB/GPE.

Grupo RTB/GPE/eCG:

Neste grupo os animais, além do protocolo RTB/GPE, receberam 400 UI de eCG (via IM, Novormon[®]), logo após a administração do agente luteolítico (D-1). A comparação simultânea com o grupo RTB/GPE permite avaliar o possível efeito benéfico do eCG no desenvolvimento folicular e/ou na indução da ovulação.

Espera-se que a administração de eCG (possui atividade semelhante ao FSH e LH), ao estimular o crescimento e a esteroidogênese folicular, aumente a taxa de ovulação após a administração de BE. A maior produção de estradiol (aumento da esteroidogênese) somada a administração exógena de estradiol (BE, 1,0 mg) deverá propiciar níveis plasmáticos deste esteróide suficientemente elevados para provocar diminuição dos receptores de ocitocina e evitar resposta ao desafio com ocitocina, ou seja, não ocorrendo elevação acentuada nos níveis plasmáticos de PGFM.

Grupo RTB/GPG/eCG:

Protocolo idêntico ao anterior (RTB/GPE/eCG), exceto que no lugar de BE foi administrada uma segunda dose GnRH (50 µg de deslorelina, IM, D0). Conseqüentemente, este grupo serviu de controle para o Grupo RTB/GPE/eCG, ou seja, o desafio com ocitocina foi realizado em animais que ovularam num ambiente hormonal com menor concentração de estradiol, do que o dos animais dos grupos RTB/GPE ou RTB/GPE/eCG.

Neste grupo, a substituição do BE pelo GnRH deverá originar níveis plasmáticos de estradiol inferiores aos tratamentos anteriores. Portanto, apesar do GnRH induzir ovulação, é provável que o desafio com ocitocina induza elevação nas concentrações plasmáticas de PGFM, devido à presença de receptores para este hormônio, e ocorra lise prematura do CL.

2.3 Colheita de sangue e técnicas de Radioimunoensaio

As colheitas de sangue foram realizadas por venopunção da jugular (tubos Vacutainer® com heparina). Após a colheita, as amostras (10 mL) foram imediatamente centrifugadas a 900 x g por 20 minutos e o plasma obtido armazenado a -20 °C, até o momento da análise por meio de técnicas de radioimunoensaio.

As concentrações plasmáticas de progesterona foram determinadas de acordo com a técnica de radioimunoensaio descrita por Knickerbocker et al. [28], modificadas por Carriere e Lee [29]. Os coeficientes de variação intra e inter-ensaios foram de 5,0 e 8,6%, respectivamente.

As concentrações plasmáticas de estradiol foram determinadas, em único ensaio, com “Kit” da DSL Estradiol 3ª Geração (DSL 39100, Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, Texas). O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 3,0%.

As concentrações plasmáticas de PGFM foram determinadas de acordo com a técnica de radioimunoensaio descrita por Meyer et al. [30]. Os coeficientes de variação intra-ensaios foram de 5,6, 8,4 e 15,1% e os coeficientes de variação inter-ensaios foram de 1,4, 0,7 e 0,2% para referências contendo 50, 500 e 1000 pg/mL de PGFM, respectivamente.

Considerou-se como dia da luteólise quando a concentração plasmática de progesterona foi menor ou igual a 50% das médias das concentrações plasmáticas de progesterona das duas amostras anteriores.

2.4 Análise Estatística

Utilizou-se a ANOVA para estimar os efeitos de tratamento, “priming” de progesterona e a interação nas variáveis discretas e utilizou-se split-plot ANOVA para estimar os efeitos de tratamento, priming de P4, dia do ciclo estral e interações nas variáveis com repetição no tempo. A ANOVA foi utilizada para analisar os resultados da concentração plasmática de estradiol.

3. Resultados

3.1 Taxa de ovulação

A taxa de ovulação, em todos os animais, foi determinada após a segunda aplicação de GnRH (grupo RTB/GPG/eCG) ou após a administração de BE (grupos RTB/GPE e RTB/GPE/eCG). Não houve diferença significativa ao comparar-se a taxa de ovulação dos animais dos três grupos experimentais (Tabela 1). Os animais que não ovularam foram excluídos dos grupos experimentais.

Tabela 1. Taxa de ovulação após a segunda aplicação de GnRH ou após a administração de BE em animais dos grupos RTB/GPE, RTB/GPE/eCG e RTB/GPG/eCG, com (+) e sem (-) “priming” de progesterona (P4).

GRUPOS				TOTAL
“Priming” de progesterona	RTB/GPE (%)	RTB/GPE/eCG (%)	RTB/GPG/eCG (%)	
+	2/3 (66)	3/4 (75)	2/2 (100)	7/9 (77)
-	3/7 (42)	4/6 (66)	6/8 (75)	13/21 (62)
TOTAL	5/10 (50)	7/10 (70)	8/10 (80)	20/30 (66)

Não houve diferença significativa na taxa de ovulação ($p > 0,05$)

3.2 – Progesterona

Antes do desafio com ocitocina (D-20 a D0):

A média das concentrações plasmáticas de progesterona, observada em cada animal, durante este período (D-20 ao D0) foi menor para as vacas sem ($1,24 \pm 0,30$ ng/mL,

n=13) em comparação às com “priming” de progesterona ($3,70 \pm 0,41$ ng/mL, $p < 0,05$, n=7, figura 2), não havendo diferença significativa ($p = 0,1$) quando esta comparação foi realizada entre os três grupos experimentais (RTB/GPE = $3,06 \pm 0,48$ ng/mL; RTB/GPE/eCG = $2,69 \pm 0,40$ ng/mL; RTB/GPG/eCG = $1,64 \pm 0,43$ ng/mL).

Quando somadas as concentrações plasmáticas diárias de progesterona de cada animal, durante este período (D-20 a D0), observou-se que a média desta somatória para as vacas sem “priming” foi menor ($8,80 \pm 1,73$ ng/mL) em comparação às com “priming” de progesterona ($22,07 \pm 2,30$ ng/mL, $p < 0,01$). Entretanto, quando essa comparação foi realizada entre os animais dos grupos RTB/GPE ($18,34 \pm 2,73$ ng/mL), RTB/GPE/eCG ($16,14 \pm 2,28$ ng/mL) e RTB/GPG/eCG ($11,83 \pm 2,44$ ng/mL) não se observou diferença significativa ($p = 0,2$).

