

Luciano Mundim de Carvalho

**Caracterização ultra-sonográfica do
desvio folicular ovariano em vacas da
raça Nelore (*Bos taurus indicus*)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Reprodução Animal.

Botucatu - SP
2005

Luciano Mundim de Carvalho

**Caracterização ultra-sonográfica do
desvio folicular ovariano em vacas da
raça Nelore (*Bos taurus indicus*)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Moraes Barros

Botucatu - SP
2005

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

Carvalho, Luciano Mundim de.

Caracterização ultra-sonográfica do desvio folicular ovariano em vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) / Luciano Mundim de Carvalho. – 2005.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2005.

Orientador: Ciro Moraes Barros

Assunto CAPES: 50504002

1. Bovino - Reprodução 2. Nelore (Bovino) - Reprodução
3. Obstetrícia veterinária 4. Ginecologia veterinária

CDD 636.208982

Palavras-chave: *Bos indicus*; Dinâmica folicular; Desvio folicular; Folículo dominante; Nelore; Ovário

A ciência poderá ter achado a cura para a maioria dos males,
mas não achou ainda remédio para o pior de todos:
a apatia dos seres humanos.

Helen Keller

Os ideais que iluminaram meu caminho e sempre
me deram coragem para enfrentar a vida com alegria foram
a Verdade, a Bondade e a Beleza.

Albert Einstein

Falai aos animais, em lugar de lhes bater.

Tolstoi

Dedico este trabalho

Aos meus Pais

Por todo amor, apoio, ensinamentos e oportunidades que me deram, às vezes, esquecendo de seus próprios sonhos.

Ao meu irmão

Não importa a diferença do nosso sangue, o amor nos uniu.

A minha saudosa Vó

Por todo amor e zelo dispensado à família, em sua vida terrena.

A minha namorada Milena

Por toda dedicação e amor.

Agradecimentos

Ao meu orientador **Prof. Dr. Ciro Moraes Barros**, pela sua dedicação ao trabalho, paciência e compreensão.

Ao colega de mestrado **Evandro Sartorelli e Sartorelli**, pela contribuição ao longo de todo o projeto de mestrado.

Ao meu colega de mestrado **Marcelo Machado Gonzaga Ferreira**, pela ajuda na realização do projeto.

Ao **Prof. Dr. Donald Bergfelt**, da Universidade de Wisconsin pelas dicas e auxílio na interpretação dos resultados.

Ao meu colega de profissão e amigo **Luiz Philipe C. Porto**, por inúmeros conselhos e dicas, essenciais para a conclusão deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Francisco Stefano Wechsler** do Departamento de Produção e Exploração Animal, por ter disponibilizado parte dos animais.

Aos **Profs. Dr. Mário De Beni Arrigoni e Dr. Antônio Carlos Silveira**, do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal por ter cedido espaço no confinamento para alojar os animais.

Ao **Prof. Dr. Heraldo César Gonçalves**, do Departamento de Produção e Exploração Animal por ter cedido espaço para estocagem dos alimentos para os animais.

À **Prof^a. Dr^a. Luzia A. Trinca** pelo auxílio nas análises estatísticas e pela enorme simpatia com que sempre me atendeu.

Ao **Sr. Domingues**, proprietário da Fazenda Vale do Rio do Peixe, por ter disponibilizado parte dos animais, bem como cedido suas instalações.

Aos funcionários do Confinamento da FMVZ, **Wilson e Sidney** por toda ajuda indispensável e companheirismo durante o experimento.

Aos funcionários da Seção Pós-graduação **Denise, Maria e Regina** pelo excelente atendimento que me ofereceram durante o mestrado.

Ao funcionário da Supervisão das Fazendas da FMVZ **Carlos Godoy** por todo o apoio e auxílio nos imprevistos ocorridos na fazenda.

À funcionária da Biblioteca **Selma Maria** pela elaboração da ficha catalográfica, correção das referências bibliográficas e gentileza com que me atendeu.

Aos amigos **Kazuo, Carla, Zitinho e Lidia**, que fizeram parte desta história.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão da bolsa de mestrado.

Muito Obrigado!

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1. Introdução e Objetivo.....	pg. 14
2. Revisão da Literatura.....	pg. 18
3. Material e Método.....	pg. 32
4. Resultados.....	pg. 36
5. Discussão.....	pg. 48
6. Conclusão.....	pg. 54
7. Referências Bibliográficas.....	pg. 55

Lista de Abreviaturas

µg	- micrograma
BE	- benzoato de estradiol
CIDR	- dispositivo intravaginal liberador de progesterona
CL	- corpo lúteo
EPM	- erro padrão da média
F 1	- Folículo dominante
F 2	- Maior folículo subordinado
F 3	- Segundo maior folículo subordinado
FSH	- hormônio folículo estimulante
GnRH	- hormônio liberador de gonadotrofinas
HPB	- holandês preto e branco
IGF-1	- fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IGF-2	- fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2
IGFBP-2	- proteína ligante do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2
IGFBP-4	- proteína ligante do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 4
IGFBP-5	- proteína ligante do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 5
IM	- via intramuscular
Kg	- quilograma

LH	- hormônio luteinizante
LHr	- receptor do hormônio luteinizante
mg	- miligrama
MHz	- mega hertz
mm	- milímetro
NDT	- nutrientes digeríveis totais
ng	- nanograma
P₄	- progesterona
PB	- proteína bruta
PGF_{2α}	- prostaglandina F _{2α}
RNA_m	- ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR	- reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase
US	- ultra-sonografia

Lista de Figuras

Figura 01. Protocolo de sincronização da ovulação e acompanhamento do desenvolvimento folicular ovariano em vacas Nelorepg. 33

Figura 02. Padrão de crescimento dos dois maiores folículos (F1 = folículo dominante; F2 = folículo subordinado), durante a primeira onda folicular da vaca 09pg.39

Figura 03. Padrão de crescimento dos dois maiores folículos (F1 = folículo dominante; F2 = folículo subordinado), durante a primeira onda folicular da vaca 18pg.40

Figura 04. Padrão de crescimento dos dois maiores folículos (F1 = folículo dominante; F2 = folículo subordinado), durante a primeira onda folicular da vaca 36pg.40

Figura 05. Padrão de crescimento dos dois maiores folículos (F1 = folículo dominante; F2 = folículo subordinado), durante a primeira onda folicular da vaca 43pg.41

Figura 06. Padrão de crescimento dos dois maiores folículos (F1 = folículo dominante; F2 = folículo subordinado), durante a primeira onda folicular da vaca 46pg.41

Figura 07. Padrão de crescimento dos dois maiores folículos (F1 = folículo dominante; F2 = folículo subordinado), durante a primeira onda folicular da vaca 50pg.42

Figura 08. Padrão de crescimento dos dois maiores folículos (F1 = folículo dominante; F2 = folículo subordinado), durante a primeira onda folicular da vaca 170pg.42

Figura 09. Padrão de crescimento dos dois maiores folículos (F1 = folículo dominante; F2 = folículo subordinado), durante a primeira onda folicular da vaca 357pg.43

Figura 10. Padrão de crescimento dos dois maiores folículos (F1 = folículo dominante; F2 = folículo subordinado), durante a primeira onda folicular da vaca 388pg.43

Figura 11. Padrão de crescimento dos dois maiores folículos (F1 = folículo dominante; F2 = folículo subordinado), durante a primeira onda folicular da vaca 467pg.44

Figura 12. Padrão de crescimento dos dois maiores folículos (F1 = folículo dominante; F2 = folículo subordinado), durante a primeira onda folicular da vaca 588pg.44

Figura 13. Padrão de crescimento dos dois maiores folículos (F1 = folículo dominante; F2 = folículo subordinado), ajustado para o momento do desvio folicular em 11 vacas Nelore.....pg.46

Lista de Tabelas

Tabela 01: Diâmetro dos folículos pré-ovulatório e intervalo entre a aplicação do benzoato de estradiol (BE) e a ovulação, em vacas Nelore submetidas a tratamento hormonal para sincronizar a ovulação.....pg.37

Tabela 02: Diâmetro folicular e momento do desvio, determinado pela observação gráfica ou calculado pelo método de Regressão Linear Segmentada, em vacas Nelore.pg.45

Tabela 03: Taxa de crescimento (mm/12 h) do folículo dominante (F1) e do maior folículo subordinado (F2), 12 horas antes e 12 horas após o desvio folicular em vacas Nelore.....pg.47

RESUMO

O desvio ou divergência folicular é um momento importante da seleção folicular, onde pela primeira vez, nota-se uma diferença significativa na taxa de crescimento entre os dois maiores folículos ovarianos. A seleção folicular tem sido estudada intensamente em raças européias (*Bos taurus taurus*), porém pouco estudada em raças zebuínas (*Bos taurus indicus*).

Objetivou-se com o presente trabalho determinar as características morfológicas do desvio associadas a primeira onda folicular do ciclo estral de vacas da raça Nelore. A partir do dia da ovulação, os três maiores folículos (F1, F2 e F3) tiveram seu desenvolvimento acompanhado por ultra-sonografia transretal, realizada a cada 12 h, até o sexto dia após a ovulação. Em cada animal (n= 11), o momento do desvio foi determinado graficamente usando inspeção visual do perfil de crescimento dos F1, F2 e as vezes F3 (desvio observado) e matematicamente, usando análise de regressão linear segmentada para comparar as diferenças de diâmetro entre F1 e F2, e as vezes F3 (desvio calculado). Os resultados da determinação do momento do desvio usando os métodos matemático e observado, não foram significativamente diferentes. Utilizando-se a média dos resultados dos dois métodos, o momento do desvio ocorreu 2,4 dias após a ovulação, quando o F1 atingiu 6,1 mm. Concluiu-se que, o diâmetro do futuro folículo dominante no momento do desvio folicular foi de aproximadamente 6,1 mm em vacas da raça Nelore, cerca de 2,4 dias após a ovulação.

ABSTRACT

Follicle diameter deviation is defined as the beginning of the differential change in growth rates between the largest and next largest follicles subsequent to wave emergence and is considered a key component of follicle selection. Follicle selection has been extensively studied in European breeds of cattle (*Bos taurus*) but has not been critically studied in Zebu breeds (*Bos indicus*). The objective of the present study was to determine the morphological characteristics of deviation associated with the first post-ovulatory wave (Wave 1) of the estrous cycle in nonlactating cows. Beginning on the day of ovulation (day 0), the three largest follicles (F1–F3, respectively) were individually tracked every 12 h for 6 d using transrectal ultrasonography. In individual animals (n=11), deviation was determined graphically using visual inspection of the diameter profiles of F1, F2 and sometimes F3 (observed deviation) and mathematically using segmented regression analysis of the diameter differences between F1 and F2 or sometimes F3 (calculated deviation). The results of determining the beginning of deviation in cows using the observed and calculated methods were not significantly different. Averaged over both methods, diameter deviation occurred 2.4 d after ovulation when F1 reached 6.1 mm in cows. It is concluded that the future dominant follicle has 6.1 mm at the time of deviation in Nelore cows, 2.4 days after ovulation.

1. Introdução e Objetivo

Devido à facilidade de adaptação ao ambiente tropical, os zebuínos (sub-espécie *Bos taurus indicus*, Meirelles et al., 1999) predominam em muitos países do hemisfério sul, contrastando com o hemisfério norte onde prevalecem as raças européias (*Bos taurus taurus*). A raça Nelore é o gado de corte predominante no Brasil (ANUALPEC, 2004), criado principalmente em regime extensivo.

Apesar da semelhança entre os animais zebuínos e europeus, diversos autores descreveram diferenças nas características reprodutivas, tanto morfológicas quanto fisiológicas e comportamentais. Estas diferenças são determinadas por fatores genéticos, ambientais, nutricionais e de manejo. Sabe-se, por exemplo, que a duração do estro, assim como o tamanho dos folículos pré-ovulatórios geralmente são menores nas raças zebuínas quando comparadas às taurinas (Figueiredo et al., 1997). Estas características reprodutivas são importantes porque podem influenciar o tipo de tratamento hormonal a ser utilizado em programas de inseminação artificial ou transferência de embriões.

Embora a dinâmica folicular, processo contínuo de crescimento e regressão dos folículos que leva ao desenvolvimento do folículo pré-ovulatório (Lucy et al., 1992), seja semelhante entre raças zebuínas e taurinas, algumas diferenças têm sido registradas. O diâmetro máximo dos folículos ovarianos em raças zebuínas (11 a 13 mm) como a Nelore

(Figueiredo et al., 1997) e a Gir (Gambini et al., 1998), parece ser menor que os valores entre 15 a 20 mm observados em novilhas (Savio et al., 1988; Ginther et al., 1989; Knopf et al., 1989) e vacas de raças européias (Murphy et al., 1990; Taylor & Rajamahendran, 1991). Entretanto, em estudo comparativo entre vacas das raças Nelore (zebuíno) e Angus (taurino), realizado com vacas criadas em clima tropical (Brasil), Mizuta (2003) observou que o diâmetro dos folículos pré-ovulatórios destes animais, não diferiam significativamente entre si. Por outro lado, tem sido relatado que os ovários de novilhas zebuínas apresentam maior quantidade de folículos menores que 5 mm e baixo número de folículos maiores que 5 mm, quando comparadas à novilhas taurinas (Segerson et al., 1984; Buratini et al., 2000).

