

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**INDUÇÃO DA OVULAÇÃO E FUNCIONALIDADE DO CORPO
LÚTEO EM NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES**

Dayane Priscila Vrisman

Médica Veterinária

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**INDUÇÃO DA OVULAÇÃO E FUNCIONALIDADE DO CORPO
LÚTEO EM NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES**

Dayane Priscila Vrisman

Orientadora: Profa. Dra. Maria Emilia Franco Oliveira

Coorientadores: Prof. Dr. Pedro Paulo Maia Teixeira

Dr. Fábio Morato Monteiro

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Medicina Veterinária
(Reprodução Animal)**

2017

V983i Vrisman, Dayane Priscila
Indução da ovulação e funcionalidade do corpo lúteo em novilhas
Nelore pré-púberes / Dayane Priscila Vrisman. -- Jaboticabal, 2017
viii, 48 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientadora: Maria Emilia Franco Oliveira
Coorientadores: Fábio Morato Monteiro, Pedro Paulo Maia Teixeira
Banca examinadora: Lindsay Unno Gimenes, Pietro Sampaio
Baruselli
Bibliografia

1. Ciclo estral curto. 2. Dispositivo de progesterona. 3. GnRH. 4.
Indução hormonal. 5. Puberdade. 6. Luteólise prematura. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

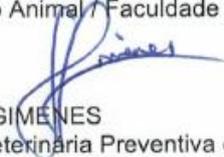
**TÍTULO: INDUÇÃO DA OVULAÇÃO E FUNCIONALIDADE DO CORPO LÚTEO EM
NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES**

**AUTORA: DAYANE PRISCILA VRISMAN
ORIENTADORA: MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA
COORIENTADOR: FABIO MORATO MONTEIRO
COORIENTADOR: PEDRO PAULO MAIA TEIXEIRA**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: REPRODUÇÃO ANIMAL pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. PIETRO SAMPAIO BARUSELLI
Departamento de Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP - São Paulo


Profa. Dra. LINDSAY UNNO GIMENES
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 18 de abril de 2017.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Dayane Priscila Vrisman, nascida em Ponta Grossa – Paraná aos vinte nove dias do mês de setembro do ano de mil novecentos e oitenta e sete. Possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO) Guarapuava – Paraná no ano de dois mil e nove a dois mil e treze. Durante o período participou de diversos cursos de aprimoramento e atualização, além de congressos, encontros, jornadas e estágios extracurriculares. Defendeu trabalho de conclusão de curso intitulado “Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) em Bovino Leiteiro” sob orientação do Msc. Marlon Richard Hilário da Silva. No ano de dois mil e quatorze realizou aprimoramento em Obstetrícia e Reprodução Animal, na mesma instituição, e prestou assistência veterinária na área reprodutiva aos produtores cooperados da COAMIG. Ao final, gerou a publicação do trabalho “Avaliação Reprodutiva de Bovinos de Leite da região de Guarapuava-Pr”, sob orientação da Dr. Kate Aparecida Buzi. Foi aprovada na seleção de mestrado da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Jaboticabal, para início do curso em dois mil e quinze. Foi bolsista FAPESP, processo número 2015/13079-0. Durante o período apresentou trabalhos em congressos renomados, como o 18th International Congress on Animal Reproduction e 30th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society no ano de dois mil e dezesseis. Ao final gerou o trabalho intitulado “Indução da ovulação e funcionalidade do corpo lúteo em novilhas Nelore pré-púberes” sob orientação da Dr. Maria Emilia Franco Oliveira e co-orientação dos Dr(s). Fábio Morato Monteiro e Pedro Paulo Maia Teixeira. Concluiu o mestrado aos dezoito dias do mês de abril do ano de dois mil e dezessete.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

Dedico esse trabalho aos meus pais DANIEL RICARDO VRISMAN e HELENA MARIA PRINS VRISMAN e ao meu irmão CLÁUDIO MAURÍCIO VRISMAN. Obrigada por todo carinho e dedicação mesmo à distância. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir chegar até aqui, e estar presente ao meu lado em todos os dias da minha vida, guiando e abençoando os meus passos.

Aos meus pais e irmão pelo apoio incondicional, pela força e pelos conselhos que me deram, sempre estando ao meu lado em todos os momentos. À minha avó Marchien (*in memoriam*) de quem sinto muita saudade. Vocês é que me dão forças para lutar, continuar e a não desistir!

À minha orientadora e aos meus co-orientadores Fábio e Pedro Paulo, pelos ensinamentos passados durante esses dois anos, pela ajuda, incentivo e amizade.

À minha amiga Thuanny, que considero como uma irmã. Obrigada pela cumplicidade e apoio nos momentos mais difíceis.

Às minhas amigas do Paraná, Tanaane, Andreia, Liliane, Bruna, Fernanda e Camila por estarem presentes em minha vida mesmo à distância. Vocês faziam dos meus dias os mais felizes, mesmo com uma simples mensagem.

Aos amigos da FCAV Mariana, Giovanna, Marjury, Renata, Rozana, Vanessa, Victor, Rodrigo, Guilherme e Felipe. Obrigada pela amizade, incentivo e disposição em sempre ajudar. Em especial à Priscila, Naiara e Augusto, que estavam presentes diariamente e deixavam os meus dias mais alegres.

Aos professores e funcionários do Departamento de Reprodução Animal da FCAV. Obrigada pelos ensinamentos, amizade e incentivo diário.

Aos amigos que fiz em Jaboticabal, Philipe, Vanessa, Carol, Maynumi, Jessica e Yuri. Vocês tornavam os meus dias mais divertidos após um dia de trabalho.

Aos amigos da IPJ, pastor Pedro e Fabiana, seu Ivan e dona Penha, Lúcio e Elisângela, seu Virgílio, Aline, Minari, Angélica e Luíza. Obrigada pelas mensagens de conforto e ânimo.

Aos amigos da UNIFRAN que me ajudaram muito na realização do projeto piloto.

Ao Instituto de Zootecnia em Sertãozinho e aos pesquisadores da instituição. Obrigada pela disponibilidade dos animais e estrutura para realização do experimento.

Aos estagiários e mestrandos do IZ, Gabi Voltareli, André, Bianca, Rogério, Luana, Gabi Geraldi, Laura, Aska, Maranhão, Zumbi, Luan, Pedro, Renan, Jeferson e Luis Henrique. Vocês foram minha família durante o tempo que fiquei na fazenda. Obrigada por tudo mesmo e saibam que podem contar comigo para o que precisarem. Em especial à Natália que me ajudou em todos os dias do experimento.

Aos funcionários e campeiros do IZ, ao Fran, Pedrão, Coalhada, Down, Valdir, Valdemar e Leo. Agradeço muito a vocês pela ajuda que me deram e à dona Tete, uma mãe, sempre disposta a fazer tudo por todos.

À CAPES e a FAPESP (processo nº 2015/13079-0) pela bolsa concedida.

À todos que de alguma forma ajudaram nesse trabalho.

Todos vocês fazem parte dessa conquista. Muito Obrigada!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	viii
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais	1
1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura	3
<i>2.1 Endocrinologia da puberdade em fêmea bovina</i>	<i>3</i>
<i>2.2 Dinâmica luteal: luteogênese e luteólise</i>	<i>4</i>
<i>2.3 Regressão prematura do corpo lúteo no primeiro ciclo estral</i>	<i>6</i>
<i>2.4 Efeito da pré-exposição à progesterona na fertilidade e características do corpo lúteo formado</i>	<i>7</i>
REFERÊNCIAS.....	9
CAPÍTULO 2 – Dinâmica de corpos lúteos formados após protocolos de indução da ovulação com ou sem prévia exposição à progesterona em novilhas Nelore pré-púberes.....	14
1. Introdução	16
2. Material e Métodos.....	199
<i>2.1 Localização e caracterização da área</i>	<i>199</i>
<i>2.2 Animais e tratamentos</i>	<i>19</i>
<i>2.3 Avaliações do CL após indução da ovulação.....</i>	<i>20</i>
<i>2.4 Análise das imagens formadas</i>	<i>21</i>
<i>2.5 Colheita de sangue e determinação da concentração sérica de progesterona.....</i>	<i>22</i>

2.6 *Análise estatística*23

3. Resultados**24**

4. Discussão**28**

5. Conclusão.....**34**

REFERÊNCIAS35



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

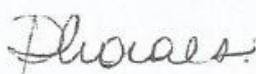


CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 12146/15 do trabalho de pesquisa intitulado "**Avaliação de atributos ultrassonográficos (Modo-B e Doppler) de corpos lúteos formados após indução da puberdade em novilhas Nelore e sua relação com a funcionalidade**", sob a responsabilidade da Dr^a Maria Emília Franco Oliveira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 06 de julho de 2015.

Jaboticabal, 06 de julho de 2015.


Prof^a Dr^a Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

INDUÇÃO DA OVULAÇÃO E FUNCIONALIDADE DO CORPO LÚTEO EM NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES

RESUMO - Devido a comum ocorrência de regressão prematura (RP) do corpo lúteo (CL) em novilhas após primeira ovulação (OV), os objetivos do estudo foram: 1) acompanhar a dinâmica lútea após indução da OV em novilhas Nelore pré-púberes e 2) determinar diferenças relacionáveis a funcionalidade dessa estrutura. Cinquenta e sete fêmeas ($289,61 \pm 32,28$ kg, ECC de $5,66 \pm 0,65$ e $17,47 \pm 0,81$ meses de idade) foram divididas em dois grupos de tratamento para indução da OV. No grupo GP4+GnRH foi utilizado dispositivo intravaginal de progesterona (P4) de 3^o uso por 10 dias e, 48 horas após remoção, aplicado 0,02mg de acetato de buserelina (GnRH), e no grupo GGnRH foi utilizado somente o GnRH. Os CLs formados foram acompanhados pela ultrassonografia a cada dois dias até a sua regressão funcional (diminuição do sinal vascular do Doppler colorido e concentrações de P4 abaixo de 1 ng/mL), sendo determinado para cada dia o diâmetro, área, valores numéricos (VPN) e heterogeneidade dos pixels e percentual (%) de vascularização. A velocidade do pico sistólico, velocidade diastólica final, índice de resistência e o índice de pulsatilidade (IP) da artéria ovariana também foram determinados para cada avaliação, além da concentração sérica de P4. Essas características foram comparadas entre os tratamentos, funções dos CLs (duração normal ou regredido prematuramente), dias das avaliações e suas interações, utilizando o procedimento MIXED do programa SAS ($p \leq 0,05$). Três animais de cada tratamento não responderam ao indutor da OV ($6/57=11\%$), o que determinou taxa de ovulação de 89%. No GP4+GnRH foi observado maior % de CLs com duração normal (81%), e no GGnRH de afuncionais (52%; concentração sérica de P4 inferior a 1 ng/mL em todas as avaliações). Os CLs de duração normal apresentaram maior área, % de vascularização e concentração de P4 quando comparado com as outras categorias estabelecidas. Menores valores para o diâmetro, área ($31,89 \pm 11,46 \text{mm}^2$), VPN ($84,05 \pm 2,90$) e concentração de P4 foram observados para os CLs afuncionais e, os regredidos prematuramente, além de não diferirem em relação ao % de vascularização com os afuncionais, apresentaram valores intermediários para a área e concentração de P4. A P4 foi efetiva no diagnóstico da RP e afuncionalidade dos CLs, apresentando correlação positiva com a área ($r=0,62$; $p < 0,001$) e com o % de vascularização do CL ($r=0,38$; $p < 0,001$). As características diâmetro do CL e IP foram importantes no diagnóstico precoce da afuncionalidade e RP, respectivamente. Maior relação da área do CL com a concentração de P4 foi observada ($R^2=0,53$). Em conclusão, o primeiro CL formado após indução da OV de novilhas pré-púberes apresentou diferenças quanto a funcionalidade, podendo ser diferenciada por meio dos parâmetros ultrassonográficos diâmetro e área do CL, VPN, % de vascularização e IP.

Palavras-chave: ciclo estral curto, dispositivo de progesterona, GnRH, indução hormonal, puberdade, luteólise prematura

OVULATION INDUCTION AND FUNCTIONALITY OF THE CORPUS LUTEUM IN PREPUBERTAL NELLORE HEIFERS

ABSTRACT – Due to the common occurrence of premature regression (PR) of the corpus luteum (CL) in heifers after the first ovulation (OV), the aims of this study were to: 1) monitor the luteal dynamics after OV induction in prepubertal Nellore heifers, and 2) determine differences related to the functionality of this structure. Fifty-seven females (BW 289.61 ± 32.28 kg, BCS 5.66 ± 0.65 and 17.47 ± 0.81 months old) were divided into two treatment groups for OV induction. In the group GP4+GnRH, an intravaginal progesterone (P4) device of 3rd use was used for 10 days and, 48 hours after its removal 0.02 mg of buserelin acetate (GnRH) was applied, and in the GGnRH group only GnRH was used. Formed CLs were monitored via ultrasonography every two days until functional regression (decrease of the vascular signal of color Doppler and serum P4 concentrations below 1 ng/mL), being determined for each day the diameter, area, numerical values (NV) and heterogeneity of the pixels, and vascularization percentage (%). The systolic and diastolic peak velocity, resistance and pulsatility index (PI) of the ovarian artery were also determined for each day in addition to the serum P4 concentration. These characteristics were compared between treatments, CLs functions (normal duration or prematurely regressed), days of evaluations and their interactions, using the MIXED procedure of SAS program ($p \leq 0.05$). Three animals from each treatment did not respond to the OV inductor ($6/57=11\%$), which determined an ovulation rate of 89%. In GP4+GnRH, a higher percentage of CLs with normal duration was observed (81%), while in the GGnRH the percentage of nonfunctional CLs was higher (52%; serum P4 concentration of less than 1 ng/mL in all evaluations). The CLs of normal duration presented greater area, % of vascularization and concentration of P4 when compared with other categories. Lower values for the diameter, area ($31.89 \pm 11.46 \text{mm}^2$), NV (84.05 ± 2.90) and concentration of P4 were observed for the nonfunctional CLs and, those that regressed prematurely, presented intermediate values for the area and serum P4 concentration and did not differ in relation to the % of vascularization with the nonfunctional. The P4 was effective in the diagnosis of regressed prematurely and nonfunctional of CLs, presenting a positive correlation with the area ($r=0.62$; $p<0.001$) and, with the % of CL vascularization ($r=0.38$; $p<0.001$). The diameter of CL and PI were important in the early diagnosis of the nonfunctionality and PR, respectively. Greater relation of the area of the CL with the concentration of P4 was observed ($R^2=0.53$). In conclusion, the first CL formed after OV induction in prepubertal heifers showed differences in functionality that can be differentiated by ultrasonography parameters diameter and area of CL, NV, % of vascularization and PI.