Durante o desafio com ocitocina (D6 a D18)

Não houve diferença significativa ao compararem-se as médias das concentrações plasmáticas de progesterona durante este período (D6 a D18) tanto nos animais dos grupos RTB/GPE ($6,58 \pm 0,93$ ng/mL), RTB/GPE/eCG ($7,33 \pm 0,77$ ng/mL) e RTB/GPG/eCG ($6,58 \pm 0,83$ ng/mL; $p = 0,8$) quanto nos animais com (8,44±0,78 ng/mL) e sem “priming” de P4 ($5,52 \pm 0,59$ ng/mL; $p = 0,2$, figura 2).

Quando somadas as concentrações plasmáticas de progesterona de cada animal, durante este período (D6 a D18), observou-se que a média desta somatória para as vacas sem “priming” foi menor ($27,59 \pm 2,93$ ng/mL) em comparação às com “priming” de progesterona ($40,72 \pm 3,91$ ng/mL, $p < 0,01$). Entretanto, quando essa comparação foi realizada entre os animais dos grupos RTB/GPE ($32,93 \pm 4,64$ ng/mL), RTB/GPE/eCG

(36,64±3,88 ng/mL) e RTB/GPG/eCG (32,89±4,14 ng/mL) não se observou diferença significativa ($p=0,8$).

A média da maior concentração plasmática de progesterona durante este período foi menor para as vacas sem (7,71±0,58 ng/mL) em comparação às com “priming” de progesterona (10,04±0,78 ng/mL; $p=0,03$), não ocorrendo diferença significativa ($p=0,7$) quando a comparação ocorreu entre os grupos experimentais (RTB/GPE = 8,92±0,93 ng/mL; RTB/GPE/eCG= 9,38±0,77 ng/mL; RTB/GPG/eCG = 8,33±0,83 ng/mL).

Nas vacas sem “priming” de progesterona, houve diminuição das concentrações de progesterona no dia 18 (D18) tanto nos tratamentos com BE como GnRH. Entretanto, nos animais com “priming”, os tratamentos com BE promoveram manutenção de altas concentrações de progesterona, enquanto as vacas que receberam GnRH para indução da ovulação apresentaram queda na progesterona no dia 18 (interação tratamento x “priming” de progesterona x dia; tabela 2).

Tabela 2. Concentrações plasmáticas de progesterona (P_4 , média ± EPM) 18 dias após a indução da ovulação com BE ou GnRH em animais com (+) ou sem (-) “priming” de P_4 .

“Priming” de P_4	Tratamento	P_4 (ng/mL)
+	BE (n=5)	8,89 ± 1,27 ^a
	GnRH (n=2)	2,13 ± 1,05 ^b
-	BE (n=7)	2,22 ± 0,56 ^b
	GnRH (n=6)	1,35 ± 0,22 ^b

Letras diferentes $p < 0,01$ (interação tratamento x “priming” de progesterona x dia)

A média da concentração plasmática de progesterona observada em cada animal, entre os dias D-20 e D18 foi maior ($p<0,01$) nas vacas com “priming” (5,71±0,42 ng/mL) em

comparação às sem “priming” de progesterona ($3,31 \pm 0,31$ ng/mL, figura 2), não havendo diferença quando essa comparação foi realizada entre os grupos RTB/GPE ($4,66 \pm 0,42$ ng/mL), RTB/GPE/eCG ($4,79 \pm 0,41$ ng/mL) e RTB/GPG/eCG ($4,06 \pm 0,44$ ng/mL, $p=0,5$, figuras 3 e 4).

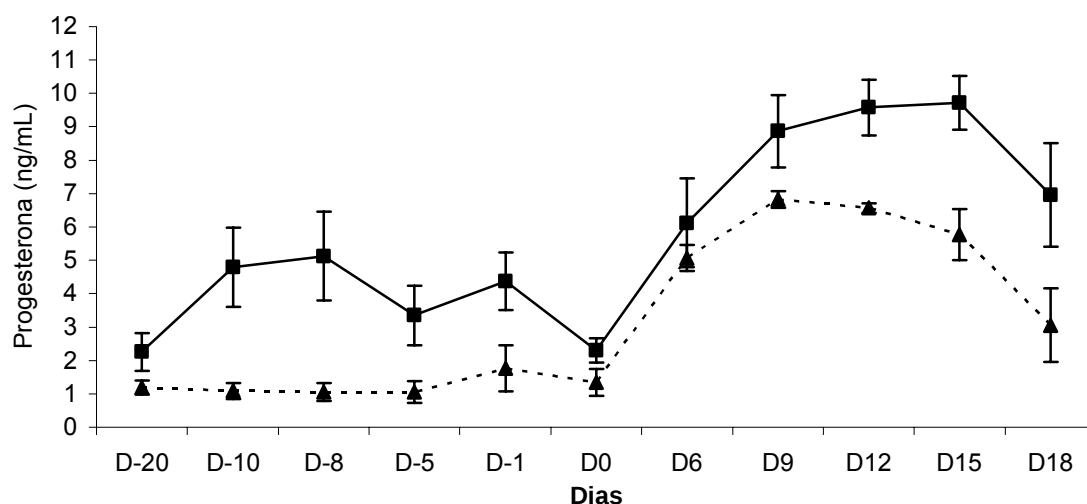


Figura 2. Concentrações plasmáticas de progesterona (média $\pm$ EPM) nos animais com (—, $n=7$) e sem (---, $n=13$) “priming” de progesterona entre os dias -20 (D-20) e 18 (D18).