O padrão de crescimento e atresia de um grupo de folículos ovarianos é denominado onda de crescimento folicular (Lucy et al., 1992). Cada onda folicular é composta por uma fase de recrutamento, na qual um grupo de folículos primordiais e primários inicia seu crescimento. Dentre estes, um folículo é selecionado, não sofre atresia e potencialmente pode ovular (fase de seleção). O folículo selecionado passa a exercer dominância sobre os demais folículos, suprimindo o crescimento dos mesmos e inibindo o recrutamento de um novo grupo de folículos (Hodgen, 1982; Ireland & Roche, 1987; Ginther et al., 1989 e 1996; Sirois & Fortune, 1990).

O início da seleção folicular pode ser observado, através do exame ultra-sonográfico freqüente dos ovários, como uma diferença (desvio ou divergência) visível entre o diâmetro do folículo dominante (F1) e o maior folículo subordinado (F2). Segundo Ginther et al. (1996) o desvio ou divergência folicular é caracterizado pelo crescimento contínuo do futuro folículo dominante e redução ou parada de crescimento dos folículos menores.

Estudando a primeira onda de crescimento folicular em novilhas da raça Holandesa Preto e Branco (HPB), Ginther et al. (1996, 1997, 2001b) observaram que o desvio folicular ocorre ao redor do segundo dia após a ovulação, ocasião em que o folículo dominante atinge cerca de 8,5 mm de diâmetro. Enquanto, Castilho (2003) e Sartorelli (2003) observaram que o desvio em novilhas da raça Nelore ocorre 3,5 e 2,8 dias após a ovulação, quando o folículo dominante atinge cerca de 7,2 e 5,7 mm, respectivamente. Contudo, são raros os dados para animais zebuínos.

Apesar das inúmeras publicações sobre o assunto em raças taurinas, ainda existem dúvidas de como o mecanismo de desvio folicular é ativado. Sabe-se que é um processo dinâmico regulado por interações entre gonadotrofinas, fatores de crescimento e substâncias intra-ovarianas (Austin et al., 2001; Yuan et al., 1998). Trabalhos publicados por Ginther et al. (2001a) destacam a importância do aparecimento de receptores para LH no futuro folículo dominante, enquanto que Fortune et al. (2001) reforçam o papel dos fatores de crescimento semelhantes à

insulina (IGFs), suas proteínas ligantes (IGFBPs) e as IGFBPproteases no processo de divergência folicular.

Segundo Ginther (1998), o grande interesse em torno do estudo das ondas de crescimento folicular, particularmente o momento do desvio, é motivado por duas razões: 1) o desejo de se resolver o mistério que envolve o mecanismo de seleção de um único folículo ovulatório nas espécies monovulares e 2) a necessidade de informações básicas que permitam o desenvolvimento de novos protocolos de sincronização e superovulação.

Este trabalho faz parte de um projeto mais amplo que visa caracterizar o momento do desvio folicular em vacas e novilhas da raça Nelore, bem como verificar o papel do LH e seus receptores, IGFs (fatores de crescimento semelhantes à insulina) e IGFBPs (proteínas ligantes de IGFs) além de outros fatores intra-ovarianos envolvidos no mecanismo de desvio folicular; com o intuito de adquirir informações básicas que permitam o desenvolvimento de novos protocolos de sincronização da ovulação e superestimulação dos folículos ovarianos.

Objetivou-se com o presente trabalho determinar as características morfológicas do desvio associadas a primera onda folicular do ciclo estral de vacas da raça Nelore.

2. Revisão da Literatura

Dinâmica folicular

O processo contínuo de crescimento e regressão dos folículos, que leva ao desenvolvimento do folículo pré-ovulatório, é conhecido como dinâmica 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).

A dinâmica folicular de bovinos de raças europeias é caracterizada pela presença de duas (Pierson & Ginther, 1988; Knopf et al., 1989; Ginther et al., 1989) ou três (Ireland & Roche, 1987; Sávio et al., 1988; Sirois & Fortune, 1988) ondas de crescimento folicular e esporadicamente uma ou quatro ondas (Sávio et al., 1988; Sirois & Fortune, 1988; Murphy et al., 1990; Lopez, et al., 2005). Em vacas zebuínas da raça Nelore foi observado predomínio de duas ondas de crescimento folicular, ao passo que em vacas Gir e novilhas Nelore ou Brahman a ocorrência de três ondas foi mais freqüente (Barros et al., 1995; Rhodes et al., 1995; Figueiredo et al., 1997; Gambini et al., 1998). Cada onda folicular dura aproximadamente 10 dias (variação de 6 a 15 dias, Wiltbank et al., 1996).

Em ciclos estrais de duas ondas, a maturação do segundo folículo dominante coincide com a regressão do corpo lúteo (CL), conseqüentemente, este folículo ovula após a luteólise fisiológica (Sávio et al., 1988; Sirois & Fortune, 1988; Taylor & Rajamahendran, 1991). Por outro lado, se o ciclo for de três ondas, o segundo folículo dominante

regride permitindo a emergência da terceira onda folicular. Tem sido relatado, tanto para raças européias (Ginther et al., 1989) como zebuínas (Figueiredo et al., 1997), que o intervalo médio entre as ovulações é mais curto para ciclos com duas ondas (cerca de 20 dias), quando comparado a ciclos de três ondas de crescimento folicular (aproximadamente 23 dias).

Com relação ao tamanho dos folículos ovarianos, o diâmetro máximo dos mesmos em raças zebuínas (11 a 13 mm) como a Nelore (Figueiredo et al., 1997) e a Gir (Gambini et al., 1998), parece ser menor que os valores entre 15 a 20 mm observados em novilhas (Savio et al., 1988; Ginther et al., 1989; Knopf et al., 1989) e vacas de raças européias (Murphy et al., 1990; Taylor & Rajamahendran, 1991). Entretanto, em estudo comparativo entre vacas das raças Nelore (zebuíno) e Angus (taurino), realizado em vacas criadas no estado de São Paulo, Mizuta (2003) observou que o diâmetro dos folículos pré-ovulatórios destes animais não diferiam significativamente entre si. Por outro lado, tem sido relatado que os ovários de novilhas zebuínas apresentam maior quantidade de folículos menores que 5 mm e baixo número de folículos maiores que 5 mm, quando comparadas a novilhas taurinas (Segerson et al., 1984; Buratini et al., 2000).

O desenvolvimento folicular na espécie bovina envolve o recrutamento de um grupo de folículos para iniciar o crescimento (fase de recrutamento). Dentre estes, um folículo é selecionado, não sofre atresia

e potencialmente pode ovular (fase de seleção). O folículo selecionado passa a exercer dominância sobre os demais folículos, suprimindo o crescimento dos mesmos e inibindo o recrutamento de um novo grupo de folículos (fase de dominância; Hodgen, 1982; Ireland & Roche, 1987; Ginther et al., 1989 e 1996; Sirois & Fortune, 1990). Na presença de altas concentrações plasmáticas de progesterona, há decréscimo na frequência de pulsos de LH (Roberson et al., 1989). Conseqüentemente, o folículo dominante falha em ovular, perde a dominância e sofre atresia (Ginther et al., 1989, Lucy et al., 1992; Stock & Fortune, 1993). Desta forma, é somente por ocasião da luteólise, quando as condições hormonais são favoráveis (progesterona < 1,0 ng/ml), que o folículo dominante poderá ovular.

Nos ovinos e bovinos a lise do corpo lúteo é causada pela liberação de $\text{PGF2}\alpha$ proveniente do endométrio uterino (Horton & Poyser, 1975). O sinal hormonal que leva à liberação de $\text{PGF2}\alpha$ em quantidades luteolíticas é o estradiol proveniente dos folículos ovarianos, principalmente do folículo dominante pré-ovulatório. Mcracken et al., (1984), propuseram que o estradiol 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 $\text{PGF2}\alpha$. Whates et al. (1983 e 1984) e Fields et al. (1985 e 1992) corroboraram esta hipótese ao demonstrarem que a ocitocina é de fato secretada pelo corpo lúteo e interage com receptores endometriais

próprios (Fuchs et al., 1990) para estimular a secreção de $\text{PGF2}\alpha$ (Gross et al., 1988; Putney et al., 1989).

Desvio ou Divergência Follicular

Ginther et al. (1997) utilizaram o termo desvio ou divergência follicular para definir o momento em que se nota pela primeira vez uma diferença significativa na taxa de crescimento entre os dois maiores folículos ovarianos, ou seja, a divergência follicular é caracterizada pelo crescimento contínuo do futuro folículo dominante e redução ou parada de crescimento do segundo maior folículo.

O mecanismo de divergência deve ser capaz de evitar o crescimento de futuros folículos subordinados porque, tanto eles quanto o futuro folículo dominante, são capazes de exercer dominância, como indicam estudos envolvendo a ablação de folículos (Ginther, 2000). A administração de FSH no início da onda follicular ou de anti-soro contra inibina impede ou atrasa a divergência follicular, como indica o desenvolvimento de mais de um folículo dominante após estes tratamentos (Ginther, 2000).

Ginther et al. (1997) postularam que uma pequena diferença no diâmetro dos dois maiores folículos no final da fase de crescimento paralelo (início do desvio) seria suficiente para permitir o estabelecimento de dominância pelo maior folículo antes que o segundo maior folículo pudesse atingir um diâmetro similar. Apesar da simplicidade desta

afirmação, os mecanismos, através do qual esta vantagem de tamanho é utilizada para estabelecer a divergência folicular, são bastante complexos.

Em novilhas da raça HPB (*Bos taurus taurus*) o desvio folicular ocorre ao redor do segundo dia após a ovulação. Ocasão em que o futuro folículo dominante atinge cerca de 8,5 mm (Ginther et al., 1996 e 1997). Os dados obtidos por Ginther et al. (1999), ao comparar a cada 8 horas o diâmetro dos dois maiores folículos de uma onda, sugerem que o futuro folículo dominante estabelece a dominância em menos de 8 horas.

Segundo Beg et al. (2002) o processo de seleção folicular é regulado sistemicamente pelo FSH e LH e localmente por fatores que modulam a ação das gonadotrofinas. Além de outros fatores que, possivelmente, agem independentemente das gonadotrofinas (Armstrong et al., 1997).

Relação Recíproca FSH-Folículo

O aumento nas concentrações sanguíneas de FSH, observado um a dois dias antes de cada onda folicular, é considerado fundamental para o início das ondas foliculares durante o ciclo estral (Adams et al., 1992; Ginther et al., 1999). Quando o maior folículo da nova onda folicular atinge 4-5 mm de diâmetro os níveis de FSH começam a declinar e aproximadamente três dias mais tarde ocorre o desvio folicular. Após o início do desvio as concentrações de FSH continuam a diminuir por 10 a 20 horas, em novilhas da raça HPB. Durante o intervalo entre o início do

declínio de FSH até o início do desvio, vários folículos contribuem para a diminuição nos níveis de FSH. Paradoxalmente, o declínio do FSH é causado pelos folículos, no entanto, os mesmos continuam a precisar de FSH para seu crescimento, como indica um estudo no qual a redução das concentrações de FSH abaixo dos níveis encontrados durante a fase média do declínio de FSH, induziu diminuição no diâmetro dos três maiores folículos presentes (Ginther et al., 2001b).

No início da divergência folicular a relação recíproca FSH-folículo muda de vários folículos induzindo o declínio de FSH para apenas um folículo fazendo este papel. Ou seja, a partir do momento do desvio, somente o folículo dominante contribui para o declínio de FSH, mesmo dependendo deste hormônio para continuar seu crescimento. De acordo com Ginther et al. (2001b), no início da divergência folicular ocorrem alterações no desenvolvimento do maior folículo que o tornam responsivo a baixas concentrações de FSH, as quais são inadequadas para o desenvolvimento dos outros folículos.

O declínio transitório das concentrações de FSH, próximo ao momento da divergência, é considerado componente chave do mecanismo de divergência folicular. Tal fato baseia-se, em suplementações experimentais de FSH durante a fase de crescimento comum, impedindo que ocorra a divergência, e permitindo a co-dominância (Mihm et al., 1997). Corroborando esta hipótese, Lopez et al. (2005), observaram significativo aumento nas concentrações de FSH,

entre 6 e 24 horas antes do momento da divergência folicular, em vacas com 2 ou 3 folículos co-dominantes.