Keywords: short estrous cycle, progesterone device, GnRH, hormonal induction, puberty, premature luteolysis

LISTA DE ABREVIATURAS

CL	-	corpo lúteo
ECC	-	escore de condição corporal
FSH	-	hormônio folículo estimulante
GnRH	-	hormônio liberador de gonadotrofinas
IFN- τ	-	interferon τ
IL-1	-	interleucina 1
IP	-	índice de pulsatilidade
IR	-	índice de resistência
LH	-	hormônio luteinizante
mg	-	miligrama
mL	-	mililitros
ng	-	nanograma
OXT	-	ocitocina
P4	-	progesterona
PGE ₂	-	prostaglandina E ₂
PGF _{2α}	-	prostaglandina F _{2α}
kg	-	quilograma
RP	-	regressão prematura
StAR	-	proteína aguda reguladora da esteroidogênese
TNF- α	-	fator de necrose tumoral
VDF	-	velocidade diastólica final
VPN	-	valores numéricos de pixels
VPS	-	velocidade do pico sistólico
3 β -HSD	-	enzima 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase

LISTA DE TABELAS**Página**

- Tabela 1.** Média estimada (\pm erro padrão) para o diâmetro do folículo (mm) no dia da aplicação do GnRH, a duração dos CLs (dias), a incidência dos animais (%), a área (mm²), média e heterogeneidade dos valores numéricos dos pixels e percentual de vascularização para as diferentes funções de CL estabelecida para cada tratamento (GP4+GnRH e GGnRH) após indução da ovulação de novilhas Nelore pré-púberes.....44
- Tabela 2.** Média estimada (\pm erro padrão) da área do CL, heterogeneidade dos pixels, percentual da vascularização do CL e velocidade do pico sistólico ao longo dos dias das avaliações (D2-28) após indução da ovulação de novilhas Nelore pré-púberes.....46
- Tabela 3.** Média estimada (\pm erro padrão) da velocidade diastólica final e índice de resistência ao longo dos dias das avaliações (D2-22) em cada tratamento (GP4+GnRH e GGnRH) após indução da ovulação de novilhas Nelore pré-púberes.....47

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Diagrama esquemático dos tratamentos e avaliações experimentais. (A): tratamento utilizando dispositivo de progesterona e indutor da ovulação; (B): tratamento utilizando somente indutor da ovulação.....	41
Figura 2. Média estimada ao longo dos dias das avaliações para as diferentes funções dos CLs estabelecidas em cada tratamento após indução da ovulação de novilhas Nelore pré-púberes para as variáveis (A): diâmetro do CL, (B): índice de pulsatilidade e, (C): concentração sérica de progesterona.....	42

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. Introdução

A bovinocultura de corte é uma atividade de grande importância econômica para o Brasil, pois conta com o maior rebanho comercial do mundo, tendo aproximadamente 213 milhões de cabeças (ANUALPEC, 2014). Entretanto, os sistemas de criação predominantes são caracterizados por baixos índices zootécnicos, em consequência de falhas no manejo nutricional, reprodutivo e sanitário principalmente (HOFFMANN et al., 2014; TORRES-JÚNIOR et al., 2009).

A produtividade dos bovinos de corte no Brasil é reconhecidamente baixa e parte desse atraso pode ser atribuída à idade tardia ao primeiro serviço das novilhas. O ideal é o primeiro serviço ocorrer entre os 14-15 meses de idade (se tiverem atingido 60-65% do peso adulto) e a primeira parição aos 24 meses. Porém na maioria das propriedades brasileiras o primeiro serviço das novilhas ocorre ao redor de 24-36 meses de idade e a primeira parição acima dos 44-48 meses (NOGUEIRA, 2004). Esse atraso no início da vida reprodutiva da fêmea resulta em diminuição na taxa de desfrute do rebanho e menor quantidade de bezerros em sua vida reprodutiva. Portanto, a idade ao primeiro parto é um dos aspectos que refletem diretamente a eficiência reprodutiva do rebanho (ROCHA e LOBATO, 2002).

Alternativas de manejo para antecipar a concepção de novilhas, fazendo com que venham a parir mais cedo dentro da próxima estação reprodutiva, desmamando bezerros mais pesados e aumentando suas possibilidades de repetição de prenhez como primíparas em sua vida reprodutiva, como um todo seriam de muita utilidade (AZEREDO, 2008). Porém os trabalhos relatam que o primeiro ciclo estral da novilha, determinado pela primeira demonstração do estro, é infértil (BYERLEY et al., 1987; CLARO JÚNIOR et al., 2010). Isso acontece porque ela ainda não está madura sexualmente e devido à ocorrência de regressão prematura (RP) do primeiro corpo lúteo (CL) formado. Normalização ocorre nos 2 a 3 ciclos subsequentes (NOGUEIRA, 2004).

Uma das causas desse efeito é a primeira ovulação acontecer sem prévia exposição à progesterona (P4). Por isso, uma das formas de reduzir a baixa taxa de prenhez em novilhas no seu primeiro ciclo estral é pré-expor o animal a uma fonte exógena de P4. Para Sá Filho et al. (2009), a pré-exposição à P4 exógena em novilhas aumenta a taxa de manifestação do estro, induz a ovulação, aumenta o percentual de animais com CL de duração normal após sua utilização, minimizando a RP (RASBY et al., 1998). Em estudo realizado por Copelin e colaboradores (1987), foi observado que o segundo ciclo estral pós-parto, ou seja, o ciclo estral que sucede um de curta duração, apresentou duração normal, indicando que a exposição à P4 previamente à ovulação é um fator determinante na duração do subsequente CL.

Recentemente esse manejo vem trazendo resultados benéficos pelo emprego de protocolos de indução da puberdade nas propriedades, em que se utilizam dispositivos de P4 (CABRAL et al., 2013; CLARO JÚNIOR et al., 2010; RODRIGUES et al., 2014). Realizando esse procedimento, a novilha poderá ser inseminada em seu ciclo estral subsequente, pois como citado anteriormente, a duração do CL estará dentro dos limites fisiológicos (ATKIS et al., 2013).

Dada a importância do tema e as perdas econômicas que ela determina, o objetivo do presente trabalho foi de estudar a dinâmica de desenvolvimento (por meio de parâmetros ultrassonográficos modo-B, Doppler colorido e espectral) do CL formado no primeiro ciclo estral após indução da ovulação em novilhas Nelore pré-púberes, a fim de determinar diferenças relacionáveis a sua funcionalidade.

2. Revisão de Literatura

2.1 Endocrinologia da puberdade em fêmea bovina

A puberdade em fêmeas bovinas acontece quando a ovulação é acompanhada de sinal do estro e com subsequente duração da fase lútea normal para a espécie (ATKIS et al., 2013).

Após o nascimento das bezerras ocorre diminuição nas concentrações circulantes do hormônio luteinizante (LH) (fase estática), o qual aumenta a partir do 2º até o 6º mês de vida, semelhantemente ao que acontece com o hormônio folículo estimulante (FSH) (período de desenvolvimento). Porém, do 6º ao 10º mês aproximadamente, ocorre inibição na liberação das gonadotrofinas, principalmente do LH, devido a um bloqueio no sistema hipotálamo-hipófise-gonadal (fase estática). Com o passar da idade e quanto mais próxima à puberdade, o bloqueio diminui, e o aumento na liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) faz restabelecer novamente a atividade gonadal (período peripuberdade), dando início ao período de maturidade sexual (NOGUEIRA, 2004; DAY e ANDERSON, 1998).

Algumas hipóteses descrevem os fatores responsáveis pelo bloqueio da atividade gonadal em bovinos após o nascimento. Dentre elas temos a hipótese “gonadostática” e a “central ou neuronal” (CARDOSO e NOGUEIRA, 2007; NOGUEIRA, 2004).

Na hipótese mais aceita entre os pesquisadores, a “gonadostática”, o bloqueio ocorre devido ao excesso de receptores para esteroides no hipotálamo, e a alta sensibilidade que esse aumento provoca à região. O excesso e a alta sensibilidade provocam *feedback* negativo nos hormônios reprodutivos secretados pelo hipotálamo e hipófise, os quais são liberados em baixa frequência e amplitude. Com o decorrer da idade da novilha a sensibilidade no hipotálamo diminui, desencadeando aumento na secreção do GnRH e aumento na frequência da liberação pulsátil de LH, necessários ocorrência da primeira ovulação (ATKIS et al., 2013; CARDOSO e NOGUEIRA, 2007).

Para a teoria “central ou neuronal” o bloqueio na secreção das gonadotrofinas é devido à presença de neurotransmissores que estimulam ou inibem sua secreção, independente da ação dos esteroides (DONOVAN e VAN DER WERFF *apud*

OJEDA e URBANSKI, 1994). Dentre os excitatórios temos os aminoácidos glutamato e aspartato, neuropeptídeo Y, noraepinefrina, noradrenalina; e dentre os inibitórios o ácido alfa-aminobutírico (GABA), dopamina, opióides endógenos e endorfinas (CARDOSO e NOGUEIRA, 2007).

2.2 *Dinâmica luteal: luteogênese e luteólise*

Fase lútea ou diestro é o período do ciclo estral em que há presença de CL no ovário e elevadas concentrações de P4. Em bovinos essa fase corresponde do dia 4 ao dia 17 do ciclo aproximadamente (BERISHA e SCHAMS, 2005).

No início há o processo de luteogênese ou luteinização, ou seja, a formação do CL, resultante da ovulação de um folículo. Esse processo envolve a transformação do folículo pré-ovulatório, que secreta estrógeno, em tecido luteal, estrutura altamente vascularizada e capaz de secretar P4, desencadeado pelo pico pré-ovulatório de LH. As células da granulosa e teca interna do folículo formam as células luteínicas grandes e pequenas, respectivamente (FERREIRA, 2010).

A luteinização envolve hiperplasia das células luteínicas pequenas e hipertrofia das células grandes, migração celular e intensa angiogênese, com proliferação e migração de células endoteliais e formação de rede microvascular no CL em desenvolvimento. Diversos fatores participam desse processo, como: VEGFA (fator de crescimento vascular endotelial), FGF (fator de crescimento de fibroblasto), IGFs (fatores de crescimento), angiopoietina I e II e angiotensina II (TAMANINI e AMBROGI, 2004).

Durante a fase lútea o fluxo sanguíneo para o CL aumenta gradualmente com o aumento do seu volume e concentrações plasmáticas de P4 (LÜTTGENAU e BOLLWEIN, 2014). Em seu pleno desenvolvimento, representa de 65-95% do fluxo sanguíneo para o ovário (FERREIRA, 2010).

Ao final do ciclo há o processo de luteólise ou regressão do CL, em que a persistência dessa estrutura no ovário determina a duração do ciclo estral. É definida como perda da sua função, sendo caracterizada pelo declínio da secreção de P4 (luteólise funcional) seguido pela mudança da sua estrutura celular (luteólise estrutural). O início desse processo ocorre normalmente 17 a 20 dias após a ovulação (SÁ FILHO e VASCONCELOS, 2008).

A luteólise funcional ocorre devido a secreção de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) pelo endométrio em padrão pulsátil, a qual atinge o CL por meio do sistema de transporte local veno-arterial contra-corrente (CUNNINGHAM, 2004). Ela reduz o suporte vascular para o tecido lúteo devido a vasoconstrição das arteríolas (causada principalmente pela endotelina-1), ocasionando diminuição na concentração de P4 em aproximadamente 8 horas (TREVISOL et al., 2015).

A produção e liberação de $PGF_{2\alpha}$ é estimulada pela alta concentração de estrógeno secretado pelo folículo pré-ovulatório no final da fase lútea, o qual estimula a liberação de ocitocina (OXT) pela neuro-hipófise. O alto estrógeno aumenta os receptores de OXT no endométrio e a ligação com seu receptor promove a liberação da $PGF_{2\alpha}$ (FERREIRA, 2010^a).

Após ser liberada, a $PGF_{2\alpha}$ inicialmente provoca aumento no fluxo sanguíneo para o CL (vasodilatação), para estimular as células endoteliais a produzir e liberar substâncias vasoativas importantes para dar seguimento ao processo, e também para permitir maior chegada de $PGF_{2\alpha}$ ao CL. Outro potente vasodilatador citado na literatura é o óxido nítrico (SKARZYNSKI et al., 2005). Posteriormente ao aumento transitório do fluxo sanguíneo, ocorre a vasoconstrição dos vasos, ocasionando menor chegada de sangue, nutrientes, substratos para a esteroidogênese e oxigênio para o CL, resultando em hipóxia e morte celular do tecido (MIYAMOTO e SHIRASUANA, 2009).

O resultado ocasionado pela luteólise funcional determina o início da luteólise estrutural. Esta é caracterizada pela fragmentação dos componentes celulares, proliferação do tecido conjuntivo, desorganização celular, degeneração e fagocitose das células luteínicas (MILVAE et al., 1996), em decorrência da liberação de citocinas e agentes inflamatórios. A interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral ($TNF-\alpha$), ambos produzidos pelos macrófagos, estimulam a produção de $PGF_{2\alpha}$ pelas células do CL e inibem a secreção de P4 (SKARZYNSKI et al., 2005).

O processo da luteólise funcional, desde o início da liberação da $PGF_{2\alpha}$ até a concentração de P4 atingir valores inferiores a 1 nanograma(ng)/mililitros(mL), dura aproximadamente 30 horas (GINTHER et al., 2007). Na luteólise estrutural após 2 a 3 ciclos estrais o CL regredido permanece no ovário como uma cicatriz, o *corpus albicans*, constituído de tecido conectivo e colágeno (FERREIRA, 2010^a).

2.3 Regressão prematura do corpo lúteo no primeiro ciclo estral

Considera-se RP quando essa ocorre antes do 16º dia do ciclo estral, antes do momento que o endométrio inicia a secreção pulsátil de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em um ciclo de duração normal (GARVERICK et al., 1992). É uma alteração comum em novilhas após a sua primeira ovulação e em vacas no pós-parto (TAPONEN et al., 2003). Em novilhas acontece por elas ainda não estarem maduras sexualmente (SÁ FILHO e VASCONCELOS, 2008). Esses ciclos geralmente são acompanhados por baixas taxas de concepção, pois o CL regride quando o embrião ainda não é capaz de produzir interferon τ (IFN- τ , hormônio responsável pelo reconhecimento materno-fetal) suficiente para bloquear a luteólise, ocasionando nesses casos a morte embrionária precoce (MANN e LAMMING, 2001).