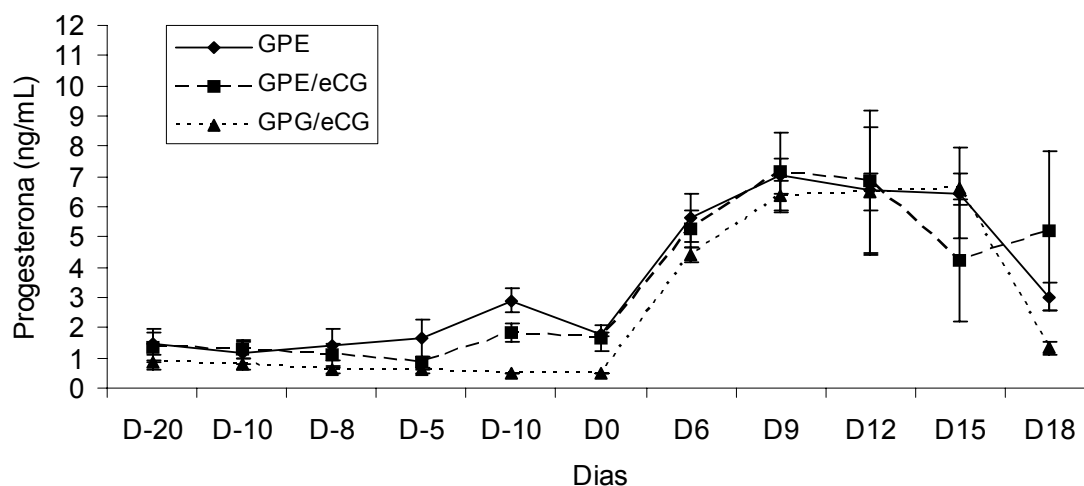


Figura 3. Concentrações plasmáticas de progesterona (média $\pm$ EPM) nos animais sem “priming” de progesterona dos grupos RTB/GPE ($n=3$), RTB/GPE/eCG ($n=4$) e RTB/GPG/eCG ($n=6$) entre os dias -20 (D-20) e 18 (D18).

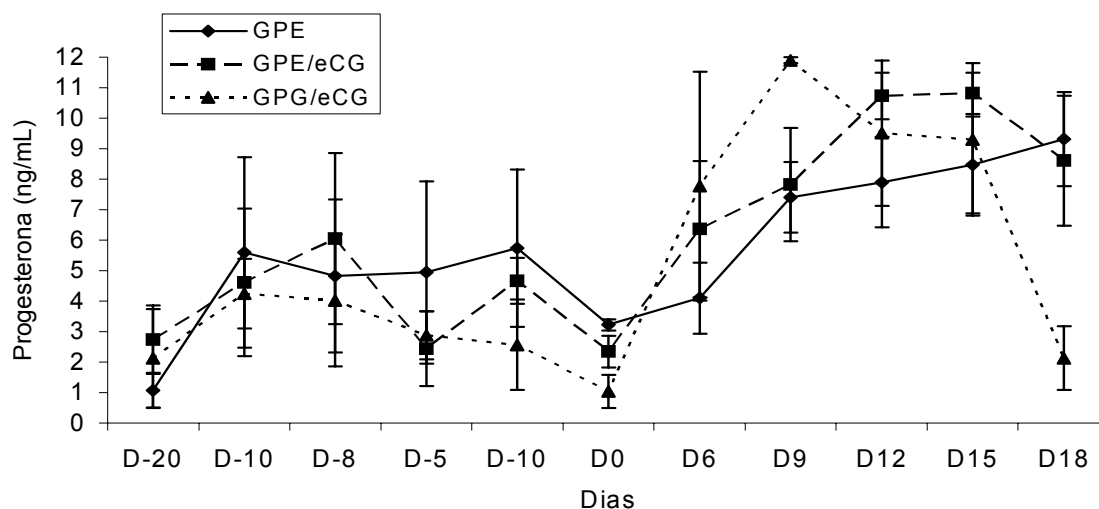


Figura 4. Concentrações plasmáticas de progesterona (média $\pm$ EPM) nos animais com “priming” de progesterona dos grupos RTB/GPE (n=2), RTB/GPE/eCG (n=3) e RTB/GPG/eCG (n=2) entre os dias -20 (D-20) e 18 (D18).

3.3 – Estradiol

Houve aumento na concentração plasmática de estradiol, seis horas após administração de BE, nos animais dos grupos RTB/GPE e RTB/GPE/eCG. O mesmo não foi observado nos animais do grupo RTB/GPG/eCG, que receberam uma segunda dose de GnRH no lugar de BE (Figura 5). A análise da concentração plasmática de estradiol foi realizada somente nos animais sem “priming” de progesterona.

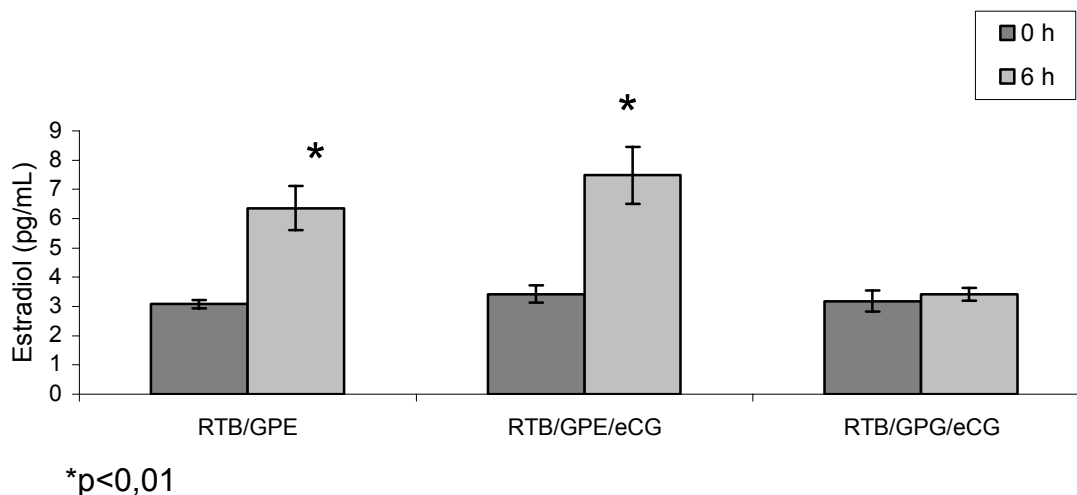


Figura 5. Concentrações plasmáticas de estradiol (média $\pm$ EPM) nos animais dos grupos RTB/GPE (n=3), RTB/GPE/eCG (n=4) e RTB/GPG/eCG (n=6) antes (0 h) e 6 horas após a administração de BE (grupos RTB/GPE e RTB/GPE/eCG) ou GnRH (grupo RTB/GPG/eCG).