Estradiol e Inibina

O estradiol é produzido pelo folículo ovariano a partir da interação entre as células da teca e da granulosa e das gonadotrofinas hipofisárias. O LH estimula a enzima P450_{scc} a transformar o colesterol em andrógenos no interior das células da teca interna. A enzima aromatase, sob estímulo do FSH, converte parte dos andrógenos em estrógenos nas células da granulosa (Austin & Short, 1984; Wiltbank et al., 1996)

Nos bovinos, os níveis de estradiol na circulação começam a aumentar quando se inicia o desvio (Kulick et al., 1999; Ginther et al., 2000). Tem sido demonstrado experimentalmente que o aumento ou decréscimo na concentração de estradiol, no momento esperado do desvio, resulta em decréscimo ou aumento, respectivamente, na concentração de FSH circulante, indicando uma relação funcional entre estes dois hormônios (Kulick et al., 1999; Ginther et al., 2000; Beg et al., 2003). Portanto, acredita-se que um aumento de estradiol plasmático ocasionado pelo maior folículo (futuro dominante), no momento em que se espera a ocorrência do desvio, esteja envolvido na supressão dos níveis de FSH abaixo do nível requerido pelos folículos menores (futuros subordinados) (Ginther et al., 2000).

Além de participar na regulação da secreção do FSH, o estradiol está envolvido em importantes funções autócrinas e parácrinas, tais como a proliferação celular (Bley et al., 1997), aumento da atividade da enzima aromatase P-450, aumento na expressão dos receptores de LH (LHr) e capacidade de promover uma maior sensibilidade do folículo dominante aos hormônios FSH e LH (Ginther et al., 2001b).

Vários trabalhos têm mostrado um aumento na concentração de estradiol, no fluido folicular do futuro folículo dominante, no momento esperado do início do desvio ou um pouco antes da ocorrência do mesmo (Mihm et al., 2000; Beg et al., 2001; 2002), sugerindo ser um fator intra-folicular crítico que promove o aumento da responsividade para gonadotrofinas no momento do desvio (Ginther et al., 2003).

O maior folículo ovariano no momento esperado de se iniciar o desvio (8,5 mm de diâmetro) possui maior capacidade de suprimir o FSH do que quando possui apenas 7,5 mm. Esta capacidade adicional, deste folículo de 8,5 mm suprimir o FSH sistêmico, pode estar relacionada à ação combinada do estradiol e a inibina (Kaneko et al., 1995).

As frações protéicas do fluido folicular, que incluem as inibinas, são capazes de produzir modificações nos níveis de FSH circulante. (Kastelic et al., 1990; Turzillo et al., 1993; Ginther, et al., 2001b). A atividade supressora da inibina sobre a secreção de FSH, tem sido demonstrada tanto por um aumento nas concentrações de FSH após a ablação de folículos (Ginther, 2000), como pela diminuição do FSH após tratamento

com frações protéicas do fluído folicular (Bergfelt, et al., 2000). Além disso, a administração de anti-soro contra inibina aumenta a concentração plasmática de FSH, bem como o número de folículos grandes e ovulações (Ginther, 2000).

Kaneko et al. (1995 e 1997) relataram que a concentração circulante total de inibina aumenta concomitantemente com a emergência das ondas e com o aumento do estradiol. Observaram também que o tratamento com uma substância anti-inibina cinco dias após o estro (aparentemente após o início do desvio) resultou em um aumento do FSH (Kaneko et al., 1997), sugerindo que a inibina deve participar na diminuição dos níveis de FSH que ocorre após a divergência folicular nos bovinos (Ginther et al., 2001b).

Afora o efeito sistêmico relacionado à supressão na liberação de FSH, a possível ação local da inibina durante o desvio folicular ainda é bastante controversa. Em novilhas, não foram observadas quaisquer diferenças nas concentrações de folistatina, inibina-A e várias outras formas de inibina com diferentes pesos moleculares no fluído folicular dos três maiores folículos (Mihm et al., 2000). Da mesma forma, no momento esperado para o desvio (8,5mm, em novilhas HPB), também não foi encontrada diferença na quantidade de inibina total e inibina-A entre o folículo dominante e o maior subordinado (Beg et al., 2001).

Ginther et al. (2002) ao promoverem ablação do futuro folículo dominante no momento esperado do desvio (8,5 mm), observaram que o

segundo maior folículo tornou-se dominante e dentre as diversas modificações que sofreu, detectou-se um ligeiro aumento de Activina-A no fluido folicular deste folículo. As implicações deste aumento na concentração de Activina-A no segundo maior folículo, que se tornou dominante, ainda precisam ser investigadas em estudos subseqüentes.

Em resumo, a inibina parece ser o principal agente responsável pela supressão sistêmica do FSH durante a fase de crescimento que antecede a divergência folicular nos bovinos. Entretanto, as concentrações sanguíneas de estradiol aumentam próximo ao início do desvio e, possivelmente, tanto a inibina quanto o estradiol contribuem para o contínuo declínio nas concentrações de FSH após o desvio.

Importância do LH

Existem evidências na literatura de que a aquisição de receptores de LH (LHr) é importante para a manutenção do folículo selecionado após a diminuição nos níveis sanguíneos de FSH. Além disso, discute-se também a possível participação do LH no início do processo de divergência folicular.

Em novilhas, as concentrações de LH aumentam entre 32 e 24 horas antes do desvio, mantendo-se elevadas por 48 horas, quando começam a declinar (Kulick et al., 1999; Ginther et al., 2001a). Um pequeno, porém significativo, aumento transitório de LH ocorre tanto na

primeira quanto na segunda onda do ciclo estral, ao redor do início do desvio folicular (Kulick et al., 2001).

Com relação aos receptores de LH, Xu et al. (1995) demonstraram que o RNAm para LHr começa a ser expresso nas células da granulosa no quarto dia do ciclo estral (folículos com 10,8 mm), não sendo detectado no segundo dia (6,8 mm). Bodensteiner et al. (1996) observaram maior expressão do RNAm para LHr nas células da granulosa no dia da divergência folicular, quando comparado ao dia anterior à divergência. Beg et al. (2001) notaram diferença na expressão de RNAm para receptores de LH nas células da granulosa, entre os dois maiores folículos, oito horas antes do suposto início do desvio folicular.

Estes achados, segundo Ginther et al. (2001b), indicam que as células da granulosa do futuro folículo dominante adquirem receptores de LH pouco antes do início do desvio, os quais poderiam ser ativados pelo aumento transitório de LH. Este aumento transitório de LH seguido pela aquisição de LHr nas células da granulosa seriam os primeiros eventos conhecidos de uma cascata que levaria ao desvio folicular, na presença de concentrações cada vez menores de FSH (Ginther et al, 2001a).

Apesar do destaque dado à revisão de Ginther et al. (2001b), é importante lembrar que ainda existe controvérsia na literatura com relação ao papel do LH no processo de desvio folicular. Parte do problema se deve as diferentes técnicas utilizadas para detectar o RNAm para LHr (hibridização *in situ* vs RT-PCR = reação de transcrição reversa seguida

de reação em cadeia pela polimerase) e a validação das mesmas para as diferentes isoformas do receptor de LH. Pode-se citar como exemplo desta controvérsia o trabalho de Evans et al. (1997), no qual os autores demonstram aumento na concentração de estradiol no folículo dominante em relação ao subordinado nos dias 2 (8,0 mm) e 3 (9,7 mm) do ciclo estral, porém, não encontraram níveis detectáveis de RNAm para LHR nas células da granulosa destes folículos.

Importância do Sistema de Fatores de Crescimento Semelhantes à Insulina (IGFs)

O sistema de IGFs é composto por dois ligantes (IGF-1 e IGF-2), dois receptores (tipo 1 e tipo 2) e uma família de proteínas ligadoras de IGF (IGFBP-1, 2, 3, 4, 5 e 6) e suas proteases (Spicer et al., 1995).

As atividades autócrinas e/ou Parácrinas do IGF-1 e IGF-2 estimulam o crescimento celular, a síntese de estradiol e aumentam a sensibilidade das células da granulosa ao FSH (Spicer et al., 1995; Ginther et al., 2001b). As células da teca possuem receptores para IGF-1 (Stewart et al., 1996) e a síntese de andrógenos, estimulada pelo LH em cultura de células da teca, aumenta sinergicamente com a adição de IGF-1 (Stewart et al., 1995). Aparentemente, o IGF-1 é capaz de exercer ação Parácrina tanto nas células da teca quanto da granulosa, favorecendo o crescimento e a função esteroideogênica das mesmas (Stewart et al., 1995).

Ginther et al. (2004) ao injetarem IGF-1 no interior do maior folículo subordinado (F2), no momento esperado do desvio ($F1 \geq 8,5$ mm), observaram aumento dos níveis intra-foliculares de estradiol 3-6h e de androstenediona 3-12 h após, indicando que o IGF-1 atua, direta ou indiretamente, aumentando a produção de esteróides no folículo dominante.

As ações dos IGFs são desencadeadas principalmente através do receptor tipo 1, porém a ligação dos IGFs aos seus receptores pode ser modulada pelas proteínas que se ligam a IGFs (IGFBPs) e a maioria dos trabalhos (Spicer et al., 1995; Monget et al., 1996) indicam que as IGFBPs inibem as ações das gonadotrofinas no crescimento e diferenciação folicular. Portanto, mudanças nos níveis intra-foliculares de IGFBPs podem causar alterações na biodisponibilidade de IGFs e conseqüentemente, aumentar ou diminuir as ações das gonadotrofinas nas células foliculares.

Beg et al. (2001) relataram que os níveis de IGF-1 livre não se alteram quando o maior folículo está crescendo de 7,5 a 11,2 mm. Entretanto, neste mesmo período, as concentrações de IGF-1 livre diminuem progressivamente no segundo maior folículo, a medida que a proteína ligante IGFBP-2 aumenta, contribuindo para a redução ou parada de crescimento deste folículo. Os mesmos autores sugeriram que a baixa concentração de IGFBP-2 no folículo dominante, está associada à inibição da expressão do RNAm para IGFBP-2, induzida pelo FSH.

Além da participação das IGFBPs no controle da biodisponibilidade de IGF-1, Fortune et al., (2001) chamaram a atenção para a importância das proteases que degradam as IGFBPs, ao constatarem que o futuro folículo dominante apresentava altas concentrações da enzima IGFBP-4 protease, responsável pela degradação da IGFBP-4, bem como da IGFBP-5 (Rivera & Fortune, 2003a) quando comparado ao segundo maior folículo da onda folicular. Rivera & Fortune (2003b) aventaram a hipótese que o aumento de FSH que precede a emergência da onda folicular induziria, no futuro folículo dominante, o aumento na atividade da IGFBP-4 protease, com conseqüente diminuição da IGFBP-4 e 5, e aumento da disponibilidade de IGF, que por sua vez, em sinergismo com o FSH, promoveria aumento de estradiol e da taxa de crescimento do folículo dominante. Portanto, neste modelo o evento crítico da seleção é a indução, pelo FSH, de uma protease para a IGFBP-4 em um dos folículos recrutados. Esta seleção bioquímica (aumento da IGFBP-4 protease) é rapidamente seguida pela seleção morfológica (ou divergência folicular) e posteriormente pela diferenciação do folículo dominante

3. Material e Método

Com a finalidade de treinar e padronizar a técnica a ser utilizada durante o experimento, foi realizado um ensaio preliminar, onde os ovários de 10 vacas Nelore foram acompanhados duas vezes ao dia durante 15 dias consecutivos. Nesta etapa, foi possível definir a frequência e os horários mais apropriados para o exame ultra-sonográfico trans-retal (US). Considerando que as vacas Nelore sofreriam mais estresse que as novilhas HPB, optou-se por um intervalo entre os exames ultra-sonográficos de 12 horas, ao invés de 8 horas, a exemplo de trabalhos publicados em novilhas da raça HPB (Ginther et al., 2001b).

A técnica de ultra-sonografia utilizada para acompanhar o crescimento dos folículos ovarianos já padronizada por Figueiredo et al., (1997), no laboratório de Farmacologia da Reprodução do Departamento de Farmacologia (IBB – UNESP), sofreu apenas ligeira modificação. O transdutor de ultra-som (Aloka SSD 500; transdutor de 7,5 MHz; Japan) foi movimentado sobre a superfície dos ovários e, quando necessário, a imagem do monitor foi congelada para mensuração do tamanho dos folículos (> 3mm). Duas imagens diferentes de cada folículo foram congeladas e mensuradas. Quando se observava acentuada diferença entre as duas mensurações, uma terceira imagem foi obtida para confirmar o tamanho correto do folículo. Após cada exame, foram desenhados diagramas da posição dos folículos em relação a outras estruturas ovarianas, de forma a permitir a identificação de cada folículo

durante dias sucessivos.

Após a padronização da técnica, dois grupos de vacas Nelore não lactantes foram utilizadas para se determinar o início do desvio folicular. No primeiro grupo (n=12), vacas anelradas (Livro Aberto, LA 2), com 3 a 5 anos de idade, média de 394 Kg de peso corporal e condição corporal de 2,5 (escala de 1 a 5), foram confinadas e alimentadas com cana-de-açúcar e uréia na Fazenda Vale do Rio do Peixe, no município de Conchas/SP, entre os dias 6 e 23 de Dezembro de 2002.