As principais causas reportadas nos trabalhos para a ocorrência da RP do CL nos bovinos são: (1) folículo ovulatório com desenvolvimento inadequado (RAMIREZ-GODINEZ et al., 1981). A ovulação de folículos jovens resulta na formação de CL com diâmetro pequeno. O CL de tamanho pequeno não produz quantidades elevadas de P4, o qual perderá sua função rapidamente, ocasionando o fenômeno da RP (TAPONEN et al., 2003); (2) secreção endometrial prematura de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Dessa forma a luteólise irá ocorrer assim que o CL apresente receptores para esse hormônio, por volta do sexto dia do ciclo estral (FERREIRA, 2010^a); (3) ovulação sem prévia exposição à P4. Segundo Sá Filho e Vasconcelos (2008), o mecanismo pelo qual a P4 evita a ocorrência de ciclos curtos envolve a inibição dos receptores de OXT no endométrio após a ovulação. Com a inibição do receptor pela P4, a OXT não consegue se ligar ao seu receptor, e dessa forma não há o estímulo luteolítico prematuro, pois não há liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$; (4) consequência de baixas concentrações de estradiol pré-ovulatório. O estrógeno induz a formação de receptores de OXT no endométrio (FERREIRA, 2010^a) e, segundo Mann e Lamming (2000), o menor padrão de secreção de estrógeno pelo folículo dominante resulta em alteração na expressão dos receptores de OXT no endométrio, possibilitando a secreção prematura de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Garverick et al. (1988), observaram que o pré-tratamento com P4 em animais pós-parto também resulta em maiores concentrações de estrógeno pré-ovulatório e; (5) falhas no desenvolvimento vascular do folículo

pré-ovulatório e no início da formação do CL (BERISHA e SCHAMS, 2005), comprometendo seu desenvolvimento e o processo de luteólise.

Nos ciclos estrais iniciais a manifestação do estro e a fertilidade aumentam gradativamente, para que a novilha adquira capacidade de conceber e levar a gestação a termo (SANTOS e SÁ FILHO, 2006). Byerley e colaboradores (1987), observaram aumento na taxa de concepção de novilhas cobertas em seu primeiro vs. terceiro estro, 57% vs. 78% respectivamente. Claro Júnior et al. (2010), também relataram aumento na taxa de prenhez (27,4 vs. 47,7%) de novilhas pré-púberes utilizando tratamento com P4 exógena antes do início da estação de monta. Por isso a importância da novilha apresentar sua primeira ovulação um a três meses antes do início da estação de monta (AZEREDO, 2008).

2.4 Efeito da pré-exposição à progesterona na fertilidade e características do corpo lúteo formado

A P4 é um hormônio esteroide, lipossolúvel e derivada do colesterol, produzido pelo CL, placenta e córtex da glândula adrenal. No ovário, é sintetizado pelas células luteínicas esteroidogênicas e liberada para a circulação sistêmica, tendo funções em seus órgãos-alvo. No endométrio prepara o ambiente para implantação e manutenção da gestação, inibindo a motilidade uterina e, no sistema nervoso central (SNC), bloqueia a secreção de GnRH pelo hipotálamo e FSH pela hipófise, inibindo o pico pré-ovulatório de LH (FERREIRA, 2010).

A concentração de P4 produzida na fase lútea de um ciclo anterior regula o estabelecimento e o tempo dos mecanismos da RP (INSKEEP, 2004). Esse mesmo autor relata que quando a P4 é baixa ou ausente antes da ovulação, como acontece com novilhas quando atingem a maturidade sexual, é frequente a ocorrência dessa alteração.

Pré-tratamentos com P4 em vacas no pós-parto (comum apresentar RP como novilhas) e protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), que utilizam dispositivo de P4, melhoram a fertilidade dos animais e previnem a ocorrência da RP (INSKEEP, 2004; SÁ FILHO et al., 2009; STEVENSON e LAMB, 2016).

Um mecanismo que explica essa melhora na fertilidade é que o tratamento com P4 aumenta a atividade da enzima 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase (3 β -

HSD), a qual estimula a expressão de RNA mensageiro para a proteína StAR (proteína aguda reguladora da esteroidogênese) e citocromo P450 (KOTWICA, et al., 2004), elementos responsáveis pela conversão do colesterol a P4. A proteína StAR é responsável pelo transporte do colesterol (proveniente do citoplasma da célula da teca) do espaço intermembranar para a matriz mitocondrial, onde se encontram enzimas do complexo P450, que participam da conversão do colesterol em pregnenolona. No exterior da mitocôndria, a 3β -HSD faz a conversão da pregnenolona em P4 no citoplasma das células da teca (LIMA-VERDE et al., 2011). O aumento na atividade dessas enzimas e, existindo substrato suficiente (colesterol), resultam em aumento na produção de P4.

Além disso, o tratamento com P4 estimula a secreção de prostaglandina E_2 (PGE_2), o qual aumenta a síntese de P4 pelas células luteínicas e diminui a produção e secreção de $PGF_{2\alpha}$ pelo endométrio, protegendo dessa forma o CL contra RP (KOTWICA et al., 2004). Isso ocorre devido à ação luteotrófica da PGE_2 .

Segundo Braden et al. (1989), os CLs que sofrem RP não diferem dos que apresentam duração normal com relação ao peso, concentrações de P4, receptores de LH e $PGF_{2\alpha}$. Já segundo O'Shea et al. (1984), CLs que apresentam RP apresentam menor número e tamanho de células luteínicas.

Alguns trabalhos relatam que a influência da P4 na funcionalidade da fase lútea do ciclo subsequente inicia no desenvolvimento folicular, por afetar as características do folículo dominante e seu desenvolvimento antes da ovulação (CHRISTENSEN et al., 2014; TAMANINI e AMBROGI, 2004). Inadequado desenvolvimento na microvascularização do folículo pré-ovulatório pode ser a causa da alteração da função lútea no primeiro ciclo estral após a puberdade, uma vez que o suporte vascular é essencial para o desenvolvimento do CL normal (BERISHA e SCHAMS, 2005). Essas alterações podem ser evitadas pela pré-exposição do animal à P4, uma vez que ela altera a expressão dos fatores de crescimento angiogênicos no folículo ovariano, não comprometendo o desenvolvimento vascular do CL inicial e sua posterior função (CHRISTENSEN et al., 2014).

REFERÊNCIAS

ANUALPEC 2014. Anuário da Pecuária Brasileira, 2014, Instituto FNP, São Paulo.

ATKINS, J.A.; POHLER, K.G.; SMITH, M.F. Physiology and Endocrinology of Puberty in Heifers. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 29, p. 479-493, 2013.

AZEREDO, D.M. **Alternativas para indução da ovulação e do estro em novilhas de corte peripúberes**. 139f. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

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

BYERLEY, D.J.; STAIGMILLER, R.B.; BERARDINELLI, J.G.; SHORT, R.E. Pregnancy rates of beef heifers breed either on pubertal or third estrus. **Journal Animal Science**, v. 65, p. 645-650, 1987.

BRADEN, T.D.; SAWYER, H.R.; NISWENDER, G.D. Functional and morphological characteristics of the first corpus luteum formed after parturition in ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 86, n. 2, p. 525-533, 1989.

CABRAL, J.F.; LEÃO, K.M.; SILVA, M.A.P.; BRASIL, R.B. Indução do estro em novilhas Nelore com implante intravaginal de progesterona de quarto uso. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 49-53, 2013.

CARDOSO, D.; NOGUEIRA, G.P. Mecanismos neuroendócrinos envolvidos na puberdade de novilhas. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, v. 10, n. 1, p. 59-67, 2007.

CHRISTENSEN, A.C.M.; HARESIGN, W.; KHALID, M. Progesterone exposure of seasonally anoestrous ewes alters the expression of angiogenic growth factors in preovulatory follicles. **Theriogenology**, v. 81, p. 358-367, 2014.

CLARO JÚNIOR, I.; SÁ FILHO, O.G.; PERES, R.F.G.; AONO, F.H.S.; DAY, M.L.; VASCONCELOS, J.L.M. Reproductive performance of prepubertal *Bos indicus*

heifers after progestin-based treatments. **Theriogenology**, v. 74, p. 903-911, 2010.

COPELIN, J.P.; SMITH, M.F.; GARVERICK, H.A.; YOUNGQUIST, R.S. Effect of the uterus on subnormal luteal function in anestrous beef cows. **Journal Animal Science**, v. 64, p. 1506-1511, 1987.

CUNNINGHAM, J.C. **Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 3ª ed., 2004.

DAY, M.L.; ANDERSON, L.H. Current concepts on the control of puberty in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 76 (Suplemento 3), p. 1-15, 1998.

FERREIRA, A.M. Reprodução da Fêmea Bovina: Fisiologia aplicada e Problemas mais comuns. In: _____. **Luteogênese: formação do corpo lúteo**. Juiz de Fora: Editar, 2010.

FERREIRA, A.M. Reprodução da Fêmea Bovina: Fisiologia aplicada e Problemas mais comuns. In: _____. **Luteólise: regressão do corpo lúteo**. Juiz de Fora: Editar, 2010^a.

GARVERICK, H.A.; PARFET, J.R.; LEE, C.N.; COPELIN, J.P.; YOUNGQUIST, R.S.; SMITH, M.F. Relationship of pre and post-ovulatory gonadotropin concentrations to subnormal luteal function in postpartum beef cattle. **Journal Animal Science**, v. 66, p. 104-111, 1988.

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

GINTHER, O.J.; SILVA, L.A.; ARAUJO, R.R.; BEG, M.A. Temporal associations among pulses of 13, 14-Dihydro-15-keto-PGF₂α, luteal blood flow, and luteolysis in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 76, p. 506-513, 2007.

HOFFMANN, A.; MORAES, E.H.B.K.; MOUSUQUER, C.J.; SIMIONI, T.A.; JÚNIOR GOMES, F.; FERREIRA, V.B.; SILVA, H.M. Produção de bovinos de corte no sistema de pasto-suplemento no período seco. **Nativa**, v. 2, n. 2, p. 119-130, 2014.

INSKEEP, E.K. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. **Journal Animal Science**, v. 82, p. 24-39, 2004.

KOTWICA, J.; REKAWIECKI, R.; DURAS, M. Stimulatory influence of progesterone on its own synthesis in bovine corpus luteum. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 48, p. 139-145, 2004.

LIMA-VERDE, I.B.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J.R. Influência dos hormônios esteroides na foliculogênese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 472-482, 2011.

LÜTTGENAU, J.; BOLLWEIN, H. Evaluation of bovine luteal blood flow by using color Doppler ultrasonography. **Reproductive Biology**, v. 14, p. 103-109, 2014.

MANN, G.E.; LAMMING, G.E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, v. 121, p. 175-180, 2001.

MANN, G.E.; LAMMING, G.E. The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrous cycle in the cow. **Animal Reproduction Science**, v. 64, p. 171-180, 2000.

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

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K. Luteolysis in the cow: a novel concept of vasoactive molecules. **Animal Reproduction**, v. 6, n.1, p.47-59, 2009.

NOGUEIRA, G.P. Puberty in South America *Bos indicus* (Zebu) cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 361-372, 2004.

OJEDA, S.R.; URBANSKI, H.F. Puberty in the rat. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994.

O'SHEA, J.D.; RODGERS, R.J.; WRIGHT, P.J. Morphometric analysis and function in vivo and in vitro of corpora lutea from ewes treated with LHRH during seasonal anoestrus. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 72, p. 75-85, 1984.

RAMIREZ-GODINEZ, J.A.; KIRACOFE, G.H.; MCKEE, R.M.; SCHALLES, R.R.; KITTOCK, R.J. Reducing the incidence of short estrous cycles in beef cows with norgestomet. **Theriogenology**, v. 15, p. 613-623, 1981.

RASBY, R.J.; DAY, M.L.; JOHNSON, S.K.; KINDER, J.E.; LYNCH, J.M.; SHORT, R.E.; WETTEMANN, R.P.; HAFS, H.D. Luteal function and estrus in peripubertal beef heifers treated with an intravaginal progesterone releasing device with or without a subsequent injection of estradiol. **Theriogenology**, v. 50, p.55-64, 1998.

ROCHA, M.G.; LOBATO, J.F.P. Avaliação do desempenho reprodutivo de novilhas de corte primíparas aos dois anos de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p.1388-1395, 2002.

RODRIGUES, A.D.P.; PERES, R.F.G.; LEMES, A.P.; MARTINS, T.; PEREIRA, M.H.C.; CARVALHO, E.R.; DAY, M.L.; VASCONCELOS, J.L.M. Effect of interval from induction of puberty to initiation of a timed AI protocol on pregnancy rate in Nelore heifers. **Theriogenology**, v. 82, p. 760-766, 2014.

SÁ FILHO, O.G.; VASCONCELOS, J.L.M. Regressão prematura do corpo lúteo em bovinos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, p. 220-233, 2008.

SÁ FILHO, O.G.; THATCHER, W.W.; VASCONCELOS, J.L.M. Effect of progesterone and/or estradiol treatments prior to induction of ovulation on subsequent luteal lifespan in anestrous Nelore cows. **Animal Reproduction Science**, v. 112, p. 95-106, 2009.

SANTOS, J.E.P.; SÁ FILHO, M.F. Nutrição e reprodução em bovinos. In. II Simpósio Internacional de Reprodução Animal aplicada. Londrina, p. 30-54, 2006.

SKARZYNSKI, D.; JAROSZEWSKI, J.J.; OKUDA, K. Role of tumor necrosis factor- α and nitric oxide in luteolysis in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 340-346, 2005.

STEVENSON, J.S.; LAMB, G.C. Contrasting effects of progesterone on fertility of dairy and beef cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 5951-5964, 2016.

TAMANINI, C.; AMBROGI, M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. **Reproduction Animal Domestic**, v. 39, p. 206-2016, 2004.

TAPONEN, J.; HJERPPE, P.; KOPRA, E.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; KATILA, T.; KINDAHL, H. Premature prostaglandin F_{2 α} secretion causes luteal regression in GnRH-induced short estrous cycles in cyclic dairy heifers. **Theriogenology**, v. 60, p. 379-393, 2003.

TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; MELO, W.O.; ELIAS, A.K.S.; RODRIGUES, L.S.; PENTEADO, L.; BARUSELLI, P.S. Considerações técnicas e econômicas sobre reprodução assistida em gado de corte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, p. 53-58, 2009.

TREVISOL, E.; FERREIRA, J.C.; ACKERMANN, C.L.; DESTRO, F.C.; FILHO, W.C.M.; CARMAGOS, A.S.; BIEHL, M.V.; AMARAL, J.B.; PANTOJA, J.C.F.; SARTORI, R.; FERREIRA, J.C.P. Luteal changes after treatment with sub-luteolytic doses of prostaglandin (cloprostenol sodium) in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 153, p. 8-12, 2015.