3.4 – Prostaglandina $F_2\alpha$

A produção de PGFM em resposta à ocitocina aumentou entre os dias 6 e 18 (efeito de dia) e tal aumento foi mais pronunciado nos animais sem “priming” de progesterona (efeito de “priming” de P_4 x dia; $p < 0,05$; figuras 6 e 7), não havendo diferença quando essa comparação foi realizada entre os grupos RTB/GPE, RTB/GPE/eCG e RTB/GPG/eCG. As concentrações plasmáticas de PGFM no dia 6 dos animais com “priming” de progesterona não foram determinadas.

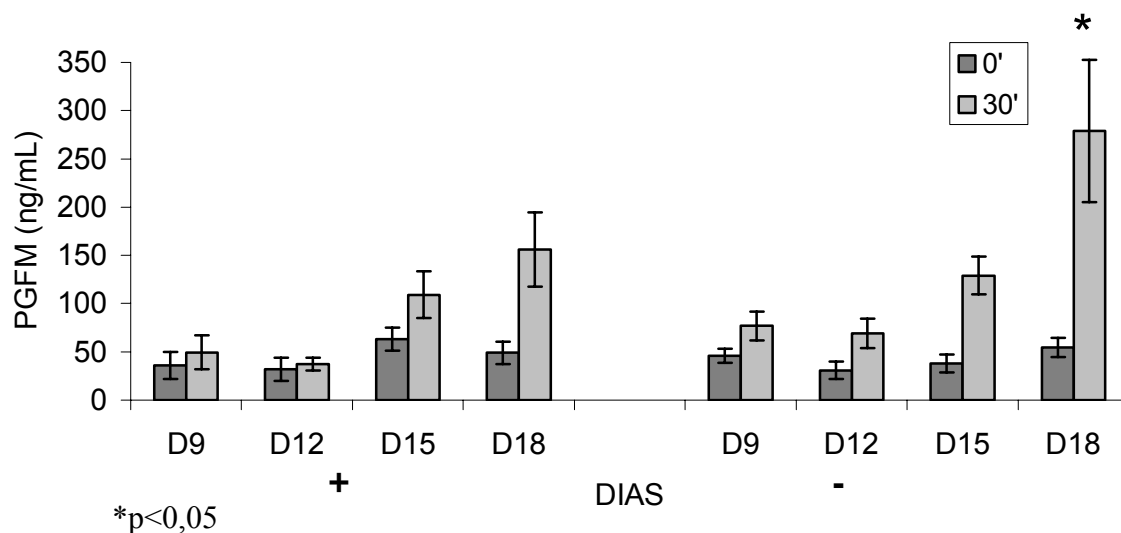


Figura 6. Concentrações plasmáticas de PGFM (média $\pm$ EPM) nos animais com (+, n=7) e sem (-, n=13) “priming” de progesterona, antes (0') e 30 (30') minutos após a administração de ocitocina (OT) entre os dias 9 (D9) e 18 (D18) do protocolo experimental.

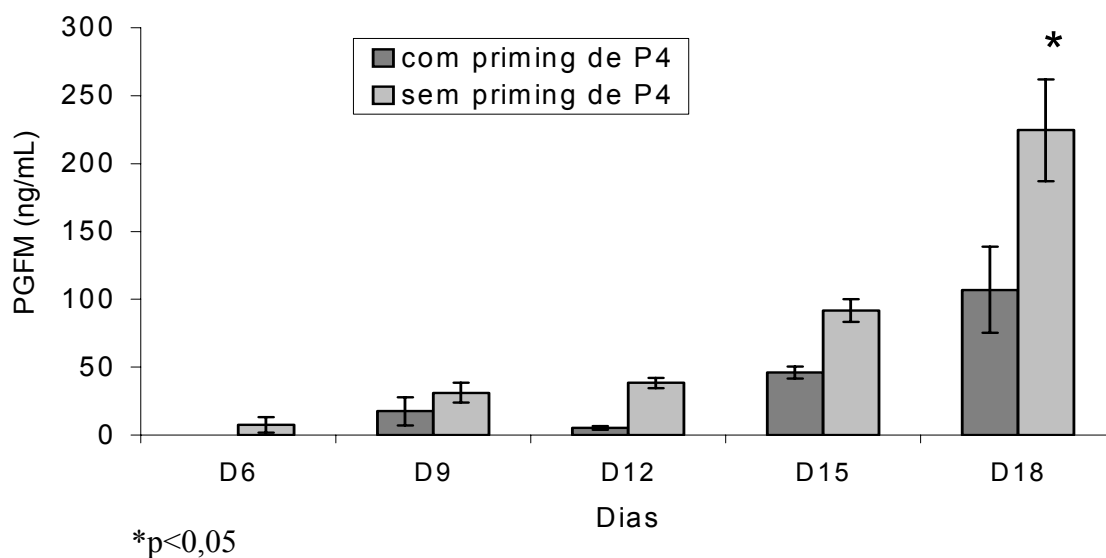


Figura 7. Diferença da concentração plasmática de PGFM antes e 30 minutos após a administração de ocitocina, entre os dias 6 (D6) e 18 (D18) do protocolo experimental, nos animais com (n=7) e sem (n=13) “priming” de progesterona.

3.5 – Luteólise

Nos animais sem “priming” de progesterona, observou-se luteólise prematura (até 18 dias após a administração de BE ou GnRH) em 84,6% (11/13) dos animais, enquanto que nos animais com “priming” de progesterona este evento só foi observado em 42% (3/7) dos animais ($p < 0,01$, figura 8). Não houve diferença significativa ($p = 0,3$) quando esta comparação foi realizada entre os grupos RTB/GPE, RTB/GPE/eCG e RTB/GPG/eCG.