No segundo grupo (n=11), vacas nelore (Puro de origem, P.O.), com 5 a 10 anos de idade, média de 406 Kg de peso corporal e condição corporal de 2,5 (escala de 1 a 5), foram confinadas e alimentadas com feno de tifton e uma ração concentrada (PB: 9%, NDT: 61%) na Fazenda Lageado pertencente a UNESP, Campus de Botucatu, entre os dias 5 e 20 de Janeiro de 2003.

Após período de adaptação de 30 dias no confinamento, os animais foram submetidos a tratamento hormonal visando à sincronização da ovulação dos mesmos (Figura 1).

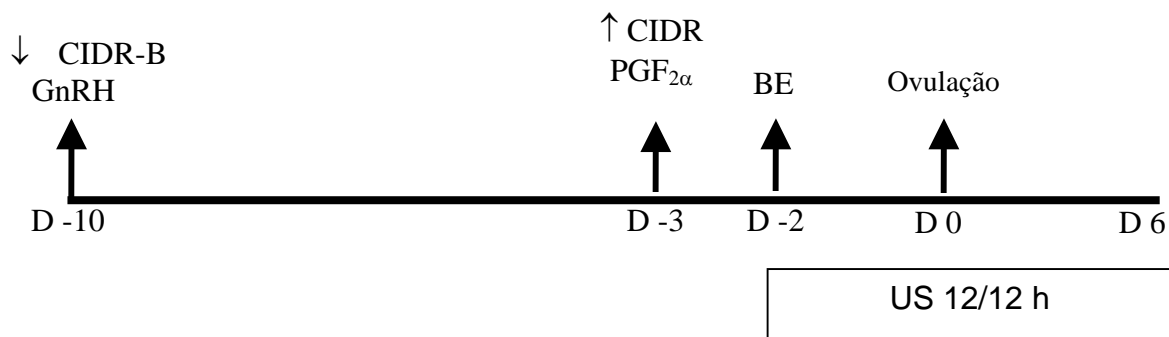


Figura 1: Protocolo de sincronização da ovulação e acompanhamento do desenvolvimento folicular ovariano em vacas Nelore.

Em ambos grupos de vacas, colocou-se (Dia -10) um dispositivo intra-vaginal liberador de progesterona (1,9 g, CIDR-B®, InterAg, Hamilton, Nova Zelândia) associado à aplicação de GnRH (Icirelina, 75 mg, Gestran Plus®, ARSA S.R.L., Buenos Aires, Argentina, via IM). O dispositivo intra-vaginal foi removido no Dia -3 e os animais receberam uma aplicação de PGF2 α (d-cloprostenol, 150 μ g, Prolise®, ARSA S.R.L., Buenos Aires, Argentina, via IM). Vinte e quatro horas mais tarde (D -2) foi administrado 1,0 mg de Benzoato de Estradiol (BE, Estrogin®, Farmavet, São Paulo, Brasil, via IM) e a partir deste dia o crescimento e ovulação do folículo dominante foram acompanhados por meio de ultrasonografia (US) trans-retal, realizada a cada 12 horas.

Após a ovulação, o desenvolvimento dos folículos com mais de 3 mm de diâmetro foi acompanhado através de US, realizado a cada 12 h, até pelo menos o sexto dia após a ovulação, de forma a permitir a identificação do início do desvio (divergência) folicular. Para facilitar o manejo, foram excluídas as vacas que tiveram intervalo entre a última aplicação de EB e ovulação > 54 horas. Desta forma, foram aproveitadas 11 vacas, sendo 5 do primeiro grupo e 6 do segundo.

O momento da ovulação foi considerado como a média entre a última vez que o folículo ovulatório foi visto e a primeira ocasião em que ele não foi observado no monitor do ultra-som. Exemplificando: na vaca 170 a última visualização do folículo pré-ovulatório ocorreu 36 após a administração de BE e 12 horas mais tarde (48 horas após o BE) o

folículo não foi observado no U.S. Portanto, considerou-se que a ovulação ocorreu 42 horas após a última aplicação de BE. O momento da emergência da onda pós-ovulatória foi observado pela primeira vez quando o F1 > 3,0 mm. Somente ondas com um único folículo dominante foram utilizadas para o cálculo do desvio, desta forma, ondas com co-dominância não foram consideradas.

Análise Estatística

Considerando que não houve diferença entre os resultados do primeiro (n=5) e segundo (n=6) grupos, os dados foram agrupados para a análise estatística.

A determinação do momento esperado para ocorrência do desvio ou divergência folicular, bem como o diâmetro dos dois maiores folículos neste momento, foi realizada de duas formas: 1) através de análise visual do gráfico de cada vaca, contendo os dados sobre o crescimento dos dois maiores folículos ovarianos e 2) por meio do modelo matemático de Regressão Linear Segmentada descrito por Bergfelt et al. (2003). Para testar se houve diferença estatística ou não entre os resultados obtidos através da análise visual (1) ou por meio do modelo matemático (2) utilizou-se o Teste-t de Student. Para comparar a taxa de crescimento dos dois maiores folículos da onda nas diferentes fases (antes e após o desvio) foi utilizada a Análise de Medidas Repetidas.

4. Resultados

Sincronização da ovulação

No primeiro grupo de vacas (n=12) submetidas ao tratamento hormonal visando à sincronização da ovulação, seis (50,0%) responderam aos tratamentos e ovularam $40,0 \pm 5,7$ h (média \pm EPM) após a aplicação do BE. O diâmetro médio dos folículos pré-ovulatórios (12 horas antes da ovulação) destas vacas foi de $11,7 \pm 0,5$ mm (média \pm EPM) e as seis ovularam entre 18 e 54 horas após a aplicação de BE (Tabela 1). Em um dos seis animais (vaca 06), observou-se a presença de dois folículos dominantes (co-dominância), não sendo possível, a determinação do início do desvio folicular.

No segundo grupo de vacas (n=11) submetidas ao tratamento hormonal visando à sincronização da ovulação, seis (54,5%) responderam aos tratamentos e ovularam $44,0 \pm 2,0$ h (média \pm EPM) após a aplicação do BE. O diâmetro médio dos folículos pré-ovulatórios (12 horas antes da ovulação) destas vacas foi de $12,8 \pm 0,7$ mm (média \pm EPM) e as seis ovularam entre 42 e 54 horas após a última aplicação de BE (Tabela 1).

Tabela 01: Diâmetro dos folículos pré-ovulatório e intervalo entre a aplicação do benzoato de estradiol (BE) e a ovulação, em vacas Nelore submetidas a tratamento hormonal para sincronizar a ovulação. EPM = erro padrão da média.

Número do Animal	Diâmetro folicular (mm)	Intervalo BE-Ovulação (h)
Animais do grupo 1		
06	11,2	54
09	14,1	18
18	9,8	54
36	11,5	42
43	11,5	30
46	12,3	42
Media±EPM	11,7 ± 0,5	40,0 ± 5,7
Animais do grupo 2		
50	12,4	54
170	13,5	42
357	16,0	42
388	11,6	42
467	10,6	42
588	12,7	42
Media±EPM	12,8 ± 0,7	44,0 ± 2,0

Desvio (divergência) folicular

O acompanhamento ultra-sonográfico do crescimento dos folículos da primeira onda folicular encontra-se sumariado nas Figuras 2 a 13.

O momento do desvio folicular foi estimado, comparando-se o perfil de crescimento do folículo dominante com o do maior folículo subordinado, a partir da observação gráfica dos resultados apresentados ou por modelo matemático de Regressão Linear Segmentada (Tabela 2). Como os dados dos dois grupos de vacas, para o tamanho dos folículos e tempo de início do desvio foram semelhantes, estatisticamente, os dados foram combinados.

Tanto o método gráfico quanto o matemático forneceram resultados semelhantes para o tamanho dos folículos ($6,0 \pm 0,3$ e $6,1 \pm 0,1$ mm, respectivamente) e momento da ocorrência do desvio folicular ($2,3 \pm 0,2$ e $2,4 \pm 0,2$ dias, respectivamente, Tabela 2). Para o segundo maior folículo encontrou-se o valor de $5,4 \pm 0,2$ mm de diâmetro, a partir de dados obtidos com o método gráfico.

A figura 13 sumaria o perfil de crescimento entre os dois maiores folículos, ajustado para o momento do desvio folicular (Dia 0).

A taxa de crescimento (mm/12 h) do futuro folículo dominante 12 h antes e 12 h após o desvio ($0,9 \pm 0,2$ e $1,0 \pm 0,1$; respectivamente) não se alterou de forma significativa. Entretanto, no segundo maior folículo a taxa de crescimento antes do desvio foi maior do que após o mesmo ($0,7 \pm 0,1$ e $0,01 \pm 0,1$; respectivamente, $p < 0,05$). Comparando-se a taxa de

crescimento do futuro folículo dominante (F1) com a do segundo maior folículo (F2) verifica-se que ela foi maior no F1 a partir do momento do desvio folicular (tabela 3).

Figura 02. Padrão de crescimento dos dois maiores folículos (F1 = folículo dominante; F2 = folículo subordinado), durante a primeira onda folicular da vaca 09.

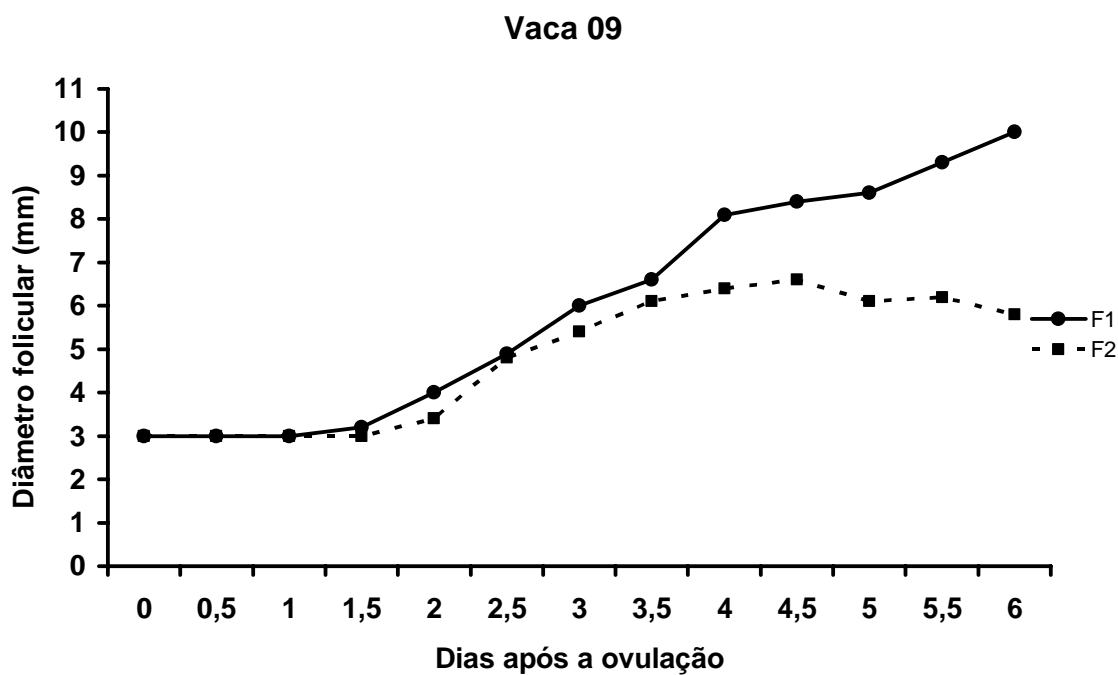


Figura 03. Padrão de crescimento dos dois maiores folículos (F1 = folículo dominante; F2 = folículo subordinado), durante a primeira onda folicular da vaca 18.

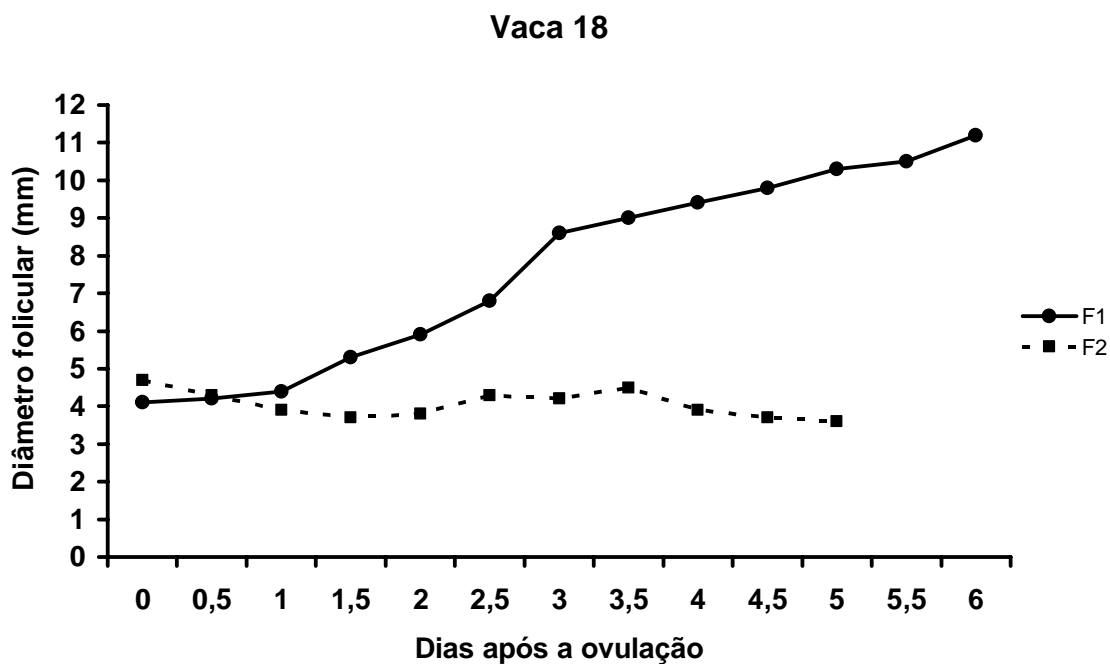


Figura 04. Padrão de crescimento dos dois maiores folículos (F1 = folículo dominante; F2 = folículo subordinado), durante a primeira onda folicular da vaca 36.