1 **CAPÍTULO 2 – Artigo elaborado conforme as normas da revista Theriogenology**

2

3 **Dinâmica de corpos lúteos formados após protocolos de indução da ovulação com ou**
4 **sem prévia exposição à progesterona em novilhas Nelore pré-púberes**

5

6 Dayane Priscila Vrisman^{a,*}, Natália Marins Bastos^a, Guilherme Fazan Rossi^a, Luisa Pucci
7 Bueno Borges^b, Bianca Vilela Pires^c, Augusto Ryonosuke Taira^a, Cláudia Cristina Paro de
8 Paz^d, Guilherme de Paula Nogueira^e, Pedro Paulo Maia Teixeira^b, Fábio Morato Monteiro^d,
9 Maria Emília Franco Oliveira^a

10

11 ^aDepartamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Universidade
12 Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, 14884-900,
13 Brasil

14 ^bInstituto de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, 66075-110,
15 Brasil

16 ^cDepartamento de Genética, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 14040-
17 9000, Brasil

18 ^dInstituto de Zootecnia, Centro APTA Bovinos de Corte, Sertãozinho, São Paulo, 14160-970,
19 Brasil

20 ^eLaboratório de Endocrinologia Animal, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
21 (FMVA), Araçatuba, São Paulo, 16050-680, Brasil

22

23 *Correspondência autor: Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade
24 Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Endereço: Via de Acesso Profº. Paulo Donato
25 Castellane, s/n, 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.
26 Tel.: +55 16 3209-7100.
27 E-mail: dayavrisman@hotmail.com (D.P.Vrisman) and m_emiliafraoli@yahoo.com.br
28 (M.E.F. Oliveira).

29

30 RESUMO

31 Os objetivos do estudo foram: 1) acompanhar a dinâmica de estruturas lúteas após indução da
32 ovulação (OV) em novilhas Nelore pré-púberes e 2) determinar diferenças relacionáveis a
33 funcionalidade dessa estrutura. Cinquenta e sete fêmeas ($289,61 \pm 32,28$ kg, ECC $5,66 \pm 0,65$ e
34 $17,47 \pm 0,81$ meses de idade) foram divididas em dois grupos de tratamento: no GP4+GnRH
35 foi utilizado dispositivo de progesterona (P4) de 3º uso por 10 dias e, 48 horas após remoção,
36 aplicado 0,02 mg de acetato de busserelina (GnRH), e no GGnRH foi utilizado somente o
37 GnRH. Os corpos lúteos (CLs) formados foram acompanhados pela ultrassonografia a cada
38 dois dias até a sua regressão funcional (diminuição do sinal vascular do Doppler colorido e
39 concentrações séricas de P4 abaixo de 1 ng/mL), sendo determinado para cada dia o diâmetro
40 (\emptyset), área, valores numéricos (VPN) e heterogeneidade dos pixels e percentual (%) de
41 vascularização. A velocidade do pico sistólico e diastólica final, índice de resistência e
42 pulsatilidade (IP) da artéria ovariana também foram determinados, além da concentração
43 sérica de P4. CLs com fase lútea superior a 16 dias foram classificados como de duração
44 normal (DN), e aqueles com duração inferior a 16 dias como regredidos prematuramente. As
45 características foram comparadas entre os tratamentos, funções dos CLs (DN ou regredidos
46 prematuramente), dias das avaliações e suas interações, utilizando o procedimento MIXED do

47 programa SAS ($p \leq 0,05$). Três animais de cada grupo não responderam ao tratamento
48 (6/57=11%), o que determinou taxa de ovulação de 89%. No GP4+GnRH foi observado
49 maior % de CLs de DN (81%), e no GGnRH de afuncionais (52%; concentração de P4
50 inferior a 1 ng/mL em todas as avaliações). Os CLs de DN apresentaram maior área, % de
51 vascularização e concentração de P4 quando comparado com as outras funções. Menores
52 valores para o \emptyset , área, VPN e concentração de P4 foram observados para os CLs afuncionais,
53 e estes não diferiram no % de vascularização com os regredidos prematuramente. A P4 foi
54 eficiente no diagnóstico da funcionalidade dos CLs, apresentando correlação positiva com a
55 área ($r=0,62$; $p < 0,001$) e com o % de vascularização ($r=0,38$; $p < 0,001$). O \emptyset e IP foram
56 importantes no diagnóstico precoce da afuncionalidade e RP, respectivamente. Em conclusão,
57 o primeiro CL formado após indução da OV de novilhas pré-púberes apresentou diferenças
58 quanto a funcionalidade, podendo ser diferenciada por meio dos parâmetros
59 ultrassonográficos \emptyset e área, VPN, % de vascularização e IP.

60 **Palavras-chaves:** ciclo estral curto, dispositivo de progesterona, GnRH, indução hormonal,
61 puberdade, luteólise prematura

62

63 **1. Introdução**

64 A puberdade em fêmeas bovinas acontece quando a ovulação é acompanhada de sinal
65 do estro e com subsequente duração da fase lútea normal para a espécie [1]. Porém a primeira
66 ovulação das novilhas, em sua grande maioria, é acompanhada de regressão prematura (RP)
67 do corpo lúteo (CL) [2].

68 Considera-se RP quando essa acontece antes do 16º dia do ciclo estral [3] e, em
69 novilhas ocorre por elas ainda não estarem maduras sexualmente [4]. No decorrer dos

70 primeiros ciclos há aumento na manifestação do estro e na fertilidade, para que a fêmea
71 adquira capacidade de conceber e levar a gestação a termo [5].

72 Os estudos relacionados à avaliação ultrassonográfica do CL fornecem informações
73 importantes sobre o status reprodutivo da fêmea bovina, os quais permitem acompanhar a
74 dinâmica de formação, desenvolvimento e regressão da estrutura [6,7]. A imagem do CL ao
75 ultrassom apresenta-se de maneira uniforme, circunscrita e menos ecogênica que o estroma
76 ovariano [6]. Observações mais detalhadas das imagens ultrassonográficas podem ser feitas
77 por meio de análise computadorizada, a qual é baseada na identificação quadro a quadro
78 (pixel) da intensidade do retorno da onda ultrassonográfica, refletida pela escala de cinza
79 gerada na imagem, aplicada na avaliação da ecogenicidade e ecotextura do CL [8]. Estudo
80 realizado por Siqueira e colaboradores [7], observaram que a mensuração da ecotextura tem
81 potencial para indicar a funcionalidade e capacidade esteroidogênica do CL, sendo uma área a
82 ser explorada nas próximas pesquisas.

83 A ultrassonografia Doppler colorido é um método que fornece informações em tempo
84 real sobre a arquitetura vascular de qualquer estrutura, sendo possível estimar a perfusão
85 sanguínea para o tecido, além de avaliar a presença, direção e a intensidade da vascularização
86 [9,10]. Ao longo do ciclo estral ocorre variação no padrão de vascularização do CL, com
87 aumento do fluxo sanguíneo durante o início da formação desse tecido e diminuição durante
88 sua regressão [9, 11].

89 A avaliação Doppler espectral fornece valores exatos dos índices relacionados com a
90 vascularização, os quais permitem comparações do fluxo durante a sístole e diástole, bem
91 como nas avaliações da presença de estenoses ou trombozes. Durante o ciclo estral ocorrem
92 mudanças no traçado espectral do fluxo das artérias intraovarianas, com aumento do índice de
93 resistência (IR) durante a luteólise [12]. Maiores valores desse índice estão relacionados com

94 menores velocidades do fluxo sanguíneo e estruturas que apresentam menor metabolismo, e
95 os menores valores estão relacionados com maiores velocidades e estruturas com maior
96 metabolismo [13].

97 A importância em se estudar a vascularização do CL se fundamenta no fato em ser
98 constituído o tecido mais bem vascularizado do corpo na fêmea bovina; de 65% até 95% do
99 sangue que chega ao ovário pode ser destinado à sua irrigação, tendo o mesmo maiores taxas
100 de fluxo sanguíneo por unidade de tecido corporal [14]. A funcionalidade lútea estabelece a
101 duração e a regularidade dos ciclos estrais, a qual é determinada pela produção de
102 progesterona (P4). Em uma compilação de dados, trabalhos relatam correlação entre o
103 tamanho do CL e a produção de P4, porém em outros esse efeito não é observado [15, 16, 17].
104 Para alguns autores a funcionalidade do CL pode ser determinada pela ecotextura [18] e pelo
105 fluxo sanguíneo durante o ciclo estral [16].

106 Diante do exposto, os objetivos do presente trabalho foram: 1) estudar a dinâmica de
107 desenvolvimento do CL formado no primeiro ciclo estral após a indução da ovulação em
108 novilhas Nelore pré-púberes; 2) determinar diferenças entre estruturas lúteas em plena
109 funcionalidade daquelas que regridem prematuramente; 3) estipular características
110 ultrassonográficas para o diagnóstico precoce da RP e; 4) verificar a correlação da
111 concentração de P4 com a área e o percentual (%) de vascularização do CL e, as relações
112 entre as variáveis que mais contribuem no estudo. A hipótese dessa pesquisa foi que as
113 avaliações dos parâmetros ultrassonográficos permitem determinar diferenças entre estruturas
114 lúteas em plena funcionalidade daquelas que regridem prematuramente em bovinos.

115

116

117

118 2. Material e Métodos

119 2.1 Localização e caracterização da área

120 O trabalho foi realizado no Instituto de Zootecnia (Centro Avançado de Pesquisa
121 Tecnológica do Agronegócio de Bovinos de Corte; 21°10' latitude norte e 48°5' longitude
122 oeste), localizado no município de Sertãozinho, São Paulo, durante o período de março a maio
123 de 2016, sendo aprovado pelo comitê de ética da Universidade Estadual Paulista “Júlio de
124 Mesquita Filho” – UNESP Jaboticabal sob o protocolo número 12146/15.

125 Novilhas da raça Nelore permaneceram em sistema de piquetes rotacionados com
126 pastagem composta por capins do gênero *Brachiaria*, com sal mineral e água *ad libitum*.
127 Suplementação energética (silagem de milho *ad libitum*) e proteica (farelo de soja - 0,5
128 quilograma(kg)/cabeça/dia) foi realizada durante o período das avaliações.

129 2.2 Animais e tratamentos

130 Sessenta e duas (62) novilhas da raça Nelore, com peso médio de 289,61±32,28 kg,
131 escore de condição corporal (ECC) de 5,66±0,65 (escala de 1 a 9) [19] e 17,47±0,81 meses de
132 idade foram avaliadas quanto à ciclicidade reprodutiva. Cinquenta e sete (57) foram
133 determinadas como pré-púberes, pela ausência de CL observada nos ovários em duas
134 avaliações ultrassonográficas (Mindray Z5[®], Shenzhen, China) realizadas com intervalo de
135 sete dias.

136 Em vinte e nove (n=29) novilhas foi instituído, em dia aleatório do desenvolvimento
137 folicular, o protocolo de indução da ovulação com dispositivo intravaginal de P4 e indutor da
138 ovulação (GP4+GnRH) conforme Figura 1-A. No D-12 foi inserido dispositivo intravaginal
139 de P4 de 3° uso (CIDR[®], Zoetis, São Paulo, Brasil), permanecendo por 10 dias no animal. No
140 D-2 esse dispositivo foi retirado e, no D0 (48 horas após a remoção do dispositivo de P4)
141 aplicado, pela via intra-muscular, 0,02 miligrama (mg) de Acetado de Buserelina

142 (Sincroforte[®], Ouro Fino, São Paulo, Brasil), hormônio sintético análogo ao hormônio
143 liberador de gonadotrofinas (GnRH).

144 Em outras vinte e oito (n=28) foi utilizado o protocolo de indução da ovulação
145 somente com o indutor da ovulação (GGnRH), conforme Figura 1-B. Para esse grupo foram
146 realizadas três avaliações iniciais ao tratamento para verificar a ciclicidade das fêmeas. O
147 indutor da ovulação utilizado foi o mesmo do tratamento anterior, sendo este administrado na
148 mesma concentração e via de administração.

149 No momento da indução da ovulação foi mensurado o diâmetro do maior folículo, a
150 fim de determinar a resposta ovulatória frente aos dois tratamentos.

151 Os modelos experimentais delineados objetivaram a formação de CLs apresentando
152 duração normal e RP em ambos os tratamentos para posterior análise e comparação dos
153 mesmos com base nas características ultrassonográficas.

154 *2.3 Avaliações do CL após indução da ovulação*

155 As avaliações ultrassonográficas iniciaram quarenta e oito horas após aplicação do
156 indutor da ovulação em ambos os grupos, para confirmação da ovulação das novilhas
157 (ausência do folículo dominante) frente aos tratamentos, e início das avaliações do CL para
158 aquelas novilhas em que foi possível observar o mesmo. Os animais que não responderam ao
159 tratamento, com ausência de CL até noventa e seis horas após aplicação do indutor da
160 ovulação, não prosseguiram nas avaliações.

161 As avaliações dos CLs formados prosseguiram até o momento em que o mesmo
162 apresentasse diminuição do sinal vascular (acompanhado pela ultrassonografia Doppler
163 colorido). As avaliações Doppler colorido foram utilizadas para estipular o final das
164 avaliações, pois o objetivo principal era verificar a funcionalidade dos CLs. Após essa
165 identificação foram realizadas mais duas avaliações, todas com intervalo de dois dias entre

166 elas (Figura 1). As avaliações ultrassonográficas foram realizadas em Modo-B, Doppler
167 colorido e espectral, com transdutor transretal linear multifrequencial (7,5 MHz).

168 Os CLs eram detectados primeiramente pela ultrassonografia convencional e após,
169 realizados vídeos modo-B e Doppler colorido para posterior análise. O Doppler espectral da
170 artéria ovariana foi realizado em seguida e, por último, as colheitas de sangue para dosagem
171 das concentrações séricas de P4, a fim de confirmar a funcionalidade das estruturas lúteas.

172 A duração da fase lútea de cada animal, com base na funcionalidade, foi determinada
173 como sendo a partir de 24 horas após a administração do GnRH (variação entre 26-30 horas)
174 até o dia anterior em que as concentrações de P4 estiveram abaixo de 1 ng/mL. A partir disso,
175 os CLs que apresentaram duração da fase lútea superior ou igual a 16 dias foram classificados
176 como apresentando duração normal e aqueles com duração da fase lútea inferior a 16 dias
177 como RP [3]. Para os CLs classificados no presente estudo como afuncionais foi considerado
178 zero dias para sua duração, devido ao critério metodológico empregado (concentrações de
179 P4).