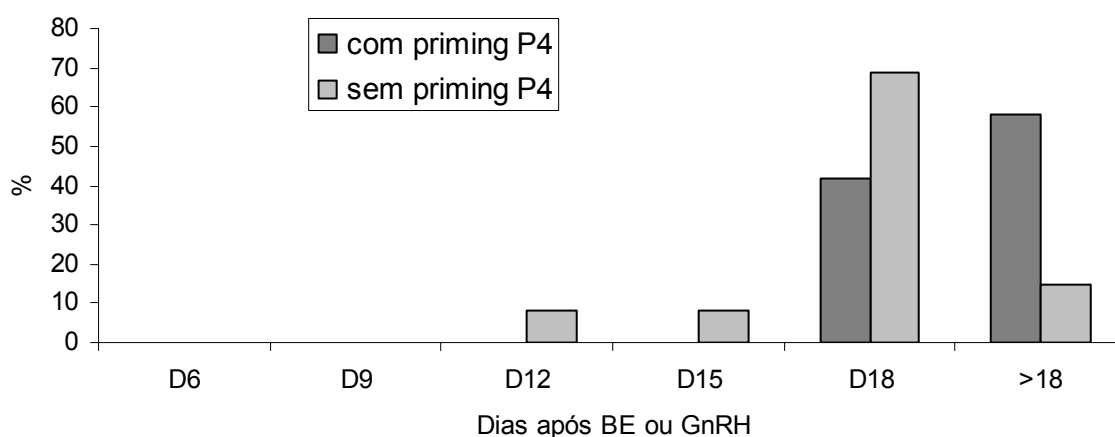


Figura 8. Frequência de luteólise nos animais com e sem “priming” de progesterona entre os dias 6 (D6) e 18 (D18) após a administração de BE ou GnRH.

4. Discussão

A liberação de PGFM entre os dias D6 e D18 (figura 1), induzida pela administração de ocitocina, bem como a incidência de ciclos curtos foi menor nas vacas “com” quando comparadas às “sem priming” de progesterona. Entretanto, altas concentrações

de estradiol, no período pré-ovulatório, não foram eficientes em reduzir a liberação de PGFM.

Os três tratamentos (RTB/GPE, RTB/GPE/eCG e RTB/GPG/eCG), induziram taxa de ovulação média de 66%, incluindo vacas ciclando (77%) e em anestro pós-parto (62%). De forma semelhante, Souza et al. [26] demonstraram, em vacas Nelore em anestro, que a administração de GnRH induziu a ovulação em apenas 54,5% (12/22) das vacas tratadas com os protocolos GPE/eCG e RTB/GPE/eCG, corroborando os resultados obtidos por Figueiredo et al. [31] em vacas Nelore tratadas com o protocolo GPE (60%).

Fernandes et al. [15] relataram taxas de prenhez de 40 a 45% em vacas Nelore ciclando tratadas com os protocolos GPE e GPG. Entretanto, quando testados em animais em anestro, estes tratamentos não foram eficientes, resultando em baixas taxas de prenhes após a IATF (19,1% para o grupo GPE e 14,9% para o GPG).

A ineficiência dos protocolos GPE e GPG em vacas em anestro pós-parto pode ser explicado em parte pela baixa taxa de ovulação após a primeira administração de GnRH (vacas de corte – 66%, [32]; vacas de leite – 64% de ovulação, [33]. Para que haja uma maior eficiência na sincronização, o GnRH deve causar a ovulação do folículo dominante e induzir a emergência de uma nova onda de crescimento folicular dentro de 2 a 3 dias após o tratamento [12,34,35,36,37]. Assim, 6 a 7 dias mais tarde, a maioria dos animais estarão em estágio de desenvolvimento folicular similar no momento da administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e, conseqüentemente, haverá melhor sincronização da ovulação após a administração de GnRH (GPG, [12,38,39,40] ou estrógeno (GPE, [15,17,31].

Outra explicação para a baixa taxa de prenhez após o uso destes protocolos em animais em anestro é a ausência de “priming” de progesterona. Acredita-se que após o parto as

vacas necessitam de um primeiro contato com a progesterona ("priming") para que se desenvolva um corpo lúteo com vida funcional normal [19,20,21,22,23,24].

Parkinson et al. [41] demonstraram que a progesterona inibe receptores endometriais de OT e propuseram ser este o mecanismo pelo qual a P_4 bloqueia a secreção de $PGF_{2\alpha}$. Da mesma forma, Zollers et al. [42] observaram redução na quantidade de receptores de ocitocina no endométrio de vacas pós-parto após tratamento com implante de norgestomet, sugerindo um efeito similar ao da P_4 , já que o norgestomet atua através de ligação a receptores de P_4 [43].

Por outro lado, diversos trabalhos mostraram menor secreção de E_2 por folículos que originaram CL de regressão precoce [44,45,46,47,48]. Lamming & Mann [49,50], verificaram em vacas ciclando que altos níveis pré-ovulatórios de E_2 diminuíram temporariamente a concentração de receptores endometriais de OT, reduzindo a secreção de $PGF_{2\alpha}$. Observaram também que vacas ovariectomizadas, tratadas com altas doses de estradiol, apresentavam baixa concentração plasmática de PGFM após administrações intravenenosas de ocitocina, enquanto que nos animais tratados com baixas doses de estradiol as concentrações de PGFM encontravam-se elevadas após o desafio com ocitocina [25].

Baseados nos resultados acima, propuseram que a vida curta do primeiro CL pós-parto está relacionada ao fato do folículo dominante não se desenvolver o suficiente para produzir concentrações elevadas de estradiol, que seriam responsáveis pela diminuição dos receptores de ocitocina no endométrio uterino [25]. Se houver disponibilidade de receptores no endométrio uterino, a interação da ocitocina com os mesmos induziria liberação prematura de $PGF_{2\alpha}$ e lise do corpo lúteo.

Levando-se em consideração a hipótese levantada por Mann e Laming [25], o protocolo GPE foi modificado com o objetivo de se induzir, em vacas de corte com 40 a 70 dias pós-

parto, a formação de um folículo dominante capaz de produzir quantidades suficientes de estradiol para promover "down regulation" dos receptores de ocitocina, de forma a evitar a liberação prematura de $\text{PGF}_2\alpha$.