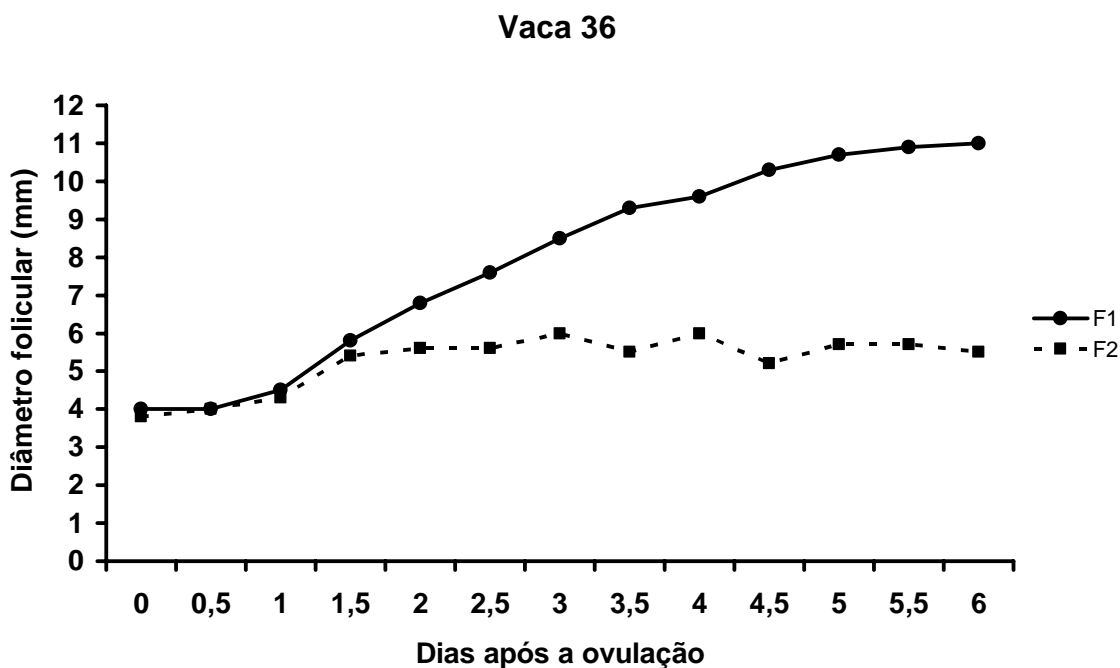


Figura 05. Padrão de crescimento dos dois maiores folículos (F1 = folículo dominante; F2 = folículo subordinado), durante a primeira onda folicular da vaca 43.

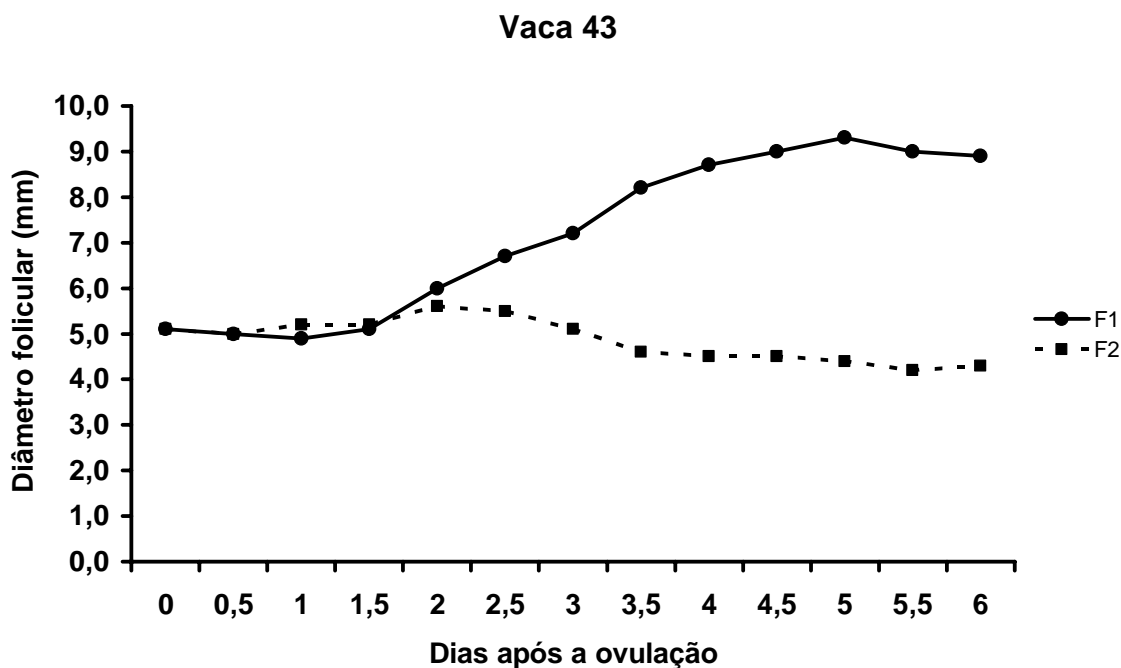


Figura 06. Padrão de crescimento dos dois maiores folículos (F1 = folículo dominante; F2 = folículo subordinado), durante a primeira onda folicular da vaca 46.

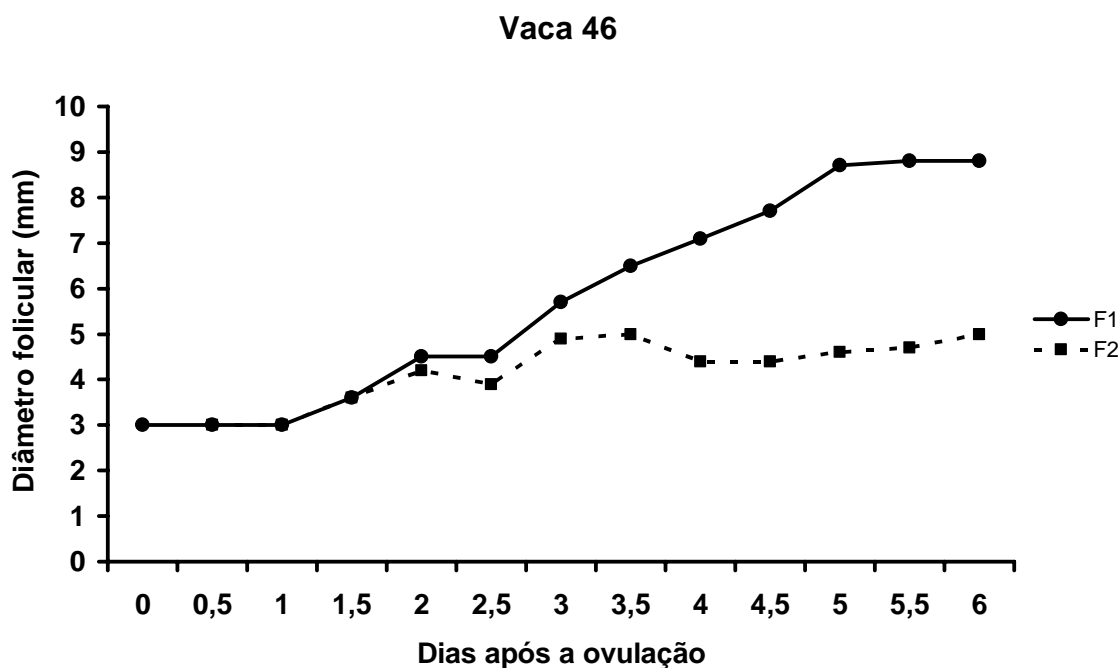


Figura 07. Padrão de crescimento dos dois maiores folículos (F1 = folículo dominante; F2 = folículo subordinado), durante a primeira onda folicular da vaca 50.

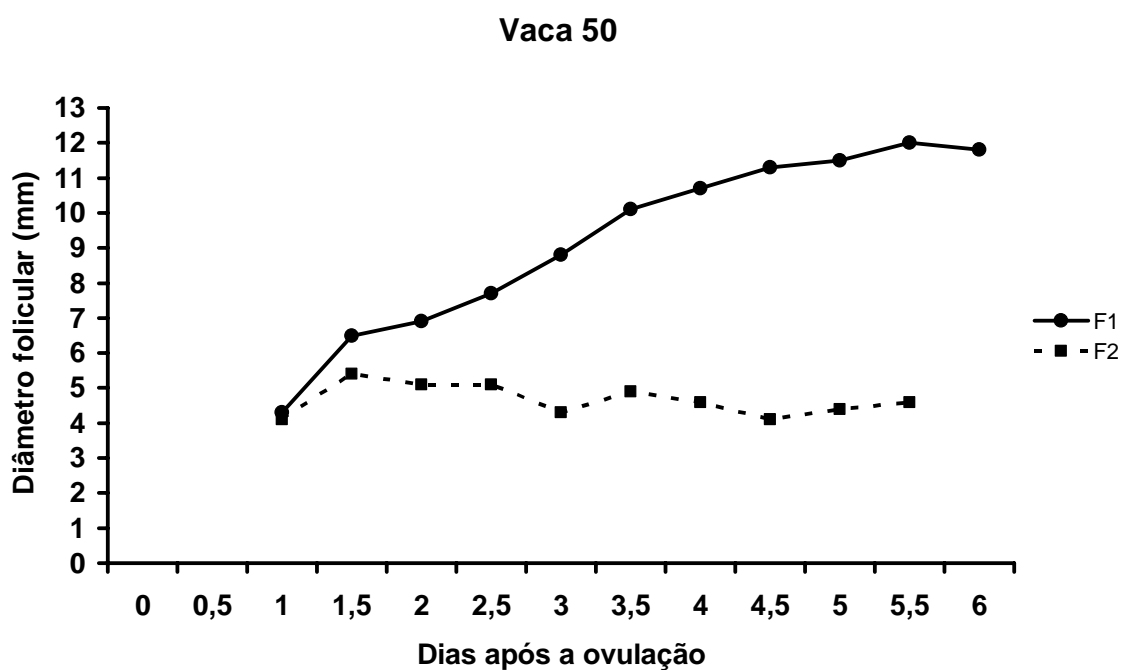


Figura 08. Padrão de crescimento dos dois maiores folículos (F1 = folículo dominante; F2 = folículo subordinado), durante a primeira onda folicular da vaca 170.

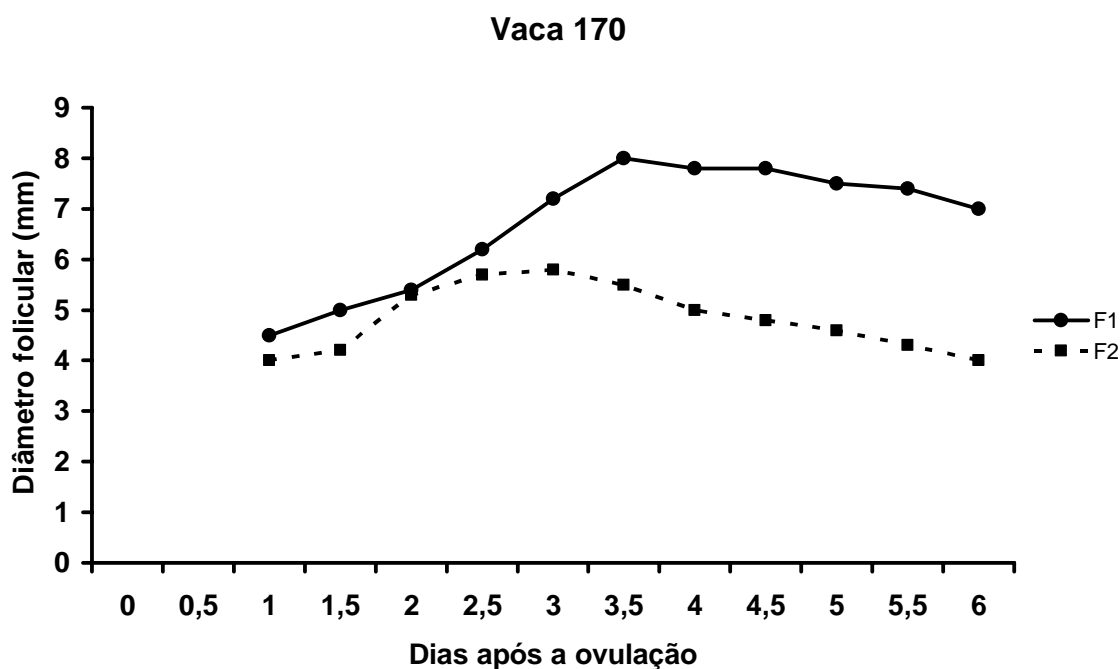


Figura 09. Padrão de crescimento dos dois maiores folículos (F1 = folículo dominante; F2 = folículo subordinado), durante a primeira onda folicular da vaca 357.