180 *2.4 Análise das imagens formadas*

181 Em cada vídeo modo-B foi obtida uma imagem do maior tamanho de cada CL, sendo
182 mensurada no próprio aparelho ultrassonográfico a média do seu diâmetro (média entre duas
183 distâncias, em mm) e sua área (mm²). Para os CLs que apresentaram cavidade em seu interior,
184 foi realizada sua medição, para posterior subtração e obtenção do resultado da área de tecido
185 luteínico.

186 Uma imagem de cada CL em modo-B foi utilizada para realizar a quantificação de
187 pixels, para avaliação e comparação da sua ecogenicidade e ecotextura. Essa análise foi
188 realizada em quatro regiões de cada estrutura lútea por meio do “software” Image Pro Plus[®]
189 (Media Cybernetics Inc., San Diego, Califórnia, EUA). Foi determinada uma área mínima

190 representativa para realizar essa análise conforme estipulado por Viana e colaboradores [20].
191 Por essa análise foram determinadas as médias dos valores numéricos de pixels (VPN) e sua
192 heterogeneidade (desvio padrão dos VPN). CLs de menor tamanho que a área mínima
193 representativa não foram mensurados.

194 Nos vídeos modo Doppler colorido foram avaliadas as áreas vasculares das estruturas
195 lúteas, selecionando imagens da maior vascularização do CL. Pelo “software” Image J[®]
196 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA) foi calculada a área vascular e
197 então determinada, para cada dia de avaliação, % do CL vascularizado (área do Doppler
198 colorido/área total do CL x 100).

199 Os índices do fluxo sanguíneo da artéria ovariana (medidos em um ponto próximo ao
200 ovário que apresentava o CL) foram mensurados pela ultrassonografia Doppler espectral,
201 quando foram determinadas a velocidade do pico sistólico (VPS), velocidade diastólica final
202 (VDF) e os índices de resistência vascular ($IR = [VPS-VDF]/VPS$) e pulsatilidade ($IP =$
203 $[VPS-VDF]/\text{velocidade média}$).

204 *2.5 Colheita de sangue e determinação da concentração sérica de progesterona*

205 As colheitas de sangue foram realizadas pela punção da veia coccígea a partir de
206 quatro dias após a aplicação do indutor da ovulação. O material colhido foi armazenado em
207 tubos a vácuo sem aditivos, identificados com o número do animal e data da colheita. Após a
208 colheita, os tubos foram centrifugados a velocidade de 2.500 x g durante 15 minutos. O soro
209 obtido foi transferido para microtubos de polipropileno em duas alíquotas, de mesmo volume,
210 devidamente identificados e mantidos a -20°C. As amostras foram quantificadas quanto às
211 concentrações de P4 pela técnica de radioimunoensaio de fase sólida (RIA) utilizando o kit
212 específico (Progesterone Ref: IM1188 – Immunoteck, A Beckmann Coulter Co. Pesadena,
213 CA, USA) no laboratório de Endocrinologia Animal da FMVA – UNESP Araçatuba. Foram

214 realizados três ensaios, apresentando coeficiente de variação inter e intra-ensaio de 4,9% e
215 7,3%, respectivamente, com sensibilidade média de 0,318 ng/mL.

216 *2.6 Análise estatística*

217 As variáveis diâmetro do folículo no momento da aplicação do GnRH, número de CL
218 formado, duração da fase lútea e, conseqüentemente, a função do CL (normal, regredido
219 prematuramente ou afuncional) foram analisadas pelo procedimento GENMOD do programa
220 estatístico SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC). Nessa análise foram comparadas as médias
221 estimadas entre os tratamentos e entre as funções dos CLs obtidas em cada tratamento para
222 cada variável, bem como sua interação. Para as variáveis número de CL formado, duração da
223 fase lútea e função do CL considerou-se a distribuição de frequência de Poisson e para a
224 variável diâmetro do folículo no momento da aplicação do GnRH foi considerada no modelo
225 de distribuição de frequência normal.

226 As análises das variáveis diâmetro e área do CL, média e heterogeneidade dos valores
227 numéricos de pixels, % de vascularização do CL, índices vasculares (VPS, VDF, IR e IP) da
228 artéria ovariana e concentração de P4 foram realizadas pelo procedimento MIXED do mesmo
229 programa estatístico, considerando-se as medidas repetidas no tempo (avaliações). Nessa
230 análise foram comparadas as médias estimadas entre os tratamentos, as funções dos CLs, ao
231 longo dos dias das avaliações, nas interações tratamento *vs.* avaliações, tratamentos *vs.*
232 funções dos CLs e tratamentos *vs.* funções *vs.* avaliações.

233 As variáveis VPS, VDF, IP e P4 foram transformadas na base logarítmica 10, e a área
234 e % de vascularização do CL em raiz quadrática. Os valores da P4 foram correlacionados com
235 a área e o % de vascularização do CL pelo teste de correlação de Pearson. Pelo procedimento
236 GLM, análises de relação entre as variáveis foram realizadas, para determinar quais delas
237 apresentam maior contribuição no estudo.

238 Diferença significativa foi considerada se $p \leq 0,05$.

239

240 **3. Resultados**

241 Com base nos resultados encontrados para a característica duração da fase lútea, três
242 categorias de CLs foram determinadas no presente estudo com base em sua funcionalidade;
243 (1): duração normal – duração da fase lútea superior ou igual a 16 dias; (2) regredidos
244 prematuramente – duração da fase lútea inferior a 16 dias e; (3) afuncionais – determinados
245 zero dias para sua duração, pois em todos os dias das avaliações as concentrações de P4 foram
246 abaixo de 1 ng/mL, mesmo morfológicamente presentes. No GP4+GnRH foram observados
247 80,77% (21/26) de CL com duração normal e 19,23% (5/26) regredidos prematuramente; e no
248 GGnRH, 4,00% (1/25) dos CLs apresentaram duração normal, 44,00% (11/25) RP e 52,00%
249 (13/25) afuncionais.

250 A média do diâmetro folicular no momento da aplicação do GnRH apresentou
251 diferença entre os tratamentos ($p=0,03$), sendo $12,42 \pm 0,40$ mm para GP4+GnRH e
252 $10,88 \pm 0,57$ mm para GGnRH, porém não houve diferença ($p=0,22$) quando comparado com
253 as funções dos CLs dentro dos tratamentos (Tabela 1).

254 Quarenta e oito horas após a aplicação do indutor da ovulação foi observado a
255 presença de alguns CLs ($39/55 = 70,91\%$), sendo a presença de todos aqueles que
256 responderam ao tratamento confirmados noventa e seis horas após a aplicação do GnRH, em
257 ambos os tratamentos. Ao total, seis animais ($6/57 = 10,53\%$), sendo três de cada grupo, não
258 responderam ao tratamento hormonal empregado, pois não foi observada a presença de CL
259 em até noventa e seis horas após a administração do GnRH, o que determinou taxa de
260 ovulação de 89,66% (26/29) para as novilhas do GP4+GnRH e 89,29% (25/28) para as do
261 GGnRH.

262 O número de CLs formados não diferiu entre os tratamentos ($p=0,86$) e entre as
263 funções dos CLs em cada tratamento ($p=0,87$). Em apenas um animal do tratamento
264 GP4+GnRH foi observada a formação de dois CLs ($1/26 = 3,85\%$), enquanto no tratamento
265 GGnRH, dois animais formaram dois CLs ($2/25 = 8,00\%$) e um animal formou três CLs ($1/25$
266 $= 4,00\%$). Cada CL foi utilizado como unidade amostral. Os dois CLs observados na novilha
267 do GP4+GnRH apresentaram duração normal, e os CLs das novilhas do GGnRH RP .

268 Para a característica duração da fase lútea, com base na funcionalidade dessa estrutura,
269 houve diferença entre os tratamentos ($p<0,0001$) e entre as funções dos CLs nos tratamentos
270 ($p<0,0001$) (Tabela 1). Mesmo não sendo possível determinar a duração para os CLs
271 classificados como afuncionais, morfologicamente persistiram, a grande maioria, por até doze
272 dias após a aplicação do indutor da ovulação, como pode ser observado na Figura 2.

273 O diâmetro do CL foi influenciado pela interação entre os três efeitos estudados:
274 tratamentos, funções dos CLs e dias de avaliações ($p=0,04$) (Figura 2-A). No início das
275 avaliações foi possível observar diferença somente entre os CLs de duração normal do
276 GP4+GnRH e os CLs afuncionais do GGnRH, sempre os primeiros apresentando maior
277 diâmetro quando comparado com os segundos. Ao final das avaliações semelhanças foram
278 observadas entre os CLs de mesma função, independente do tratamento.

279 Para a área do CL não foi identificada interação entre os três efeitos ($p=0,07$), somente
280 entre os tratamentos e as funções dos CLs ($p<0,0001$) (Tabela 1), e ao longo dos dias das
281 avaliações ($p<0,0001$) (Tabela 2). Os CLs de duração normal do GP4+GnRH apresentaram
282 área semelhante com os de mesma função do GGnRH, assim como os que regrediram
283 prematuramente, os primeiros apresentando maior área em comparação com os segundos. A
284 área dos CLs afuncionais foi menor em comparação com as outras duas categorias de CLs
285 estabelecidas. Ao longo das avaliações foi observado aumento da área no início da fase lútea,

286 a qual após atingir seu pico (dia 6 pós-indução da ovulação), diminuiu gradativamente a cada
287 dia, apresentando ao final valores semelhantes aos iniciais.

288 A média dos VPN e a heterogeneidade não apresentaram diferença na interação
289 tratamentos, funções dos CLs e dias de avaliações ($p=0,58$ e $p=0,38$ respectivamente). Porém,
290 diferença entre os valores foi observada na interação tratamentos e funções ($p=0,003$ e
291 $p=0,006$) para ambas as características, respectivamente (Tabela 1). Os CLs de duração
292 normal do GGnRH e os de duração normal e regredidos prematuramente do GP4+GnRH
293 apresentaram os maiores valores de pixels, enquanto os CLs regredidos prematuramente e
294 afuncionais do GGnRH apresentaram os menores valores. Para a característica
295 heterogeneidade, diferença foi observada também ao longo das avaliações ($p=0,03$) (Tabela
296 2). Maiores valores foram observados no início e final da fase lútea.

297 A vascularização do CL não foi influenciada pela interação tratamentos, funções dos
298 CLs e dias de avaliações ($p=0,44$). Diferenças foram observadas na interação tratamentos e
299 funções ($p=0,05$) (Tabela 1) e ao longo das avaliações ($p=0,02$) (Tabela 2). Maior % de
300 vascularização foi observado nos CLs de duração normal do GP4+GnRH, e semelhança entre
301 as demais categorias. Ao longo dos dias das avaliações maiores percentuais foram observados
302 no início das mesmas, com valores acima de 20% até o dia 14 pós-indução da ovulação, e os
303 menores percentuais observados ao final, com queda acentuada entre os dias 20 e 22.

304 Os valores dos índices do fluxo sanguíneo da artéria ovariana foram determinados até
305 o dia 22 pós-indução da ovulação, pois após a identificação da diminuição do sinal vascular
306 do CL pelo Doppler colorido essa estrutura apresentava-se pouco vascularizada, tornando
307 difícil a mensuração. A VPS, VDF e IR, não foram influenciados pela interação tratamentos,
308 funções dos CLs e dias de avaliações ($p=0,77$, $p=0,28$ e $p=0,18$, respectivamente), nem pela
309 interação tratamentos e funções ($p=0,56$, $p=0,78$ e $p=0,13$, respectivamente). A VPS e VDF

310 foram diferentes ao longo dos dias de avaliações ($p=0,02$ e $p=0,03$, respectivamente) (Tabela
311 2). A VPS aumentou gradativamente até o meio da fase lútea, mantendo então valores
312 constantes até o final da fase.

313 A VDF também apresentou diferença para a interação tratamentos e dias de
314 avaliações, assim como o IR ($p=0,04$, para ambas as características) (Tabela 3). Para a VDF,
315 diferença foi observada entre os tratamentos somente nas duas últimas avaliações, com
316 maiores valores para o GGnRH. O IR apresentou diferença em apenas uma avaliação entre os
317 tratamentos (dia 6 pós-indução da ovulação). Maior diferença pôde ser observada ao final da
318 fase lútea para o GGnRH, em que apresentou valores numericamente inferiores para essa
319 característica comparado com o GP4+GnRH.

320 O IP da artéria ovariana foi influenciado pela interação entre os efeitos estudados,
321 tratamentos, funções dos CLs e dias de avaliações ($p=0,008$) (Figura 2-B), assim como a
322 concentração sérica de P4 ($p=0,03$) (Figura 2-C). Em duas avaliações iniciais (dia 4 e 6 pós-
323 indução da ovulação), o IP apresentou valores superiores para os CLs regredidos
324 prematuramente, tanto do GP4+GnRH como do GGnRH. Ao final da fase lútea, em uma
325 avaliação (dia 14 pós-indução da ovulação), o valor do IP foi superior para o CL de duração
326 normal do GGnRH. Para o restante das avaliações não houve diferença entre os tratamentos e
327 funções dos CLs estabelecidas.

328 A concentração sérica de P4 apresentou diferença significativa entre as categorias de
329 CLs estabelecidas ao longo dos dias das avaliações, com maiores valores para os CLs de
330 duração normal de ambos os tratamentos, valores intermediários para os regredidos
331 prematuramente e valores sempre inferiores a 1 ng/mL para os afuncionais. A concentração
332 de P4 apresentou correlação positiva com a área ($r=0,62$; $p<0,001$) e com o % de
333 vascularização do CL ($r=0,38$; $p<0,001$). Baixa relação entre as variáveis diâmetro do folículo

334 e funcionalidade do CL ($R^2=0,15$), funcionalidade do CL e concentração de P4 ($R^2=0,19$),
335 funcionalidade do CL e % de vascularização ($R^2=0,10$) e área e % de vascularização do CL
336 foi observada ($R^2=0,13$). A variável área do CL foi a que apresentou maior relação com a
337 concentração de P4 ($R^2=0,53$), resultando na seguinte equação de regressão: $\text{ÁREA DO CL} =$
338 $91,75 + 37,68P4 - 2,86P4^2$.