De fato, a administração de BE (1,0 mg, IM) no presente estudo foi efetiva em induzir aumento nas concentrações plasmáticas de estradiol nos animais dos grupos RTB/GPE e RTB/GPE/eCG (6,92 pg/ml, 6 horas após a aplicação de BE), em comparação aos animais do grupo RTB/GPG/eCG (3,42 pg/ml), que receberam 50 µg de GnRH. Burke et al. [51], encontraram níveis máximos de estradiol ($29,1 \pm 2,9$ pg/ml) 24 horas após a administração intramuscular de 1,0 mg de BE em animais ciclando, cujos folículos com diâmetro superior a 4 mm haviam sido aspirados por meio de agulha guiada por ultrassonografia.

Deve-se destacar que todos os protocolos hormonais utilizados no presente estudo foram precedidos pela remoção temporária de bezerro, com a finalidade de aumentar a pulsatilidade de LH nas vacas em anestro [52,53] e, potencialmente, favorecer o crescimento folicular e as ovulações [31,54,55].

Souza [56] reportou que vacas Nelore (40 a 70 dias pós-parto), cujos bezerros foram removidos por 48 h antes do tratamento GPE/eCG, apresentaram aumento na taxa de prenhes, quando comparadas as do grupo GPE/eCG sem RTB [46/98 (46,9%) vs. 34/111 (30,6%), respectivamente, $p < 0,05$], tanto em animais "ciclando" (46,3% vs. 34,9%), como em anestro (47,4% vs. 23,4%). Entretanto, quando este experimento foi repetido em outra fazenda [56], não se observou aumento significativo na taxa de prenhes ao comparar-se o protocolo RTB/GPE/eCG com o GPE/eCG [38/100 (38%) vs. 24/76 (31,5%), $p > 0,05$].

Embora a concentração plasmática de estradiol no presente experimento fosse mais elevada nos animais dos grupos GPE e GPE/eCG, quando comparados aos do grupo

GPG/eCG, a produção de PGFM em resposta ao desafio com ocitocina aumentou entre os dias D6 e D18 (figura 1) e tal aumento foi mais pronunciado nos animais sem “priming” de progesterona, não havendo diferença quando essa comparação foi realizada entre os grupos GPE, GPE/eCG e GPG/eCG. Estes resultados diferem dos observados em vacas ovariectomizadas tratados com diferentes doses de estradiol. Mann & Lamming [25] relataram que, após desafio com ocitocina exógena, os animais tratados com altas doses de estradiol (0,9 mg, IM) apresentaram baixa secreção de PGFM plasmática (10 pg/mL), enquanto que os animais tratados com baixas doses de estradiol (0,2 mg) responderam ao desafio com ocitocina, liberando altas concentrações de PGFM plasmática (41,4 pg/mL).

No presente estudo, houve maior incidência de luteólise prematura nos animais “sem” em comparação aos “com priming” de progesterona. Este resultado está de acordo com o observado por Sá Filho et al. [57], em vacas Nelore, em anestro pós-parto, tratadas com óleo de caroço de algodão (IM, grupo controle); 17 β -estradiol (1mg, IM, grupo E2); progesterona por 6 dias (CIDR, grupo P4) ou com progesterona por 6 dias e 17 β -estradiol (grupo P4+E2). Os tratamentos com progesterona foram efetivos em prevenir ciclos curtos (82,6 % vs 20,8%; controle vs grupos com P4, respectivamente), enquanto o tratamento apenas com 17 β -estradiol não diferiu do grupo controle (75,0% vs 82,6%).

Estes autores concluíram que o tratamento com progesterona por seis dias antes da indução da ovulação, em vacas Nelore em anestro, foi efetivo em evitar a luteólise prematura, enquanto que a administração de 1 mg de 17 β -estradiol não preveniu efetivamente a ocorrência de ciclos curtos.

No presente experimento, nos animais com “priming” de progesterona, os tratamentos com benzoato de estradiol (RTB/GPE e RTB/GPE/eCG, tabela 2) promoveram manutenção de concentrações elevadas de progesterona 18 dias após a indução de

ovulação, indicando um possível efeito benéfico da utilização de protocolos hormonais com benzoato de estradiol em animais com “priming” de progesterona. Corroborando estes resultados, Sá Filho et al. [58] observaram incidência de 5,6% de ciclos curtos ao tratarem vacas em anestro com progesterona e estradiol, enquanto vacas tratadas somente com progesterona apresentaram 21,9% de ciclos curtos. Os resultados destes experimentos são indicativos de um possível efeito benéfico da associação entre progesterona e estradiol na manutenção do CL.

5. Conclusões

- O aumento nas concentrações plasmáticas de estradiol no período pré-ovulatório, induzida por tratamentos hormonais (grupos RTB/GPE e RTB/GPE/eCG), não foi eficiente em inibir a liberação endógena de PGFM, induzida pela administração de ocitocina.
- Em vacas Nelore, em anestro pós-parto, a liberação endógena de PGFM, em resposta ao desafio com ocitocina e a incidência de luteólise prematura (ciclo curto), foram menores nos animais “com” em comparação aos “sem priming” de progesterona.
- Nos animais com “priming” de progesterona, os tratamentos com benzoato de estradiol (RTB/GPE e RTB/GPE/eCG) promoveram manutenção de concentrações elevadas de progesterona 18 dias após a indução de ovulação, indicando um possível efeito benéfico da utilização de protocolos hormonais com benzoato de estradiol em animais com “priming” de progesterona.