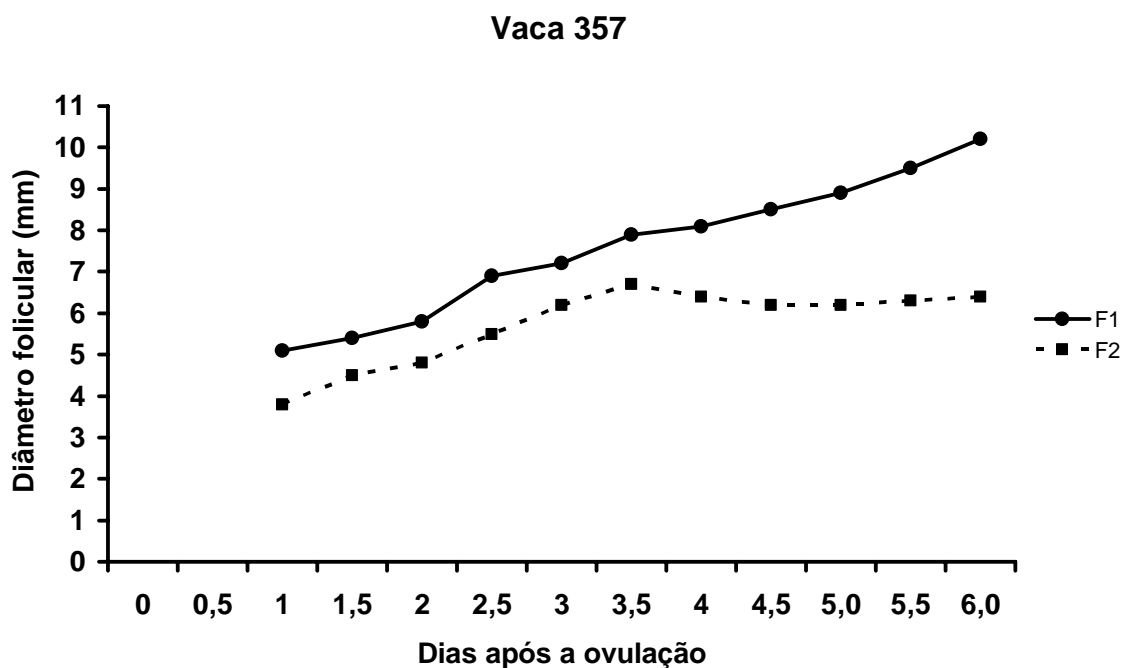


Figura 10. Padrão de crescimento dos dois maiores folículos (F1 = folículo dominante; F2 = folículo subordinado), durante a primeira onda folicular da vaca 388.

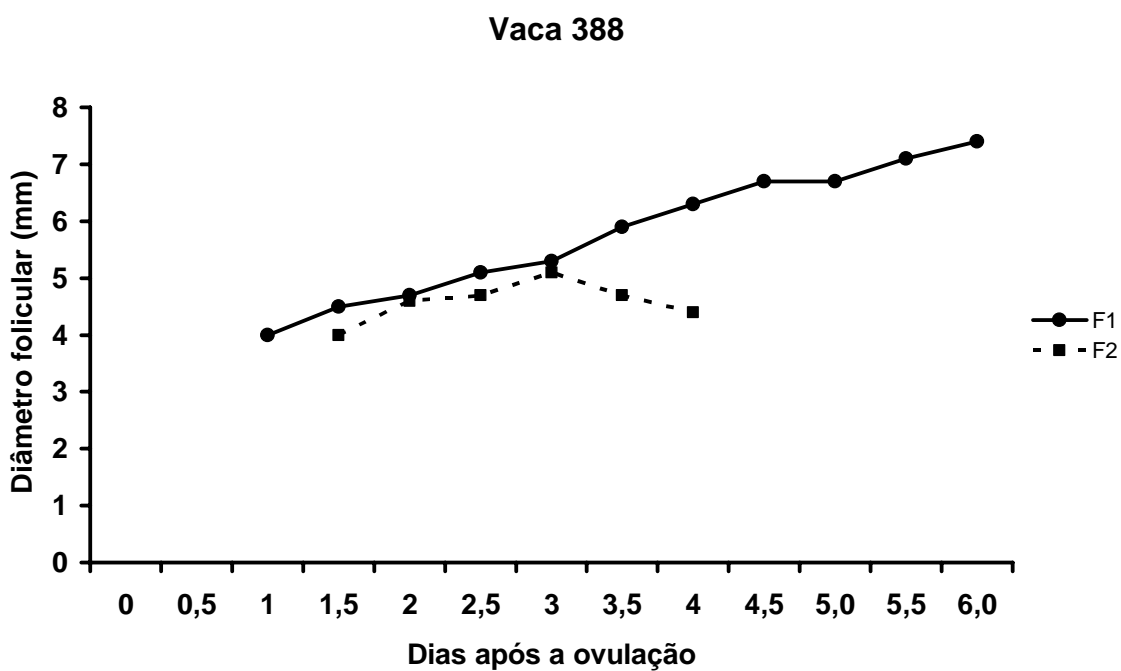


Figura 11. Padrão de crescimento dos dois maiores folículos (F1 = folículo dominante; F2 = folículo subordinado), durante a primeira onda folicular da vaca 467.

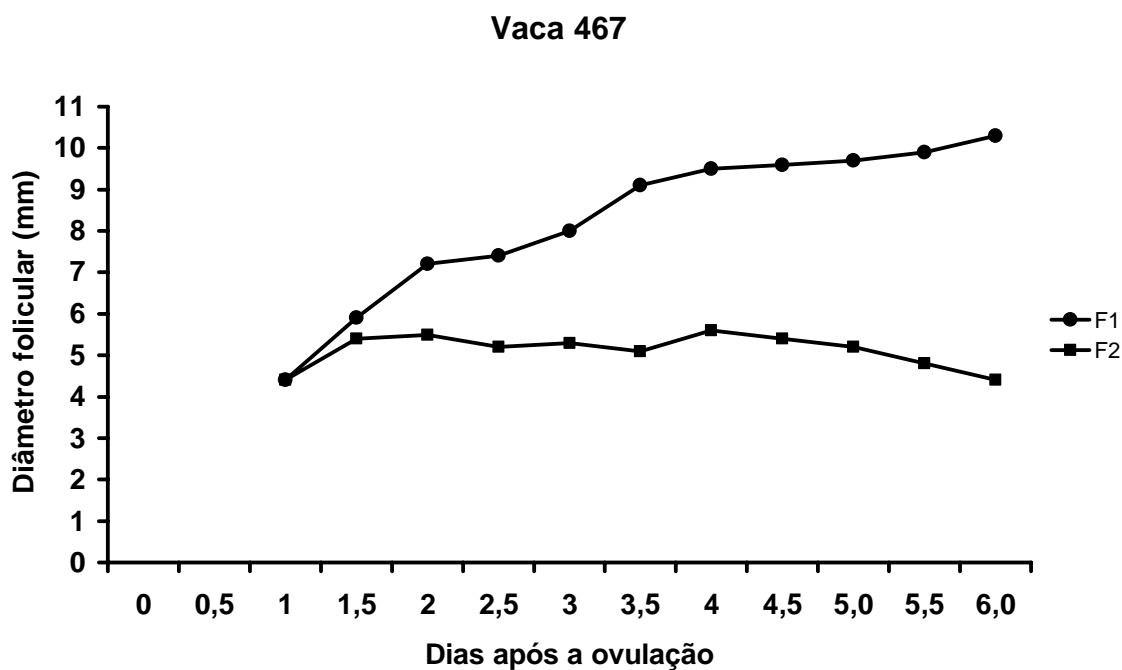


Figura 12. Padrão de crescimento dos dois maiores folículos (F1 = folículo dominante; F2 = folículo subordinado), durante a primeira onda folicular da vaca 588.

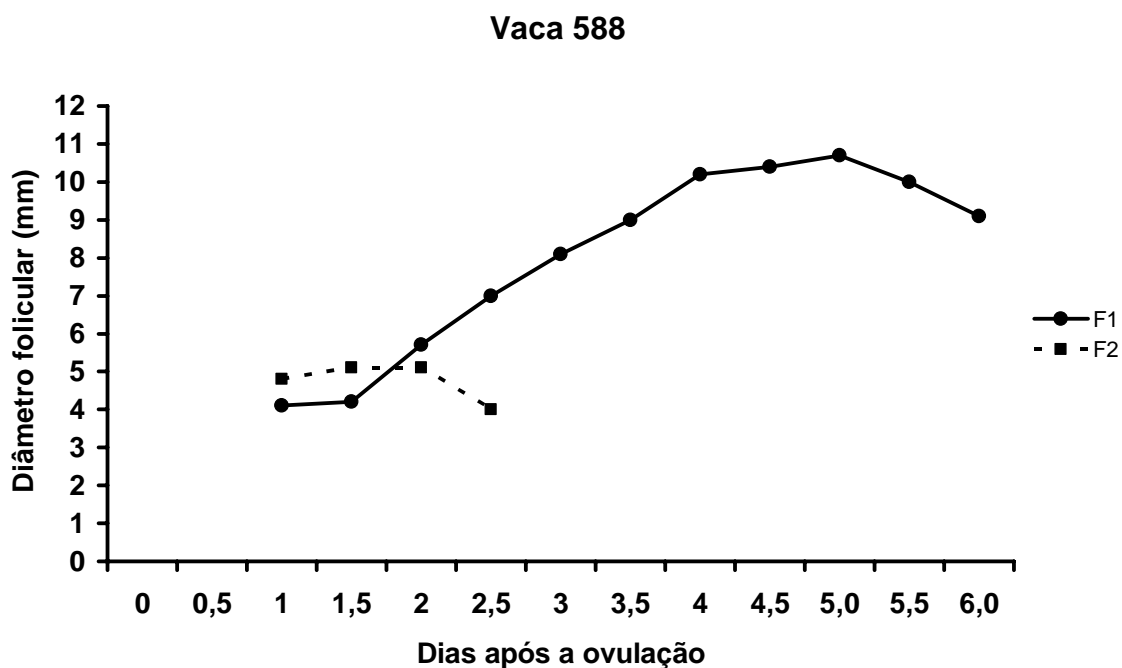


Tabela 02: Diâmetro folicular e momento do desvio, determinado pela observação gráfica ou calculado pelo método de Regressão Linear Segmentada, em vacas Nelore. F1 = folículo dominante. EPM = erro padrão da média.

Vaca	Desvio observado		Desvio calculado	
	Dias pós-ovulação	F1 (mm)	Dias pós-ovulação	F1 (mm)
09	3,5	6,6	3,3	6,3
18	2,5	6,8	2,4	6,9
36	1,5	5,8	1,5	5,8
43	2	6,0	2	6,4
46	3	5,7	3	5,7
50	1,5	6,5	1	4,8
170	2	5,4	2,4	6,3
357	3,5	7,9	3,9	7,9
388	3	5,3	3	5,5
467	1,5	5,9	2,2	6,9
588	1,5	4,2	2,1	5,8
Média±EPM	2,3±0,2^a	6,0±0,3^A	2,4±0,2^a	6,1±0,2^A

* valores com sobrescritos iguais não diferem entre si, Teste-t pareado (p>0,19)

Figura 13. Padrão de crescimento dos dois maiores folículos (F1 = folículo dominante; F2 = folículo subordinado), ajustado para o momento do desvio folicular em 11 vacas Nelore.