339

340 **4. Discussão**

341 Taxa de ovulação esperada em novilhas utilizando dose de 0,01mg de acetato de
342 Buserelina como indutor da ovulação encontra-se entre 50 e 60% [21]. O alto valor da taxa de
343 ovulação encontrado no presente estudo, em ambos os tratamentos, provavelmente foi devido
344 a alta dose do indutor da ovulação empregada. Maiores taxas eram esperadas no grupo
345 utilizando a fonte exógena de P4, devido a persistência do folículo durante a permanência do
346 dispositivo de P4 no animal, o qual apresentaria maior diâmetro no dia da aplicação do
347 indutor da ovulação. A alta dose e a aplicação em dia aleatório do ciclo estral no grupo
348 utilizando somente o indutor pode ter induzido a ovulação de folículos ainda muito jovens, o
349 que resultou na alta incidência tanto da RP quanto da afuncionalidade dos CLs. Os modelos
350 experimentais realizados demonstraram-se eficientes na indução de CLs classificados como
351 duração normal e RP em ambos os tratamentos, e a exposição à P4 reduziu a ocorrência da
352 RP.

353 A prévia exposição à P4 antes do primeiro ciclo estral em novilhas resulta em efeito
354 benéfico para o folículo pré-ovulatório [22,23] e para a funcionalidade do CL [24,25]. A P4
355 diminui o *feedback* negativo causado pelo excesso de receptores de estradiol no hipotálamo
356 [26], o que resulta em aumento na liberação das gonadotrofinas FSH e LH pela hipófise e,
357 consequentemente aumento na taxa de crescimento do diâmetro do folículo dominante [22,

27]. Essa afirmação pôde ser confirmada no presente estudo pelo maior diâmetro do folículo pré-ovulatório observado no GP4+GnRH. O efeito benéfico para a funcionalidade do CL está em que a P4 inibe dos receptores de ocitocina no endométrio após a ovulação, não permitindo a liberação da prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) prematuramente pelo endométrio do útero e, conseqüentemente, não ocorrendo o estímulo para a regressão do CL antes do momento fisiológico [25]. Segundo Sá Filho et al., [28], Pfeifer et al., [22] e Sá Filho et al., [29], a exposição prévia à P4 determina maior persistência do CL e melhores resultados na taxa de prenhez/inseminação artificial.

Os CLs regredidos prematuramente no presente estudo apresentaram duração de 9 a 12 dias, similarmente ao encontrado por Sharma et al. [30], que observaram, pela ultrassonografia, variação de 8 a 12 dias para a duração do CL. Valores inferiores foram observados por Evans et al. [27] e Sá Filho et al. [28], onde os primeiros apresentaram média de 7 dias na persistência do CL, acompanhado pela onda de desenvolvimento folicular, e os segundos observaram quedas nas concentrações de P4 a partir do 5º dia após indução da ovulação.

Uma categoria de CL estabelecida no presente estudo foi o afuncional. Esses CLs apresentaram % de vascularização semelhante aos de RP do mesmo grupo, assim como diâmetro do folículo no dia da aplicação do indutor da ovulação, porém resultaram em CLs com menor área. Esta característica representa menor quantidade de células luteínicas, a qual foi possivelmente a responsável pela menor concentração de P4 produzida por esses CLs no presente estudo. Esses CLs podem ter sido resultado também da inadequada exposição dos folículos às gonadotrofinas anteriormente a ovulação [31], ovulação desses folículos ainda jovens [4] e/ou falha no desenvolvimento vascular tanto do folículo pré-ovulatório quanto durante o início da formação do CL [32]. Uma alteração encontrada na literatura que pode

382 explicar esse resultado é a alteração conhecida como disfunção lútea, a qual é caracterizada
383 pelo funcionamento inadequado do CL, com deficiências na secreção da P4 [33]. Essas
384 informações mostram que o primeiro CL formado em novilhas pré-púberes sem a prévia
385 exposição à P4, além de apresentarem grande probabilidade de regredirem prematuramente,
386 podem ser afuncionais. Vale destacar que estes últimos foram identificados no presente estudo
387 na avaliação ovariana pela ultrassonografia, e permaneceram no ovário por período tempo
388 semelhante aos regredidos prematuramente.

389 Diâmetro e área dos CLs apresentaram diferenças conforme as funções estabelecidas
390 no presente estudo. CLs de duração normal apresentaram maiores diâmetro e área, CLs que
391 regrediram prematuramente valores intermediários, e CLs afuncionais os menores diâmetro e
392 área. Esse resultado pode ser explicado em decorrência do diâmetro do maior folículo
393 dominante encontrado no momento da aplicação do GnRH para os grupos, o que é
394 confirmado pelos trabalhos de Borges et al. [34], Pugliesi et al. [35] e Vasconcelos et al [36].
395 Para o diagnóstico da afuncionalidade do CL, a avaliação do seu diâmetro pode ser uma
396 ferramenta viável utilizada à campo, pois essa categoria apresentou os menores valores para
397 essa característica após 8 dias da indução da ovulação, com valores inferiores a 10mm para a
398 grande maioria das avaliações.

399 Pixels representam a ecogenicidade de um tecido, que corresponde à intensidade do
400 reflexo da onda sonora em um ponto específico do mesmo, sendo apresentados na imagem
401 dentro de uma escala de cinza que varia de zero (preto – imagem anecoica) a 255 (branco –
402 imagem hiperecoica) [37]. Segundo Davies e colaboradores [38], maiores valores de pixels
403 representam maior organização e densidade das células luteínicas. Os resultados encontrados
404 no presente estudo mostram que os CLs afuncionais apresentaram os menores valores para

405 essa característica, provavelmente por possuírem menor organização tecidual em comparação
406 com as outras categorias.

407 Valores da heterogeneidade de pixels, os quais representam a ecotextura de um tecido,
408 estão de acordo com os encontrados nos trabalhos de Siqueira et al. [18] e Simões et al. [39],
409 com maiores valores observados no início e final da fase lútea. Provavelmente isso decorre do
410 processo de diferenciação celular que está ocorrendo no CL nessas fases. No início, o volume
411 e o número de células luteínicas são pequenos e, como o CL está em formação a imagem
412 ultrassonográfica é heterogênea. Ao final, devido a morte celular e degradação tecidual que
413 ocorre no CL devido ao processo da luteólise, o mesmo ocorre [40, 18].

414 A avaliação Doppler colorido permite avaliação em tempo real da vascularização do
415 CL, sendo uma vantagem nos trabalhos a campo no diagnóstico da sua funcionalidade, por ser
416 uma ferramenta não invasiva e de rápido diagnóstico [9]. Ao longo do ciclo estral ocorre
417 variação no padrão de vascularização dessa estrutura, com aumento do fluxo sanguíneo
418 durante a luteogênese e diminuição durante a luteólise [9, 11], o que foi observado no
419 presente estudo. O aumento do fluxo sanguíneo durante a luteogênese ocorre devido ao
420 intenso processo de angiogênese e vasodilatação que ocorre no local [41], e a diminuição na
421 luteólise devido a liberação pulsátil de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio. A $\text{PGF}_{2\alpha}$ induz a liberação de
422 peptídeos vasoativos, que provocam vasoconstrição dos vasos sanguíneos e,
423 consequentemente resultam na redução do fluxo sanguíneo para o CL [42].

424 A vascularização do CL está diretamente relacionada com a funcionalidade do tecido
425 [43]. Em decorrência disso, maior % de vascularização foi observado no presente estudo para
426 CLs de duração normal do tratamento com prévia exposição à P4 em comparação com os
427 regredidos prematuramente e afuncionais. Isso mostra a importância do adequado suprimento
428 sanguíneo durante a formação e desenvolvimento do CL [9, 11]. Os menores valores

429 numéricos encontrados para o % de vascularização dos CLs afuncionais podem ter
430 contribuído para as baixas concentrações de P4 produzidas pelos mesmos. A diminuição do
431 sinal vascular como critério de exclusão dos animais das avaliações foi eficiente para
432 estabelecer a funcionalidade dos CLs, pois a partir desse dia os valores observados das
433 concentrações de P4 ficaram abaixo de 1ng/mL.

434 Estudos mostram resultados promissores no uso da ultrassonografia Doppler colorido
435 para o diagnóstico precoce de gestação, por meio da avaliação visual da vascularização do CL
436 [44,45]. Essa ferramenta também vem sendo utilizada em programas de transferência de
437 embriões, na avaliação da vascularização do CL antes do procedimento de inovulação [46,47].
438 Guimarães e colaboradores [46] observaram que a avaliação visual do fluxo sanguíneo do CL
439 quatorze dias após a transferência de embriões é efetiva para a detecção de fêmeas receptoras
440 não prenhas submetidas ao protocolo de transferência de embriões. Utilizando dessa
441 avaliação, a tomada de decisões em uma propriedade se torna facilitada, como a seleção de
442 animais a serem mantidos no rebanho, aumento na probabilidade do sucesso reprodutivo e no
443 diagnóstico de gestação [47]. Outra aplicação no uso dessa ferramenta está no diagnóstico da
444 funcionalidade das estruturas lúteas, como observado no presente estudo.

445 A produção de P4 pelo CL apresenta variações ao longo da sua permanência no ovário
446 [11], a qual esta relacionada com a vascularização dessa estrutura [40, 41, 48]. Durante a
447 luteogênese ocorre aumento na secreção desse hormônio [15,18], e o contrário durante a
448 luteólise [49]. A concentração sérica de P4, no presente estudo, foi eficiente no diagnóstico da
449 funcionalidade do CL, pois os valores dos afuncionais diferiram significativamente das
450 demais categorias após seis dias da indução da ovulação e os regredidos prematuramente após
451 8 dias, permanecendo essa diferença na grande maioria das demais avaliações. Porém, por ser
452 uma análise em que o resultado não é imediato, torna-se de difícil realização à campo.

453 No presente estudo foi encontrada correlação positiva mais forte da concentração
454 sérica de P4 com a área do CL do que com o % de vascularização, ao contrário de Herzog et.
455 al. [16]. Nos trabalhos de Mann [15], Siqueira et al. [18] e Vasconcelos et al. [36], CLs de
456 maior área estavam associados com maiores concentrações circulantes de P4.

457 Os índices vasculares mensurados pelo Doppler espectral, principalmente o IR e IP,
458 são utilizados na avaliação de estenoses, trombozes, e na avaliação dos vasos periféricos com
459 fluxo de maior resistência [13]. Esta avaliação permite o estudo do perfil do traçado dos
460 vasos, quando mudanças podem indicar alterações fisiológicas, sistêmicas ou locais. Durante
461 o final do ciclo estral é observado mudança no traçado do fluxo das artérias intraovarianas,
462 com aumento da resistividade [12], diferentemente do que ocorreu no presente estudo para os
463 CLs do tratamento GGnRH. A queda numérica nos valores do IR ao final das avaliações para
464 os CLs do GGnRH sugerem que esses CLs apresentam maior metabolismo durante a
465 luteólise, confirmada pela maior VDF ao final das avaliações nesse tratamento. Para os
466 resultados do IP observados no presente estudo, pode-se dizer que a avaliação desse índice foi
467 o mais precoce para o diagnóstico da RP, pois maiores valores para essa variável foram
468 apresentados pelos CLs dessa categoria 4 a 6 dias após a indução da ovulação.

469 Os resultados encontrados no presente estudo mostram que novas pesquisas poderão
470 ser realizadas no âmbito de descobrir as causas para a afuncionalidade dos CLs no primeiro
471 ciclo estral de novilhas pré-púberes, além de comparar as características morfológicas e
472 funcionais com as estruturas lúteas do segundo ciclo estral.

473

474

475

476

477 **5. Conclusão**

478 O presente estudo demonstrou a importância da prévia exposição à progesterona em
479 novilhas pré-púberes, pelo maior percentual observado de corpos lúteos com funcionalidade
480 normal no primeiro ciclo estral.

481 Diferenças morfológicas e funcionais foram observadas entre as categorias de CLs
482 estabelecidas. CLs de duração normal apresentaram maior área em comparação aos
483 regredidos prematuramente e afuncionais, e estes últimos, devido aos menores valores de
484 pixels, células lúteas menos organizadas e com menor densidade. CLs de duração normal
485 possuíram maiores percentuais de vascularização, e os regredidos prematuramente não
486 diferiram dos afuncionais para essa característica. A baixa produção de progesterona pelos
487 CLs afuncionais não foi relacionada com a vascularização dessa estrutura, mas sim com
488 menor área.

489 Os resultados desse estudo indicaram que a concentração sérica de progesterona foi
490 eficiente no diagnóstico da funcionalidade do CL. Além dessa característica, o índice de
491 pulsatilidade da artéria ovariana pôde ser utilizado no diagnóstico precoce da regressão
492 prematura do CL, e a avaliação ultrassonográfica do diâmetro no diagnóstico dos afuncionais.

493 A concentração sérica de progesterona apresentou maior correlação com a área do CL
494 quando comparado com o percentual de vascularização. A relação que melhor contribuiu no
495 estudo foi entre a área do CL e a concentração de P4.

496

497 Agradecimentos: À FAPESP pelo apoio a pesquisa (processo nº 2015/13079-0), à empresa
498 Ouro Fino pelo fornecimento dos produtos, e ao Centro APTA Bovinos de Corte (Instituto de
499 Zootecnia/Sertãozinho-SP) pela disponibilidade dos animais e estrutura para realização
500 experimental.

501 **REFERÊNCIAS**

- 502 [1] Atkins JA, Pohler KG, Smith MF. Physiology and Endocrinology of Puberty in Heifers.
503 Vet Clin Food Anim 2013; 29: 479-93.
- 504 [2] Nogueira GP. Puberty in South America *Bos indicus* (Zebu) cattle. Anim Reprod Sci
505 2004; 82: 361-72.
- 506 [3] Garverick HA, Zollers WG, Smith MF. Mechanisms associated with corpus luteum
507 lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. Anim Reprod Sci 1992;
508 28: 111-24.
- 509 [4] Taponen J, Hjerppe P, Kopra E, Rodríguez-Martínez H, Katila T, Kindhl H. Premature
510 prostaglandin F_{2α} secretion causes luteal regression in GnRH-induced short estrous cycles
511 in cyclic dairy heifers. Theriogenology 2003; 60: 379-93.
- 512 [5] Perry GA. Factors affecting puberty in replacement beef heifers. Theriogenology 2016;
513 86: 373-8.
- 514 [6] Viana JHM, Ferreira AM, Sá WF, Camargo LSA. Características morfológicas e
515 funcionais do corpo lúteo durante o ciclo estral em vacas da raça Gir. Arq Bras Med Vet
516 Zootec 1999; 51: 251-6.
- 517 [7] Siqueira LGB, Torres CAA, Viana JHM, Souza ED, Amorim LS, Fonseca JF, et al. Uso
518 da análise computacional de imagens de ultra-som na avaliação da ecotextura luteal e sua
519 relação com a concentração de progesterona plasmática durante o ciclo estral de novilhas
520 mestiças (*Bos taurus taurus x Bos taurus indicus*). Acta Sci Vet 2007; 35: 1301.
- 521 [8] Siqueira LGB, Viana JHM, Diniz ES, Camargo LS, Amorim LS, Fonseca JF, et al.
522 Aferição de ecogenicidade luteal com o uso de diferentes transdutores de ultra-som. Acta
523 Sci Vet 2006; 34: 281.