6. Referências

- [1] Meirelles, FV, Rosa, AJM, Lôbo, BR. Is the American Zebu really *Bos indicus* ? Genetics and Molecular Biology 1999;22:543-547.
- [2] Associação dos criadores de Nelore do Brasil – ACNB, <http://www.nelore.org.br>
- [3] Barros, CM, Figueiredo, RA, Pinheiro, OL. Estro, ovulação e dinâmica folicular em zebuínos. Rev. Bras. Reprod. Anim 1995;19:9-22.
- [4] Pinheiro, OL, Barros, CM, Figueredo, RA, Valle, ER do, Encarnação, RO, Padovani, CR. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F₂ α or norgestomet and estradiol valerate. Theriogenology 1998;49:667-81.
- [5] Mizuta, K. 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, 98p. Dissertação (doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Departamento de Reprodução Animal – Universidade de São Paulo.
- [6] Pierson, RA, Ginther OJ. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. Theriogenology 1998;29:21-37.
- [7] Savio, JD, Keenan, L, Boland, MP, Roche, JF. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle of heifers. J. Reprod. Fert. 1988;83:663-71.
- [8] Sirois, J, Fortune, JE. Ovarian follicular dynamics during the estrus cycle in heifers monitored by Real-Time Ultrasonography. Biol. Reprod. 1998;39:308-17.

- [9] Twagiramungu, H, Guibault, LA, Proulx, J, Villeuve, P, Dufour, JJ. Synchronization of estrus and fertility in beef cattle with two injections of buserelin and prostaglandin. *Theriogenology* 1992a;38:1131-44.
- [10] Twagiramungu, H, Guibault, LA, Proulx, J, Villeuve, P, Dufour, JJ. Influence of a agonist of Gonadotropin-Releasing Hormone (Buserelin) on estrus synchronization and fertility in beef cows. *J. Anim. Sci.* 1992b;70:1904-10.
- [11] Thatcher, WW, Drost, M, Savio, JD, Macmillan, KL, Entwistle, KW, Schimitt, EJ, de La Sota, RL, Morris, GR New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 1993;33:27-49.
- [12] Pursley, JR, Mee, MO, Wiltbank, MC. Synchronization of ovulation in dairy cattle using GnRH and PGF₂ α . *Theriogenology* 1995;44:915-23.
- [13] Barros, CM, Moreira, MBP, Fernandes, P. Manipulação farmacológica do ciclo estral para melhorar programas de inseminação artificial ou de transferência de embriões. *Arq. Fac.Vet., UFRGS* 1998;26:179-89.
- [14] Barros, CM, Moreira, MBP, Figueiredo, AR, Teixeira, AB, Trinca, LA. Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using GnRH, PGF₂ α and estradiol benzoate. *Theriogenology* 2000;53:1121-1134.
- [15] Fernandes, P, Teixeria, AB, Crocci, AJ, Barros, CM. Timed artificial insemination in beef cattle using GnRH agonist. PGF₂ α and estradiol benzoate. *Theriogenology* 2001;55:1521–1532.
- [16] Bo, GA, Baruselli, PS, Martinez, MF. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos Indicus* cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 2003;78:307-326.
- [17] Wiltbank, MC, Pursley, JR, Fricke, PM, Vasconcelos, J, Guenther, JN, Gibbons, JR, Ginther, OJ. Development of IA and ET programs that do not require detection of estrus using recent information on follicular growth. In: *Annual*

- Convention Portland, 15, Oregon. Proceedings...Oregon: American Embryo Transfer Association 1996, p.23-44, 1996.
- [18] Pursley, JR, Wiltbank, MC, Stevenson, JS, Ottobre, JS, Garverick, HA, Anderson, LL Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J. Dairy Sci.* 1997;80:295–300.
 - [19] Hunter, MG. Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. *J. Reprod. Fertil.*, 1991;43:91-99.
 - [20] Garverick, HA, Zollers, WG, Smith, M.F. Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. *Anim. Reprod. Sci.*, 1992;28:111-124.
 - [21] Yavas, Y, Walton, JS. Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: a review. *Theriogenology* 2000a;54:25-55.
 - [22] Yavas, Y, Walton, JS. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. *Theriogenology* 2000b;54:1-23.
 - [23] Peter, AT, Bosu, WTK, Liptrap, RM, Cummings, E. Temporal changes in serum prostaglandin F2 α and oxytocin in dairy cows with short luteal phases after the first postpartum ovulation. *Theriogenology* 1989;32:277-284.
 - [24] Stagg, K, Spicer, LJ, Sreenan, JM, Roche, JF, Diskin, MG. Effect of calf isolation on follicular wave dynamics, gonadotropin and metabolic hormone changes, and interval to first ovulation in beef cows fed either of two energy levels postpartum. *Biol. Reprod.* 1988;59:777-783.
 - [25] Mann, GE, Lamming, GE. The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrus cycle in the cow. *Anim. Reprod. Sci.* 2000;64:171-180.

- [26] Souza, AF, Pinheiro, VG, Ereno, RL, Barros, CM. Synchronization of ovulation in anestrous nelore cows treated with hormonal protocol without progesterone or progestagens. *Reproduction, Fertility and Development* 2006;18:117 (abstract).
- [27] Lowmam BG, Scott NA, Somerville SH. Condition scoring of cattle: the east of Scotland. Edinburgh: College of Agriculture, 1976. p. 1-31 (Bulletin 6)
- [28] Knickerbocker JJ, Thatcher WW, Bazer FW, Drost M, Barron DH, Ficher KB, Roberts RM. Protein secreted by Day 16 to 18 bovine conceptuses extends corpus luteum function in cows. *J Anim Sci* 1986;77:381-91.
- [29] Carriere PD, Lee B. Direct radioimmunoassay of progesterone in bovine plasma using danazol (17- α -2,4-pregnadien-20-yno(2,3-d)isoxazol-17-ol) as a displacing agent. *Can. J. Vet. Res.* 1994; 58:230-233.
- [30] Meyer MD, Hansen PJ, Thatcher WW, Drost M, Badinga L, Roberts RM, Li TL, Bazer FW. Extension of corpus luteum lifespan and reduction of uterine secretion of prostaglandin F₂ α of cows in response to recombinant interferon-tau. *J. Dairy Sci* 1995; 78:1921-1931.
- [31] Figueiredo, RA. Tratamentos hormonais para viabilizar a inseminação artificial com tempo predeterminado em vacas e novilhas da raça Nelore. Tese de Doutorado, Instituto de Biociência, UNESP, Botucatu - SP, p.80, 2002.
- [32] Geary, TW, Whittier, JC, Hallford, DM, Macneil, MD. Calf removal improves conception rates to the Ovsynch and CO-Synch protocols. *J. Anim. Sci.* 2001;79:1-4.
- [33] Vasconcelos, JL, Silcox, MRW, Pursley, JR, Wiltbank, MC. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 1999;52:1067-1078.