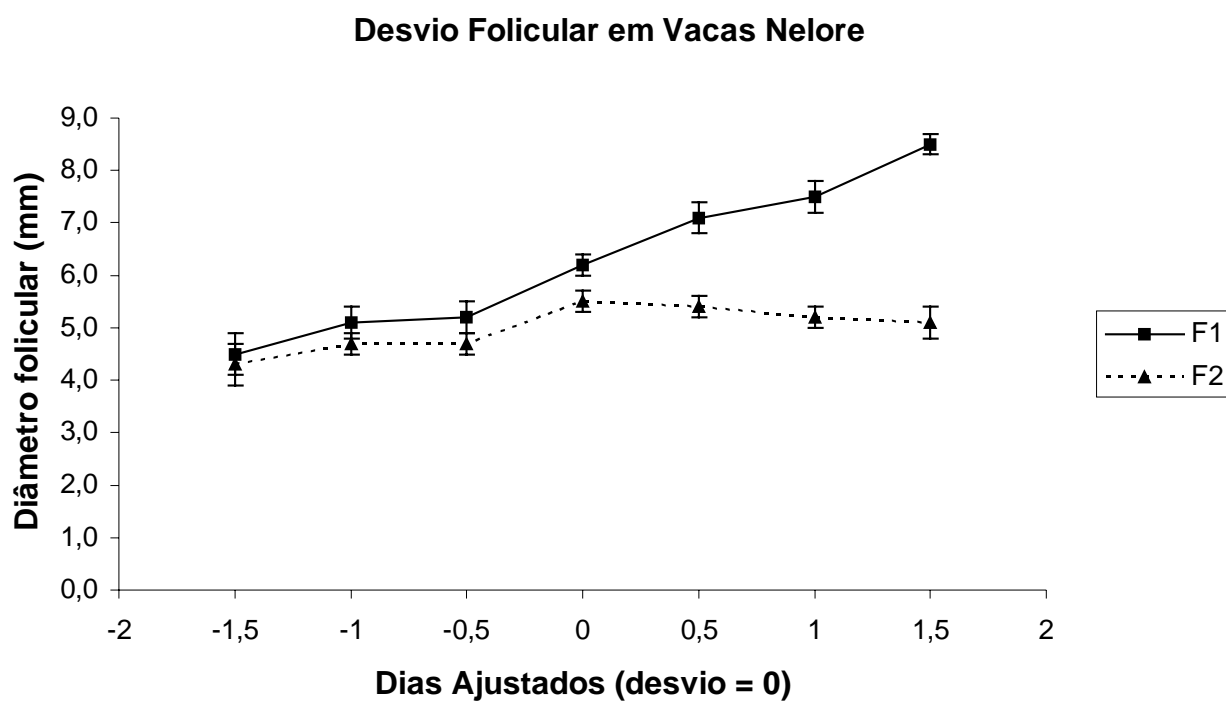


Tabela 03: Taxa de crescimento (mm/12 h) do folículo dominante (F1) e do maior folículo subordinado (F2), 12 horas antes e 12 horas após o desvio folicular, em vacas Nelore. EPM = erro padrão da média.

Animal	Taxa crescimento F1		Taxa crescimento F2	
	Antes	Depois	Antes	Depois
09	0,6	1,5	0,7	0,3
18	0,9	1,8	0,5	-0,1
36	1,3	1,0	1,1	0,2
43	0,9	0,7	0,2	0,1
46	1,2	0,8	0,3	0,1
50	2,4	0,4	1,3	-0,3
170	0,4	0,8	1,1	0,4
357	0,7	0,2	0,5	-0,3
388	0,2	0,6	0,4	-0,4
467	1,5	1,3	1,0	0,1
588	0,1	1,5	0,3	0
Média±EPM	0,9±0,2^{Aa}	1,0±0,2^{Aa}	0,7±0,1^{Ba}	0,01±0,1^{Cb}

Valores com sobrescritos diferentes, diferem estatisticamente (Análise de Medidas Repetidas, $p < 0,05$)

Letras minúsculas comparam folículos diferentes (F1 vs F2) no mesmo momento; letras maiúsculas comparam o mesmo folículo em momentos diferentes.

5. Discussão

Sincronização da ovulação

O diâmetro médio dos folículos pré-ovulatórios ($11,7 \pm 1,3$ mm, grupo 1 e $12,8 \pm 1,7$ mm, grupo 2) estão de acordo com dados obtidos anteriormente para fêmeas da raça Nelore (Figueiredo et al., 1997, Barros et al., 2000), porém diferem daqueles reportados para animais da raça HPB (Savio et al, 1988; Sirois & Fortune, 1988; Ginther et al., 1989) e são semelhantes aos folículos pré-ovulatórios de vacas da raça Angus utilizadas em experimento realizado no estado de São Paulo, no qual foram comparadas simultaneamente fêmeas da raça Angus ($12,6 \pm 1,6$ mm), Nelore ($13,0 \pm 3,2$ mm), e Mestiça (Angus x Nelore; $12,6 \pm 2,2$ mm), (Mizuta, 2003).

Os resultados obtidos por Mizuta (2003), ou seja, diâmetro do folículo pré-ovulatório semelhante entre vacas das raças Nelore (origem indiana) e Angus (origem européia), indicam que a diferença no tamanho folicular encontrada entre raças zebuínas (Figueiredo et al., 1997, Gambini et al., 1998) e européias (Sávio et al, 1988; Sirois & Fortune, 1988; Ginther et al., 1989) esteja mais relacionada ao porte dos animais do que propriamente a origem da raça (indiana vs européia), uma vez que o peso e tamanho de fêmeas da raça Angus (taurino) se assemelha mais aos da raça Nelore (zebuíno) do que, por exemplo, aos da raça HPB (taurino).

Considerando que a maioria dos trabalhos desenvolvidos para estudar a fase de seleção ou desvio folicular foram realizados em novilhas da raça HPB (Ginther et. al., 1999; Ginther et. al., 2000; Ginther et. al., 2003), é importante verificar se as informações obtidas em uma raça de “grande porte”, também se aplicam a raças de “porte médio”, como é o caso da raça Nelore.

Desvio (divergência) folicular

Através do exame ultra-sonográfico realizado a cada 12 horas, foi possível acompanhar o crescimento dos dois maiores folículos ovarianos. A partir da ovulação, induzida por tratamento hormonal, o futuro folículo dominante e o segundo maior folículo apresentaram uma taxa de crescimento semelhante (1,0 x 0,7mm, respectivamente), ou seja, cresceram paralelamente, até um momento crítico em que o folículo dominante continuou a crescer (desvio ou divergência) e o segundo maior folículo (subordinado) parou ou reduziu seu crescimento (Tabela 2, Figura 13).

O momento do desvio foi determinado de duas formas: a partir da observação gráfica dos resultados (método 1) ou por meio de modelo matemático de Regressão Linear Segmentada (método 2, Bergfelt et al., 2003). Apesar do método 1 ser mais direto, ele é subjetivo porque é baseado em avaliação visual, portanto, pode induzir o erro.

No entanto, os dados referentes ao momento do desvio após a ovulação e o diâmetro folicular, foram similares quando determinados tanto pelo método 1 ($2,3 \pm 0,2$ dias e $6,0 \pm 0,3$ mm; respectivamente) quanto pelo 2 ($2,4 \pm 0,2$ dias e $6,1 \pm 0,2$ mm).

Estes resultados foram semelhantes aos relatados para novilhas da raça Nelore, onde o desvio folicular ocorreu $2,8 \pm 0,3$ dias ($n=7$) após a ovulação e os diâmetros do folículo dominante e maior folículo subordinado foram de $5,7 \pm 0,2$ mm e $5,5 \pm 0,1$, respectivamente (Sartorelli, 2003). Entretanto, diferem parcialmente daqueles obtidos em novilhas HPB (revisados por Ginther et al., 1996 e 2001b), nas quais o desvio folicular ocorreu aproximadamente 2,0 dias após a ovulação, quando os folículos dominantes atingiram 8,5 mm de diâmetro.

Surpreendentemente, os resultados do presente estudo diferiram daqueles obtidos em outro trabalho realizado com novilhas da raça Nelore (Castilho, 2003). A autora relatou, em sua tese de doutorado, ocorrência do desvio folicular $3,5 \pm 0,2$ dias ($n=7$) após a ovulação e diâmetro folicular neste momento de $7,2 \pm 0,4$ mm para o maior folículo (dominante) e de $5,5 \pm 0,4$ mm para o segundo maior folículo (subordinado). Ou seja, no presente trabalho a divergência folicular ocorreu aproximadamente 24 horas antes e com diâmetro folicular cerca de 1,0 mm menor do que os dados reportados por Castilho.

Dentre as possíveis explicações para estes resultados díspares entre animais da mesma raça, pode-se citar a técnica de ultra-sonografia

e a forma de determinar o momento do desvio, uma vez que Castilho utilizou apenas o método gráfico (método 1). A identificação do crescimento de cada folículo ovariano até o momento do desvio, assim como a determinação do diâmetro folicular esta sujeita a erros. A acuracidade e precisão destas determinações podem variar de indivíduo para indivíduo, dependendo das condições de trabalho (ex: excesso de iluminação, contenção ineficiente dos animais, condições climática adversas, etc.), familiaridade com a técnica de ultra-sonografia e índole dos animais. Outra possibilidade seria o grau de estresse dos animais no decorrer dos experimentos, uma vez que o início do desvio pode ocorrer mais tardiamente em animais com sinais evidentes de estresse, como agressividade exacerbada e perda de peso durante o experimento.

Os dados do presente estudo demonstram que, no momento do desvio, o diâmetro folicular de vacas Nelore é menor do que aquele relatado para novilhas HPB. A explicação para este fato se deve provavelmente ao menor tamanho corporal e folicular da raça Nelore, quando comparada à HPB. Entretanto, não se pode descartar a influência de outros fatores como clima, alimentação e manejo dos animais, na taxa de crescimento dos folículos e no momento da ocorrência da seleção folicular.

A emergência da primeira onda em vacas Nelore, quando comparada a de novilhas HPB, ocorreu mais tarde e o intervalo entre emergência e início de desvio mais cedo. A emergência da primeira onda

em vacas Nelore ocorreu cerca de 1 dia após a ovulação, seguida pela ocorrência do desvio cerca de 1,6 dias após a emergência, quando o folículo dominante atingiu aproximadamente 6,1 mm. Este fato pode estar relacionado a baixas concentrações de FSH e altas de IGF-1 em zebuínos quando comparados a taurinos, visto que as alterações na concentração máxima de FSH circulante, associado ao pico pré-ovulatório, foram cerca de 48% menor, enquanto a concentração de IGF-1 total cerca de 129% maior em vacas Brahman do que em vacas Angus, durante o ciclo estral (Alvarez et al., 2000).

Em estudo realizado em novilhas HPB, Ginther et al. (2004) sugeriram que a IGF-1 poderia ser um fator importante para a continuidade do crescimento do folículo dominante durante o desvio, mesmo na presença de baixas concentrações de FSH.

A possibilidade do IGF-1 aumentar a responsividade folicular ao FSH em gado zebu é uma suposição originada a partir de vários trabalhos, onde a administração de baixas doses de FSH em vacas zebuínas induziu resposta superovulatória semelhante a obtida com doses mais elevadas em raças européias (Barros & Nogueira, 2001). Os resultados do presente trabalho, assim como os demais citados, indicam que a influência temporal dos efeitos gonadotróficos e somatotróficos, na emergência e desvio folicular, pode ser diferente entre animais de raças zebuínas quando comparadas a de raças taurinas.

Com relação às taxas de crescimento folicular antes e após o desvio folicular, elas foram semelhantes no futuro folículo dominante, tanto em vacas e novilhas da raça Nelore (Sartorelli, 2003 e Castilho, 2003) como da raça HPB (Ginther et al., 1996). Conforme o esperado (Ginther et al., 2001b), o crescimento do segundo maior folículo diminuiu ou cessou após a divergência folicular (Tabela 3).

As informações morfológicas sobre o desvio folicular, obtidas no presente trabalho, poderão servir de base para outros experimentos destinados a verificar aspectos como a importância do LH e seus receptores, e dos fatores de crescimento semelhantes à insulina e sua proteínas ligadoras, no processo de desvio folicular em fêmeas da raça Nelore.

6. Conclusão

Conclui-se neste estudo que, o diâmetro do futuro folículo dominante no momento do desvio folicular foi de aproximadamente 6,0 mm em vacas da raça Nelore, cerca de 2,4 dias após a ovulação.

7. 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. Fertil.**, v.94, p.177-88, 1992.
- ALVAREZ P, SPICER LJ, CHASE JR CC, PAYTON ME, HAMILTON TD, STEWART RE, et al. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in subtropical environment. **J. Anim Sci.**, v.78, p.1291-302, 2000.
- ANUALPEC: **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio/Argos, 2004.
- ARMSTRONG, D.G., WEBB, R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. **Rev. Reprod.**, v.2, p.139-46, 1997.
- AUSTIN, C.R., SHORT, R.V., **Reproduction in mammals: hormonal control of reproduction**. 2. ed. New York: Cambridge University Press, 1984, 224p.
- AUSTIN, E.J., MIHM, M., EVANS, A.C.O., KNIGHT, P.G., IRELAND, J.L.H., IRELAND, J.J., ROCHE, J.F. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. **Biol. Reprod.**, v.64, p.839-48, 2001.
- 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.
- BARROS, C.M., MOREIRA, M.B.P., FIGUEIREDO, R.A., TEIXEIRA A.B., TRINCA, L.A. Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using GnRH, PGF 2α and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v.53, p.1121-34, 2000.
- BARROS C.M., NOGUEIRA M.F.G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v;56. p1483-96, 2001.

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicações da UNESP**. São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.2: Referências Bibliográficas.