- 524 [9] Lüttgenau J, Bollwein H. Evaluation of bovine luteal blood flow by using color Doppler
525 ultrasonography. *Reprod Biol* 2014; 14: 103-9.
- 526 [10] Sales JNS, Rosse GF, Bottino MP. Ultrassonografia do Sistema Reprodutor Feminino de
527 Bovinos. In: Feliciano MAR, Oliveira MEF, Vicente WRR. Ultrassonografia na
528 Reprodução Animal, São Paulo: MedVet; 2013, p. 105-25.
- 529 [11] Scully S, Evans ACO, Duffy P, Crowe MA. Characterization of follicle and CL
530 development in beef heifers using high resolution three-dimensional ultrasonography.
531 *Theriogenology* 2014; 81: 407-18.
- 532 [12] Köster K, Nautrup CP, Günzel-Apel AR. A Doppler ultrasonographic study of cyclic
533 changes of ovarian perfusion in the Beagle bitch. *Reprod* 2001; 3: 453-61.
- 534 [13] Carvalho CF, Chammas MC, Cerri GG. Princípios físicos do Doppler em ultra-
535 sonografia. *Cienc Rural* 2008; 38: 872-9.
- 536 [14] Ferreira AM. Reprodução da Fêmea Bovina: Fisiologia aplicada e Problemas mais
537 comuns. 1st ed. Juiz de Fora: Editar; 2010.
- 538 [15] Mann GE. Corpus luteum size and plasma progesterone concentration in cows. *Anim*
539 *Reprod Sci* 2009; 115: 296-9.
- 540 [16] Herzog K, Brockhan-Lüdemann M, Kaske M, Beindorff N, Paul V, Niemann H, et al.
541 Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine
542 estrous cycle than luteal size. *Theriogenology* 2010; 73: 691-7.
- 543 [17] Trevisol E, Ferreira JC, Ackermann CL, Destro FC, Filho WCM, Carmagos AS, et al.
544 Luteal changes after treatment with sub-luteolytic doses of prostaglandina (cloprostenol
545 sodium) in cattle. *Anim Reprod Sci* 2015; 153: 8-12.

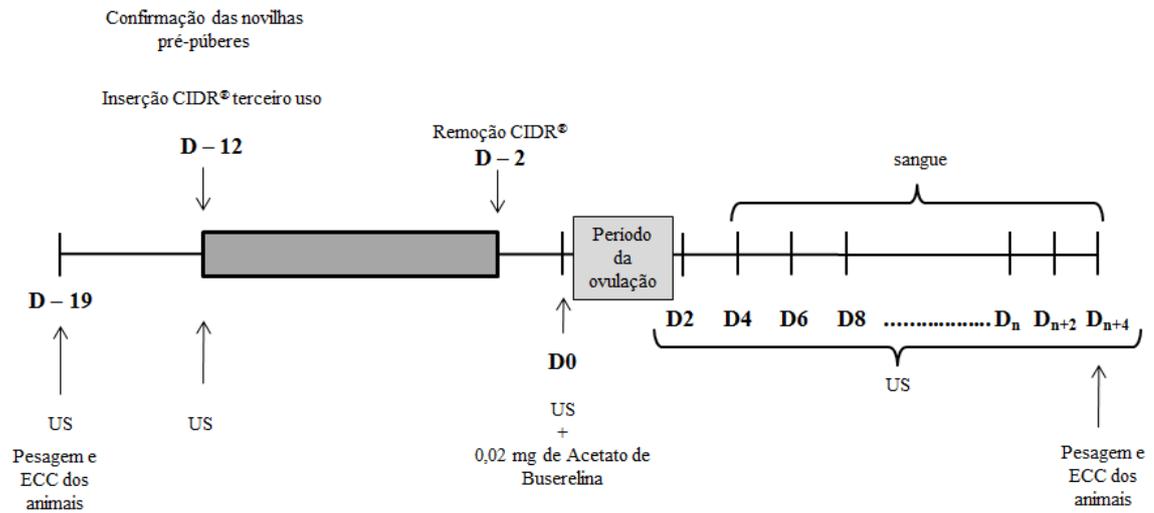
- 546 [18] Siqueira LGB, Torres CAA, Amorim LS, Souza ED, Camargo LSA, Fernandes CAC, et
547 al. Interrelationships among morphology, echotexture, and function of the bovine
548 corpus luteum during the estrous cycle. *Anim Reprod Sci* 2009; 115: 18-28.
- 549 [19] Richards MW, Spitzer JC, Warner MB. Effect of varying levels of postpartum nutrition
550 and body condition at calving on subsequent reproductive performance in beef cattle. *J*
551 *Anim Sci* 1986; 62: 300-306.
- 552 [20] Viana JHM, Siqueira LGB, Diniz ES, Camargo LS, Oliveira ER, Fonseca JF, et al.
553 Definição de área mínima representativa para análise de imagens ultra-sonográficas de
554 corpos lúteos bovinos. *Acta Sci Vet* 2006; 34: 578.
- 555 [21] Bishop BE, Thomas JM, Abel JM, Poock SE, Eilersieck MR, Smith MF, et al. Split-time
556 artificial insemination in beef cattle: II. Comparing pregnancy rates among nonestrous
557 heifers based on administration of GnRH at AI. *Theriogenology* 2017; 87: 229-34.
- 558 [22] Pfeifer LFM, Siqueira LG, Mapletoft RJ, Kastelic JP, Adams GP, Colazo MG, et al.
559 Effects of exogenous progesterone and cloprostenol on ovarian follicular development
560 and first ovulation in prepubertal heifers. *Theriogenology* 2009; 72: 1054-64.
- 561 [23] St Clair EM, Patterson DJ, Schillo KK. Progesterone treatment stimulates follicle growth
562 without affecting LH secretion in prepubertal beef heifers. *J Anim Sci* 1995; 73: 222
563 (Abstract).
- 564 [24] Inskip EK. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of
565 concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *J Anim Sci* 2004; 82:
566 24-39.
- 567 [25] Sá Filho OG, Vasconcelos JLM. Regressão prematura do corpo lúteo em bovinos. *Vet*
568 *Zootec* 2008; 15: 220-33.

- 569 [26] Cardoso D, Nogueira GP. Mecanismos neuroendócrinos envolvidos na puberdade de
570 novilhas. *Arq Cien Vet Zool* 2007; 10: 59-67.
- 571 [27] Evans AC, Adams GP, Rawlings NC. Endocrine and ovarian follicular changes leading
572 up to the first ovulation in prepubertal heifers. *J Reprod Fertil* 1994; 100: 187-94.
- 573 [28] Sá Filho OG, Thatcher WW, Vasconcelos JLM. Effect of progesterone and/or estradiol
574 treatments prior to induction of ovulation on subsequent luteal lifespan in anestrous
575 Nelore cows. *Anim Reprod Sci* 2009; 112: 95-106.
- 576 [29] Sá Filho MF, Nasser LFT, Penteadó L, Prestes R, Marques MO, Freitas BG, et al. Impact
577 of progesterone and estradiol treatment before the onset of the breeding period on
578 reproductive performance of *Bos indicus* beef heifers. *Anim Reprod Sci* 2015; 160: 30-
579 9.
- 580 [30] Sharma RK, Singh JK, Khanna S, Singh I. Ovarian response of prepubertal Murrah
581 heifers to exogenous GnRH. *Anim Reprod Sci* 2012; 133: 153-158.
- 582 [31] Chemineau P, Pellicer-Rubio MT, Lassoued N, Khaldi GE, Monniaux D. Male-induced
583 short oestrous and ovarian cycles and sheep and goats: a working hypothesis. *Reprod*
584 *Nutr Dev* 2006; 46: 417-29.
- 585 [32] Berisha B, Schams D. Ovarian function in ruminants. *Domest Anim Endocrin* 2005; 29:
586 305-17.
- 587 [33] Fonseca JF, Silva Filho JM, Palhares MS, Ruas JRM, Pinto Neto A. Concentração
588 plasmática de progesterona em novilhas receptoras submetidas à administração de rbST,
589 GnRH ou hCG no quinto dia do ciclo estral. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2001; 53: 1-8.
- 590 [34] Borges AM, Torres CAA, Júnior VRR, Ruas JRM, Carvalho GR, Neto AM, et al.
591 Desenvolvimento folicular no pós-parto de vacas da raça Gir tratadas com acetato de

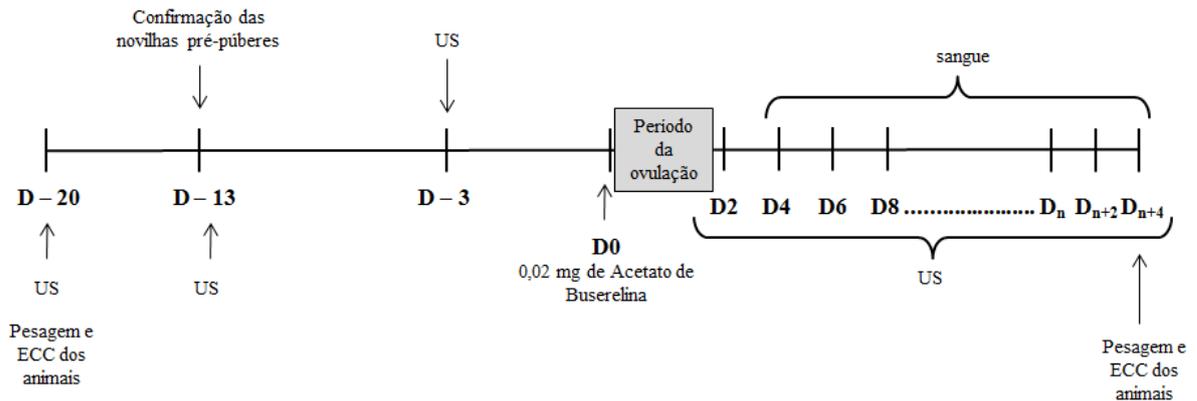
- 592 Buserelina (GnRH) ou Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG). R Bras Zootec 2004;
593 33: 1396-404.
- 594 [35] Pugliesi G, Santos FB, Lopes E, Nogueira E, Maio JRC, Binelli M. Improved fertility in
595 suckled beef cows ovulating large follicles or supplemented with long-acting
596 progesterone after timed-AI. *Theriogenology* 2016; 85: 1239-48.
- 597 [36] Vasconcelos JLM, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank MC. Reduction in size
598 of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate.
599 *Theriogenology* 2001; 56: 307-14.
- 600 [37] Tom JW, Pierson RA, Adams GP. Quantitative echotexture analysis of bovine corpora
601 lutea. *Theriogenology* 1998; 49: 1345-52.
- 602 [38] Davies KL, Bartlewski PM, Pierson RA, Rawlings NC. Computer assisted image
603 analyses of corpora lutea in relation to peripheral concentrations of progesterone: a
604 comparison between breeds of sheep with different ovulation rate. *Anim Reprod Sci*
605 2006; 96: 165-75.
- 606 [39] Simões J, Almeida JC, Baril G, Azevedo J, Fonte P, Mascarenhas R. Assessment of
607 luteal function by ultrasonographic appearance and measurement of corpora lutea in
608 goats. *Anim Reprod Sci* 2007; 97: 36-46.
- 609 [40] Scully S, Evans ACO, Carter F, Duffy P, Lonergan P, Crowe MA. Ultrasound
610 monitoring of blood flow and echotexture of the corpus luteum and uterus during early
611 pregnancy of beef heifers. *Theriogenology* 2015; 83: 449-58.
- 612 [41] Acosta TJ, Hayashi KG, Ohtani M, Miyamoto A. Local changes in blood flow within the
613 preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reprod* 2003; 125: 759-67.

- 614 [42] Acosta TJ, Yoshizawa N, Ohtani M, Miyamoto A. Local changes in blood flow within
615 the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F₂ α injection in the cow. *Biol*
616 *Reprod* 2002; 66: 651-8.
- 617 [43] Figueira LM, Fonseca JF, Arashiro EKN, Souza-Fabjan JMG, Ribeiro ACS, Oba E, et al.
618 Colour Doppler ultrasonography as a tool to assess luteal function in Santa Inês ewes.
619 *Reprod Dom Anim* 2015; 50: 643-50.
- 620 [44] Siqueira LGB, Areas VS, Ghetti AM, Fonseca JF, Palhao MP, Fernandes CAC, et al.
621 Color Doppler flow imaging for the early detection of nonpregnant cattle at 20 days
622 after timed artificial insemination. *J Dairy Sci* 2013; 96: 6461-72.
- 623 [45] Matsui M, Miyamoto A. Evaluation of ovarian blood flow by colour Doppler ultrasound:
624 Practical use for reproductive management in the cow. *Vet J* 2009; 181: 232-40.
- 625 [46] Guimarães CR, Oliveira ME, Rossi JR, Fernandes CA, Viana JH, Palhao MP. Corpus
626 luteum blood flow evaluation on Day 21 to improve the management of embryo recipient
627 herds. *Theriogenology* 2015; 84: 137-41.
- 628 [47] Perry GA, Cushman RA. Invited Review: Use of ultrasonography to make reproductive
629 management decisions. *Prof Anim Sci* 2016; 32: 154-61.
- 630 [48] Tamanini C, Ambrogi M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod*
631 *Dom Anim* 2004; 39: 206-16.
- 632 [49] Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, Mcintush EW. Mechanisms
633 controlling the functional and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 2000; 80: 1-
634 29.
- 635
- 636
- 637

(A) GP4+ GnRH



(B) GGnRH



638

639 **Figura 1:** Diagrama esquemático dos tratamentos e avaliações experimentais. (A): tratamento

640 utilizando dispositivo de progesterona e indutor da ovulação; (B): tratamento utilizando

641 somente indutor da ovulação.