- [34] Thatcher, WW, Macmillan, KL, Hansen, PJ, Drost, M. Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology* 1989;31:149-64.
- [35] Guilbault, LA, Lussier, JG, Grasso, F, Matton, P. Influence of a GnRH analogue on follicular dynamics in cow pretreated or not with FSH-P. *Theriogenology* 1990;33:240 (abstract).
- [36] Macmillan, KL, Thatcher, WW. Effect of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol. Reprod.* 1991;45:883-9.
- [37] Twagiramungu, H, Guilbault, LA, Proulx, J, Dufour, JJ. Influence of corpus luteum and induced ovulation on ovarian follicular dynamics in postpartum cyclic cows treated with buserelin and cloprostenol. *J. Anim. Sci.* 1994;72:1796-805.
- [38] Burke, JM, de La Sota, RL, Risco, CA, Staples, CR, Schimitt, EJP, Thatcher, WW. Evaluation of timed insemination using a gonadotropin-releasing hormone agonist in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 1996;79:1385-93.
- [39] Moreira, MBP. Sincronização da ovulação em vacas da raça Nelore. Botucatu, 1997. 81p. dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista.
- [40] Gambini, ALG, Moreira, MBP, Castilho, C, Barros, CM. Follicular dynamics and synchronization of ovulation in Girolando cows. *Biol. Reprod.* 1997;56:195 (abstract).
- [41] Parkinson, TJ, Jenner, LJ, Lamming, GM. Comparison of oxytocin/prostaglandin F_{2a} interrelationships in cyclic and pregnant cows. *J. Reprod. Fertil.* 1990; 90:337-345.

- [42] Zollers, WG, Garverick, HA, Smith, MF. Concentrations of progesterone and oxytocin receptors in endometrium of postpartum cows expected to have a short or normal oestrus cycle. *J. Reprod. Fertil.* 1993;97:329-337.
- [43] Moffatt, RJ, Zollers, WG, Welshons, WV, Kieborz, MA. Basis of norgestomet action as a progestogen in cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 1993;10:21-30.
- [44] Garverick, HA, Parfet, JR, Lee, CN, Copelin, JP, Youngquist, RS, Smith, MF. Relationship of pre- and post-ovulatory gonadotropin secretion to subnormal luteal function in postpartum beef cattle. *J. Anim. Sci.* 1988;66:104-111.
- [45] Braden, TD, King, ME, Odde, KG, Niswender, GD. Development of preovulatory follicles expected to form short-lived corpora lutea in beef cows. *J. Reprod. Fertil.*, 1989a;85:97-104.
- [46] Braden, TD, King, ME, Odde, KG, Niswender, GD. Functional and morphological characteristics of the first corpus luteum after parturition in ewes. *J. Reprod. Fertil.* 1989b;86:525-533.
- [47] Sheffel, CE, Pratt, BR, Ferrel, WL, Inskeep, EK. Induced corpora lutea in postpartum cows. II. Effects of treatments with progestogen and gonadotropins. *J. Anim. Sci.*, 1982;54:830-836.
- [48] Garcia-Winder, M, Lewis, PE, Deaver, DR, Smith, VG, Lewis, GS, Inskeep, EK. Endocrine profiles associated with lifespan of induced corpora lutea in postpartum beef cows. *J. Anim. Sci.* 1986;62:1353-1362.
- [49] Lamming, GE, Mann, GE. A dual role for progesterone in the control of cyclicity in domestic ruminants. *J. Reprod. Fertil.* 1995a;49:561-566.
- [50] Lamming, GE, Mann, GE. Control of endometrial oxytocin receptors and prostaglandin F_{2a} responses to oxytocin in ovariectomized cows by progesterone and oestradiol. *J. Reprod. Fertil.* 1995b;103:69-73.

- [51] Burke CR, Mussard ML, Gasser CL, Grum DE, Day ML. Estradiol benzoate delays new follicular wave emergence in a dose-dependent manner after ablation of the dominant ovarian follicle in cattle. *Theriogenology* 2003;60:647-658.
- [52] Edwards S. The effect of short term calf removal on pulsatile LH secretion in the postpartum beef cow. *Theriogenology* 1985;23:777-85.
- [53] Williams GL, Griffith Mk. Sensory and behavioural control of gonadotrophin secretion during suckling-mediated anovulation in cows. *J Reprod Fertil Suppl.* 1995;49:463-75.
- [54] Meneghetti, M, Vilela, ER, Vasconcelos, JLM. Efeito da remoção dos bezerros nos folículos dominante e na taxa de ovulação ao primeiro GnRH em protocolos de sincronização em vacas Nelore em anestro. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 2001;25(3):286-288.
- [55] Quintans, CJ, Donaldson, MJ, Bertolino, MV, Pasqualini, RS. Birth resulting from transfer of blastocysts cryopreserved with propanediol after spontaneous hatching. *Reprod Biomed Online* 2003;6(1):66-8.
- [56] Souza, AF. Inseminação Artificial em tempo fixo (IATF) utilizando protocolos hormonais com ou sem fonte exógena de progesterona, associadas ou não a remoção temporária de bezerros (RTB). Botucatu, 2006, 76p. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas, Área de Farmacologia) – Instituto de Biociências de Botucatu – Departamento de Farmacologia – Universidade Estadual Paulista – UNESP.
- [57] Sá Filho, OG, Dias, CC, Vasconcelos, JLM. Efeito do tratamento com progesterone e/ou 17 β -estradiol antes da indução da ovulação na duração do subsequente corpo lúteo em vacas Nelore em anestro. *Acta Scientiae Veterinariae* 2006a;34:286 (abstract).

- [58] Sá Filho, OG, Dias, CC, Vasconcelos, JLM. Effect of progesterone or 17p-estradiol on luteal lifespan in anoestrous Nelore cows. J. Anim. Sci. 2006b;84(1):207 (abstract).