BIOSIS. Serial sources for the BIOSIS preview database. Philadelphia, 1996. 468p.

- BEG, M.A., BERGFELT, D.R., KOT, K., WILTBANK, M.C., GINTHER, O.J. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. **Biol. Reprod.**, v.64, p.432-41, 2001.
- BEG, M.A., BERGFELT, D.R., KOT, K., GINTHER, O.J. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. **Biol. Reprod.**, v.66, p.120-126, 2002.
- BEG, M.A., MEIRA, C., BERGFELT, D. R., GINTHER, O. J. Role of oestradiol in growth of follicles and follicle deviation in heifers. **Reproduction**, v.125, p.847–854, 2003.
- BERGFELT, D.R., KULICK, L.J., KOT, K., GINTHER, O.J. Follicular and hormonal responses to experimental suppression of FSH during follicular deviation in cattle. **Theriogenology**, v.54, p.1191-1206, 2000.
- BERGFELT, D.R., SEGO, L.H., BEG, M.A., GINTHER, O.J. Calculated follicle deviation using segmented regression for modelling diameter differences in cattle. **Theriogenology**, v.59, p.1811-1825, 2003.
- BLEY, M.A., SARAGUETA, P.E., BARANAO, J.L. Concerted stimulation of rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis by sex steroids and follicle-stimulation hormone. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v.62, p.11-19, 1997.
- BODENSTEINER, K.J., WILTBANK, M.C., BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J. Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. **Theriogenology**, v.45, p.499-512, 1996.
- BURATINI, J., PRICE, C.A., VISINTIN, J.A., BÓ, G.A. Effects of dominante follicle aspiration and treatment with recombiant somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**., v.54, p.421-431, 2000.
- CASTILHO, C. **Divergência no crescimento foliular em novilhas da raça nelore e sua influência sobre a competência oocitária para o desenvolvimento embrionário *in vitro***. Jaboticabal, 2003. 86p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.
- EVANS, A.C.O., KOMAR, C.M., WANDJI, A.S., FORTUNE, J.E. Changes in androgen secretion and luteinizing hormone pulse amplitude are associated with the recruitment and growth of ovarian follicles during the luteal phase of the estrous cycle. **Biol. Reprod.**, v.57, p. 394-401, 1997.

- 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. 1675-1682, 1985.
- 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. 535-545, 1992.
- 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.
- FORTUNE, J.E., RIVERA, G.M., EVANS, A.C.O, TURZILLO, A.M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biol. Reprod.**,v 65, p.648–654, 2001.
- 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.629-636, 1990.
- GAMBINI, A.L.G., MOREIRA, M.B.P., CASTILHO, C., BARROS, C.B. Dinâmica folicular e sincronização de ovulação da raça Gir. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.22, p.201-10, 1998.
- GINTHER, O. J., KNOFF, L., KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **J. Reprod. Fertil.**, v.887, p.223-30, 1989.
- GINTHER, O.J., WILTBANK, M.C., FRICKE, P.M., GIBBONS, J.R., KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biol. Reprod.**, v.55, p.1187-1194, 1996.
- GINTHER, O.J., KOT, K., KULICK, L.J., WILTBANK, M.C. Emergence and deviation of follicle during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**. v.48, p.75-87, 1997.
- GINTHER, O.J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: cattle**. 1.ed. Wisconsin:Madison, 1998.v.3., 304p.
- GINTHER, O.J., BERGFELT, D.R., KULICK, L.J., KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentration. **Theriogenology**. v.52, p.1079-1093, 1999.
- GINTHER, O.J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 61, p.60-61, 2000.

- GINTHER, O.J., BERGFELT, D.R., KULICK, L.J., KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. **Biol. Reprod.**, v.63, p. 383-389, 2000.
- GINTHER, O.J., BERGFELT, D.R., BEG, M.A., KOT, K. Follicle selection in cattle : Role of luteinizing hormone. **Biol. Reprod.**, v.64, p.197-205, 2001a.
- 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, 2001b.
- GINTHER, O.J., BEG, M.A., BERGFELT, D.R., KOT, K. Activin A, estradiol, and Free Insulin-Like Growth Factor I in follicular fluid preceding the experimental assumption of follicle dominance in cattle. **Biol. Reprod.**, v.67, p.14-19, 2002.
- GINTHER, O.J., BEG, M.A., KOT, K. MEIRA, C., BERGFELT, D.R. Associated and independent comparisons between the two largest follicles preceding follicle deviation in cattle. **Biol. Reprod.**, v.68, p. 524-529, 2003.
- GINTHER, O.J., BERGFELT, D.R., BEG, MEIRA, C., M.A., KOT, K. In vivo effects of an intrafollicular injection of insulin-like growth factor 1 on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares. **Biol. Reprod.**, v.70, p.99-105, 2004.
- GROSS, T.S., THATCHER, W.W., HANSEN, P.J., JOHNSON, J.W., LACROIX, M.C. Prostaglandin secretion by perfused bovine endometrium: secretion towards the myometrium and luminal sides at day 17 post-estrous as altered by pregnancy. **Prostaglandins**, v.35, p.342-357, 1988.
- HODGEN, G.D. The dominant ovarian follicle. **Fertil. Steril.**, v.38, p.281-300, 1982.
- HORTON, E.W., POYSER, N.L. Uterine luteolytic hormone: a physiological role for prostaglandine F₂ α . **Physiol. Rev.**, v.56, p.595, 1975.
- IRELAND, J.J., ROCHE, J.F. Hypotheses regarding development of dominant follicles during a bovine estrous cycle. In: ROCHE, J.F., O'CALLAGHAND, D. (Eds) **Follicular growth and ovulation rate in farm animals**. Boston: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. p. 1-18.
- KANEKO, H., NAKANISHI, Y., AKAGI, S., ARAI, K., TAYA, K., WATANABE, G., SASAMOTO, S., HASEGAWA, Y.

- Immunoneutralisation of inhibin and estradiol during the follicular phase of the estrous cycle in cows. **Biol. Reprod.**, v.53, p.931-939, 1995.
- KANEKO, H., TAYA, K., WATANABE, G., NOGUSHI, J., KIKUCHI, K., SHIMADA, A., HASEGAWA, Y. Inhibin is involved in the suppression of FSH secretion in the growth phase of the dominant follicle during the early luteal phase in cows. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.14, p.263-271, 1997.
- KASTELIC, J.P., KNOFF, L., GINTHER, O.J. Effect of day of prostaglandin F₂ α treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. **Anim. Reprod. Sci.**, v.23., p.169- 80, 1990.
- KNOFF, L., KASTELIC, J.P., SCHALLENBERGER, E., GINTHER, O.J. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two- wave hypotesis by ultrasonically monitoring individual follicles. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.6, p.111-9, 1989.
- KULICK, L.J., KOT, K., WILTBANK, M.C., GINTHER, O.J. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. **Theriogenology.**, v.52, p. 913-921, 1999.
- KULICK, L.J., BERGFELT, D.R., KOT, K., GINTHER, O.J. Follicle selection in cattle: Follicle deviation and codominance within sequential waves. **Biol. Reprod.**, v.65, p.839-846, 2001.
- LOPEZ, H., SARTORI, R., WILTBANK, M.C. Reproductive hormones and follicular growth during development of one or multiple dominant follicles in cattle. **Biol. Reprod.**, v.72, p.788-95, 2005.
- 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.
- 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.
- MEIRELLES, F.V.; Rosa, A.J.M.; Lôbo, B.R. et al. Is the American Zebu really *Bos indicus*? **Genetics and Molecular Biology**, v.22, p.543-547, 1999.
- MIHM M, GOOD TEM, IRELAND JLH, IRELAND JJ, KNIGHT PG, ROCHE JF. Decline in serum follicle-stimulating hormone concentrations alters key intrafollicular growth factors involved in the

- selection of the dominant follicle in heifers. **Biol Reprod.**, v.57, p.1328-337, 1997.
- MIHM, M., AUSTIN, E.J., GOOD, T.E.M., IRELAND, J.L.H., KNIGHT, P.G., ROCHE, J.F., IRELAND, J.J. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. **Biol. Reprod.**, v.63, p.811-9, 2000.
- 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. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinárias e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- MONGET, P., BESNARD, N., HUET, C., PISSELET, C., MONNIAUX, D. Insulin-like growth factor-binding proteins and ovarian folliculogenesis. **Horm. Res.**, v. 45, p.211-217, 1996.
- 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. Fertil.**, v.90, p.523-33, 1990.
- PIERSON, R. A., GUINTER, O.J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, v.29, p.21-37, 1988.
- PUTNEY, D.J., TORRES, C.A.A., GROSS, T.S., THATCHER, W.W., PLANT, C., DROST, M. Modulation of uterine prostaglandin biosynthesis by pregnant and nonpregnant cows at day 17 post-estrous in response to in vivo and in vitro heat stress. **Anim. Reprod. Sci.**, v.20, p.31-47, 1989.
- RHODES, F.M.; DE'ATH, G.; ENTWISTLE, K.W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. **Anim. Reprod. Sci.**, v.38, p.265-77, 1995.
- RIVERA, G.M., FORTUNE, J.E. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins-4 and -5 in bovine follicular fluid: implications for ovarian follicular selection and dominance. **Endocrinology**, v.144, p.2977-2987, 2003a.
- RIVERA, G.M., FORTUNE, J.E. Selection of the dominant follicle and insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: evidence that pregnancy-associated plasma protein A contributes to proteolysis of IGF-binding protein 5 in bovine follicular fluid. **Endocrinology**, v.144, p.437-446, 2003b.

- ROBERSON, M.S., WOLFE, M.W., STUMPF, T.T., KITOK, 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
- SARTORELLI, E.S. **Caracterização da fase de desvio folicular em novilhas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*)**. Botucatu, 2003. 62p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- SAVIO, J.D., KEENAN, L., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F. Pattern of growth of dominant follicles during oestrus cycle of heifers. **J. Reprod. Fertil.**, v.83, p.663-71, 1988.
- SERGERSON; E.C.; HANSEN, T.R.; LIBBY, D.W.; RANDEL, R.D.; GETZ, W.R. Ovarian and uterine morphology and function in Angus Brahman cows. **J. Anim. Sci.**, v. 59, p. 1026-46, 1984.
- SIROIS, J. & FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the oestrus cycle in heifers monitored by Real Time Ultrasonography. **Biol. Reprod.**, v.39, p.308-17, 1988.
- SIROIS, J. & FORTUNE, J.E. Lengthening of the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. **Endocrinology**, v. 127, p. 916-25, 1990.
- SPICER, L.J., ECHTERNKAMP, S.E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. **Domest. Anim. Endocrinol.** v.12, p.223-245, 1995.
- STEWART, R.E., SPICER, L.J., HAMILTON, T.D., KEEFER, B.E. Effects of insulin-like growth factor-I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine thecal cells: involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor-I and luteinizing hormone. **J. Anim. Sci.**, v. 73, p.3719-3731, 1995.
- STEWART, R.E., SPICER, L.J., HAMILTON, T.D., KEEFER, B.E., DAWSON, L.J., MORGAN, G.L., ECHTERNKAMP, S.E. Levels of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins, luteinizing hormone and IGF-I receptors, and steroids in dominant follicles during the first follicular wave in cattle exhibiting regular estrous cycles. **Endocrinology**, v.137, p.2842-2850, 1996.

- 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., RAJAMAHENDRAN, R. Follicular dynamics and corpus luteum growth and function in pregnant versus non pregnant dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.33, p.115-23, 1991.
- TURZILLO, A.M., FORTUNE, J.E. Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian development in heifers. **J. Reprod. Fertil.**, v.89, p. 643-653, 1993.
- WATHES, D.C., SWANN, R.W., BIRKETT, S.D., PORTER, G., PICHERING, B.T. Characterization of oxytocin, vasopressin and neurophysin from the bovine corpus luteum. **Endocrinology**, v.113, p.693-698, 1983.
- WATHES, D.C., SWANN, R.W., PICHERING, B.T. Variations in oxytocin, vasopressin and neurophysin concentrations in the bovine ovary during the oestrous cycle and pregnancy. **J. Reprod. Fertil.**, v.71, p.551-557, 1984.
- WILTBANK, M.C., PURSLEY, J.R., FRICKE, P.M., VASCONCELOS, J., GUENTHER, J.N., GIBBONS, J.R., GINTHER, O.J. Development of AI and ET programs that do not require detection of estrus using recent information on follicular growth. In: ANNUAL CONVENTION PORTLAND, 15, 1996, Oregon. **Proceedings...Oregon: American Embryo Transfer Association**, p.23-24, 1996.
- XU, Z., GARVERICK, H.A., SMITH, G.W., SMITH, M.F., HAMILTON, S.A., YOUNGQUIST, R.S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biol. Reprod.**, v.53, p.951-7, 1995.
- YUAN, W., BAO, B., GARVERICK, H.A., YOUNGQUIST, R.S., LUCY, M.C. Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF-1), IGF-II and IGF binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.15, p.55-63, 1998.