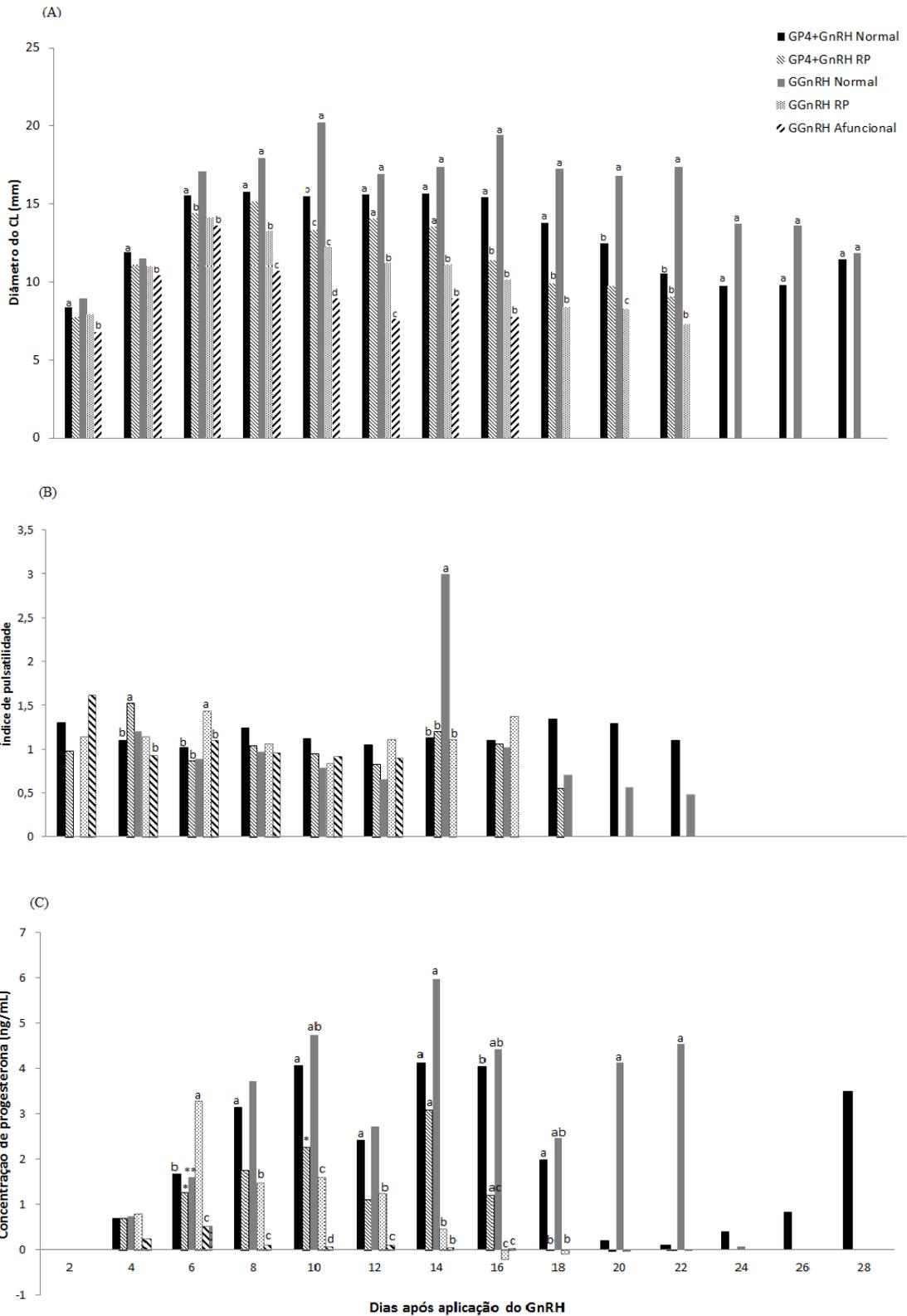
642 US: ultrassonografia do trato reprodutor feminino; ECC: escore de condição corporal;

643 CIDR®: dispositivo intravaginal de progesterona; CL: corpo lúteo; Dn: dia da diminuição do

644 sinal vascular identificado pela ultrassonografia Doppler colorido.

645

646



Frequência (n)

GP4+GnRH	N	13	22	22	22	22	22	22	22	22	21	16	8	3	1
	RP	5	5	5	5	5	5	4	4	4	1	1			
GGnRH	N	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	RP	12	15	15	15	14	14	8	8	6	2	1			
	AF	12	13	13	13	13	12	1	1						

648 **Figura 2.** Média estimada ao longo dos dias das avaliações para as diferentes funções dos
649 CLs estabelecidas em cada tratamento após indução da ovulação de novilhas Nelore pré-
650 púbères para as variáveis (A): diâmetro do CL, (B): índice de pulsatilidade e, (C):
651 concentração sérica de progesterona.
652 GP4+GnRH: tratamento utilizando dispositivo de progesterona e GnRH como indutor da
653 ovulação; GGnRH: tratamento utilizando somente GnRH como indutor da ovulação; N:
654 função do CL normal; RP: CL regredido prematuramente; AF: CL afuncional; n: número de
655 animais por dia da observação em cada grupo.

656 ^{a,b,c,d} Médias com letras minúsculas são diferentes entre si de acordo com o teste de Tukey
657 ($p \leq 0,05$) entre os grupos no mesmo dia de avaliação. * bc ** abc

658

659

660

661

662

663

664

665

666

667

668

669

670

671

672 **Tabela 1.** Média estimada (\pm erro padrão) para o diâmetro do folículo (mm) no dia da aplicação do GnRH, a duração dos CLs (dias), a
 673 incidência dos animais (%), a área (mm²), média e heterogeneidade dos valores numéricos dos pixels e percentual de vascularização para as
 674 diferentes funções de CL estabelecida para cada tratamento (GP4+GnRH e GGnRH) após indução da ovulação de novilhas Nelore pré-
 675 púberes.

	GP4+GnRH		GGnRH			p - value
	N (n=21)	RP (n=5)	N (n=1)	RP (n=11)	AF (n=13)	
Diâmetro fol. (mm)	11,79 \pm 0,37 ^a	13,05 \pm 0,70 ^a	12,13 \pm 1,57 ^{ab}	10,53 \pm 0,47 ^b	9,98 \pm 0,44 ^b	0,22
Duração CL (dias)*	17,81 \pm 0,05 ^a	11,60 \pm 0,13 ^b	22,00 \pm 0,21 ^a	9,27 \pm 0,10 ^b	0,00 \pm 0,01 ^c	<0,0001
Área do CL (mm²)	112,05 \pm 8,24 ^a	78,40 \pm 13,84 ^b	154,38 \pm 22,85 ^a	58,33 \pm 10,72 ^b	31,89 \pm 11,46 ^c	<0,0001
Média VPN	92,66 \pm 2,03 ^b	92,48 \pm 3,22 ^b	105,70 \pm 4,91 ^a	88,93 \pm 2,60 ^{bc}	84,05 \pm 2,90 ^c	0,003
Heterog.	11,90 \pm 0,18 ^b	12,10 \pm 0,32 ^b	13,27 \pm 0,49 ^a	11,03 \pm 0,37 ^c	11,41 \pm 0,42 ^{bc}	0,006
Vasc. (%)	20,85 \pm 1,18 ^a	15,73 \pm 2,14 ^b	18,12 \pm 3,34 ^{ab}	13,64 \pm 2,27 ^b	10,88 \pm 2,59 ^b	0,05

676 GP4+GnRH: tratamento utilizando dispositivo de progesterona e GnRH como indutor da ovulação; GGnRH: tratamento utilizando somente
677 GnRH como indutor da ovulação; N: função do CL normal; RP: CL regredido prematuramente; AF: CL afuncional; fol.: folículo; VPN:
678 valores numéricos de pixels; Heterog.: heterogeneidade dos pixels (desvio padrão); Vasc.: % de vascularização do CL.
679 ^{a,b,c} Médias com letras minúsculas na mesma linha são diferentes entre todas as categorias de CLs estabelecidas nos tratamentos de acordo
680 com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).
681 * a duração da funcionalidade do CL foi determinada como sendo a partir de 24 horas após a administração do GnRH até o dia anterior em
682 que as concentrações de P4 estiveram abaixo de 1 ng/mL.

683 **Tabela 2.** Média estimada (\pm erro padrão) da área do CL, heterogeneidade dos pixels,
 684 percentual da vascularização do CL e velocidade do pico sistólico ao longo dos dias das
 685 avaliações (D2-28) após indução da ovulação de novilhas Nelore pré-púberes.

Dia de Aval.	Área CL (mm²)	Heterog.	Vasc. (%)	VPS (cm/seg)
D2 (n=43)	60,89 \pm 7,04 ^{FH}	13,43 \pm 0,38 ^A	23,67 \pm 1,85 ^{ABE}	15,31 \pm 2,56 ^D
D4 (n=56)	107,95 \pm 6,68 ^E	13,15 \pm 0,25 ^A	23,80 \pm 1,56 ^{AB}	21,77 \pm 1,51 ^C
D6 (n=56)	169,11 \pm 6,72 ^A	12,40 \pm 0,25 ^B	25,98 \pm 1,55 ^A	25,62 \pm 1,51 ^B
D8 (n=56)	153,38 \pm 6,74 ^B	11,91 \pm 0,25 ^{BC}	22,60 \pm 1,56 ^{ABE}	29,69 \pm 1,51 ^A
D10 (n=55)	146,14 \pm 6,76 ^{BC}	11,74 \pm 0,25 ^C	20,48 \pm 1,59 ^{BCE}	27,66 \pm 1,58 ^{AB}
D12 (n=54)	140,22 \pm 6,78 ^{CD}	11,92 \pm 0,26 ^{BC}	22,09 \pm 1,62 ^{ABE}	28,89 \pm 1,67 ^{AB}
D14 (n=36)	141,42 \pm 7,79 ^{BD}	11,63 \pm 0,33 ^C	20,80 \pm 2,04 ^{BCE}	27,60 \pm 2,23 ^{AB}
D16 (n=36)	130,35 \pm 8,02 ^D	11,35 \pm 0,33 ^{CD}	16,18 \pm 2,12 ^{CDEF}	27,46 \pm 2,61 ^{AB}
D18 (n=33)	106,99 \pm 8,53 ^E	11,39 \pm 0,42 ^{CD}	13,50 \pm 2,60 ^{DEFG}	30,06 \pm 4,98 ^{ABC}
D20 (n=26)	93,64 \pm 11,30 ^{EG}	11,68 \pm 0,52 ^{BC}	12,58 \pm 3,23 ^{DEFG}	28,53 \pm 5,20 ^{ABC}
D22 (n=19)	82,57 \pm 13,96 ^{EF}	9,62 \pm 0,88 ^D	9,10 \pm 3,95 ^{DEFG}	26,26 \pm 5,68 ^{ABCD}
D24 (n=9)	44,57 \pm 19,31 ^H	11,85 \pm 0,91 ^{ABCD}	4,69 \pm 5,72 ^{FG}	-
D26 (n=4)	45,74 \pm 22,51 ^{FH}	13,14 \pm 0,99 ^{ABC}	3,35 \pm 6,18 ^G	-
D28 (n=2)	51,39 \pm 27,10 ^{FGH}	12,12 \pm 1,20 ^{ABCD}	8,70 \pm 7,48 ^{EFG}	-

686

687 Aval.: avaliação; VPN: valores numéricos de pixels; Heterog.: heterogeneidade dos pixels;

688 Vasc.: % de vascularização do CL; VPS: velocidade do pico sistólico.

689 ^{A,B,C,...H} Médias com letras maiúsculas na mesma coluna são diferentes ao longo das avaliações690 de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

691

692 **Tabela 3.** Média estimada (\pm erro padrão) da velocidade diastólica final e índice de
 693 resistência ao longo dos dias das avaliações (D2-22) em cada tratamento (GP4+GnRH e
 694 GGnRH) após indução da ovulação de novilhas Nelore pré-púberes.

Avaliação	Tratamento	VDF (cm/seg)	IR
D2	GP4+GnRH (n=18)	5,71 \pm 1,56 ^{aDE}	0,63 \pm 0,04 ^{aAB}
	GGnRH (n=25)	4,44 \pm 2,07 ^{aF}	0,67 \pm 0,05 ^{aAB}
D4	GP4+GnRH (n=27)	9,11 \pm 0,99 ^{aCE}	0,61 \pm 0,03 ^{aAB}
	GGnRH (n=29)	7,42 \pm 1,11 ^{aEF}	0,60 \pm 0,03 ^{aBC}
D6	GP4+GnRH (n=27)	10,15 \pm 0,99 ^{aBCE}	0,56 \pm 0,03 ^{aB}
	GGnRH (n=29)	9,08 \pm 1,11 ^{aCDE}	0,67 \pm 0,03 ^{aA}
D8	GP4+GnRH (n=27)	9,86 \pm 0,99 ^{aBCE}	0,63 \pm 0,03 ^{aA}
	GGnRH (n=29)	12,58 \pm 1,11 ^{aABD}	0,60 \pm 0,03 ^{aBC}
D10	GP4+GnRH (n=27)	11,30 \pm 0,99 ^{aABC}	0,61 \pm 0,03 ^{aAB}
	GGnRH (n=28)	11,52 \pm 1,22 ^{aBCD}	0,54 \pm 0,03 ^{aC}
D12	GP4+GnRH (n=27)	12,83 \pm 1,01 ^{aA}	0,59 \pm 0,03 ^{aAB}
	GGnRH (n=26)	10,34 \pm 1,32 ^{aBCDE}	0,59 \pm 0,03 ^{aBC}
D14	GP4+GnRH (n=26)	12,29 \pm 1,01 ^{aAB}	0,58 \pm 0,03 ^{aAB}
	GGnRH (n=10)	8,65 \pm 2,02 ^{aBCDEF}	0,65 \pm 0,05 ^{aABC}
D16	GP4+GnRH (n=26)	12,14 \pm 1,03 ^{aAB}	0,59 \pm 0,03 ^{aAB}
	GGnRH (n=10)	7,78 \pm 2,43 ^{aDEF}	0,68 \pm 0,06 ^{aAB}
D18	GP4+GnRH (n=26)	10,20 \pm 1,23 ^{aABCE}	0,64 \pm 0,03 ^{aA}
	GGnRH (n=7)	16,48 \pm 4,94 ^{aABCDE}	0,50 \pm 0,12 ^{1aBC}

D20	GP4+GnRH (n=23)	8,04±1,59 ^{aCDE}	0,65±0,04 ^{aA}
	GGnRH (n=3)	18,64±4,98 ^{bABC}	0,43±0,13 ^{aABC}
D22	GP4+GnRH (n=17)	5,38±2,80 ^{aE}	0,63±0,07 ^{aAB}
	GGnRH (n=2)	21,81±4,98 ^{ba}	0,41±0,13 ^{aBC}

695

696 GP4+GnRH: tratamento utilizando dispositivo de progesterona e GnRH como indutor da
 697 ovulação; GGnRH: tratamento utilizando somente GnRH como indutor da ovulação; VDF:
 698 velocidade diastólica final; IR: índice de resistência vascular.

699 ^{a,b} Médias com letras minúsculas na coluna são diferentes entre os tratamentos no mesmo dia
 700 de avaliação de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

701 ^{A,B,...F} Médias com letras maiúsculas na coluna são diferentes no mesmo tratamento ao longo
 702 das avaliações de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

703

