

**JULIA MARIA BALDRIGHI**



**Estudo temporal da dinâmica folicular e  
parâmetros endócrinos de novilhas  
taurinas, zebuínas e bubalinas, mantidas  
sob o mesmo manejo nutricional**



**São Paulo**

**2013**

**JULIA MARIA BALDRIGHI**

**Estudo temporal da dinâmica folicular e  
parâmetros endócrinos de novilhas taurinas,  
zebuínas e bubalinas, mantidas sob o mesmo  
manejo nutricional**



**São Paulo**

**2013**

JULIA MARIA BALDRIGHI

**Estudo temporal da dinâmica folicular e parâmetros endócrinos de novilhas taurinas, zebuínas e bubalinas, mantidas sob o mesmo manejo nutricional**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Departamento:**

Reprodução Animal

**Área de concentração:**

Reprodução Animal

**Orientador:**

Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção

De acordo: \_\_\_\_\_

Orientadora

São Paulo  
2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2779  
FMVZ

Baldrighi, Julia Maria

Estudo temporal da dinâmica folicular e parâmetros endócrinos de novilhas taurinas, zebuínas e bubalinas, mantidas sob o mesmo manejo nutricional / Julia Maria Baldrighi. - 2013.

130 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção.

1. Dinâmica folicular. 2. Novilhas. 3. *Bos taurus*. 4. *Bos indicus*. 5. *Bubalus bubalis*. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

*Comissão de Ética no uso de animais*

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da dinâmica folicular e parâmetros endócrinos durante o ciclo estral em novilhas bubalinas, zebutnas e taurinas", protocolado sob o nº 1758/2009, utilizando embriões de 60 (sessenta) bovinos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 09/09/2009.

We certify that the Research "Follicular dynamic and endocrine patterns during estrus cycle in *Bos indicus*, *Bos Taurus* and *Bos bubalis* heifers", protocol number 1758/2009, utilizing 60 (sixty) bovine, under the responsibility Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 09/09/2009.

São Paulo, 16 de dezembro de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni  
Presidente



Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87  
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
São Paulo/SP - Brasil  
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757  
Fone: + 55 11 3091-7671/7676  
E-mail: [fmvz@usp.br](mailto:fmvz@usp.br)  
<http://www.fmvz.usp.br>

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BALDRIGHI, Julia Maria

Título: Estudo temporal da dinâmica folicular e parâmetros endócrinos de novilhas taurinas, zebuínas e bubalinas , mantidas sob o mesmo manejo nutricional

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## **DEDICO**

Aos meus pais Ilton e Cleusa, por não medirem esforços para fornecer a três filhas todos os instrumentos necessários para que construíssem suas jornadas.

Às minhas irmãs Mariane e Cintia, amigas,  
companheiras, batalhadoras, protetoras, divas,  
musas inspiradoras.

## **AGRADECIMENTOS**

Minha família linda! Sempre apoiando, entendendo meus momentos de ausência!

Amiga e orientadora Mayra: Mulher! Poderosa! Só falta ela saber disso!

Co-orientador (e para mim) amigo Pietro: Sereno, tranquilo, permanece calmo e mesmo na hora de pedir mais um gráfico!!! Brilhante!

Amigas motivadoras e conselheiras: Profa. Fabíola, Profa. Camila, Profa. Claudia!

Conselheiros amigos: Visintin e Mario, mesmo nas piadinhas!

Amigas do peito: "Vet Gostasas" (Liege, Fernanda loira, Cristina), "Vet Fitness" (Patrícia e Leticia)!

Amigo do peito: Adriano, o único que visualiza as histórias! Melhores risadas!! A gente se entende né Dri!! Só a gente...

Irmão caçula: Pedrito (Pedro Henrique)!

Amigas mega do peito: Flávia (era a Chica, virou a Mujer!), Cristina Lucio (Chica, Mujer, Mano, tudo ao mesmo tempo!), Thais (a sobancelha com vida própria mais amiga q eu já vi, que viaja junto)

Amigas mega importantes: Juliana, Fê Sevciuc, Giassetti, Giana, Renata, Mari Groke, Lindsay, Robertinha (fofocas, risadas, ombros amigos)

Amiga - amiga Camilla: a eficiência em pessoa! Sabe até o q vc tá pensando! Vc brilha Cá!!!!

Amigos "Brother" Everton e Zé Nélio: não existe tempo ruim, nem lombada, nem meio-fio para impedir uma corrida de carrinho!!!!

Pessoas imprescindíveis e infalíveis: Harumi, Thais, Roberta, Irailton, João, Marcio e Smael!!

Pessoa bochechuda: Manoel!

PS: Povo de São Paulo (VRA): unidos venceremos!!!!

PP: povo de Pira: Milton, Saara, Zé Rodrigo, Fernando, Sibeles: pode confiar!

Aquela ajuda indispensável com os animais e cercas: Prof. Ed (o filósofo), Prof. Rubens (o centro)!

Amigo sempre pronto para ajudar: Teo!

Ajuda indispensável no ELISA: Dr Beth e Erika.

Ajuda indispensável nas bioquímicas: Prof. Ângelo e Arnaldo (esse é herói)

Aquela ajuda indispensável nos RIA: Prof. Guilherme, Devani e Rafael de Araçatuba!

Aquela ajuda indispensável da Florida: Dr Dahl, Dr Hansen, Jeremy, Kyle, Cassandra, João, Fernanda, Dr Saulo, Ana, Tao e Leandro!!!!

Amigo do coração: Marco

Imãs caçulas postiças: Raquelzinha e Patizinha, Andressa: piriquitas!!

Amigo ET: Reynaldo (de outro planeta)!!!

Curandeiros, bruxos, restauradores de pessoas Dra Juana, Dra Tereza, Dr Marcel, Rita – nem tenho palavras!

Povo da anestésio = Flor, Geni – sempre ampliando os horizontes!!

Amigos dispostos a qualquer desafio: Frango (Enrico Ortolani Jr) e Fruta (Montemar, futuro Ministro da Agricultura)!

Aquela ajuda indispensável para o transporte das novilhas: caminhoneiro Marinho muitas emoções!

Aquela ajuda indispensável para o empréstimo das 11 novilhas Gir: Fazenda Quebra Cuia (Donizete).

Aquela ajuda indispensável para o empréstimo das 16 novilhas bubalinas: Dna Wilma!

Aquela ajuda indispensável para o empréstimo das 15 novilhas holandesas: Dra. Suzane.

As novilhas mais fofas do mundo: 42 e 3 rufiões que participaram dos meus experimentos, obrigada pela convivência e grande aprendizado de paciência, devo total gratidão e respeito.

Aquela ajuda indispensável para a finalização desse “parto”: Elza e Neuza da Biblioteca.

## **EPÍGRAFE**

**“Se fosse fácil, já tava feito”**

*José Antonio Visintin (Prof. Dr. USP)*

**“Na dúvida, não vá”**

*Ilton José Baldrighi (pai)*

**“Uma peeeena....”**

*(autor desconhecido)*

## RESUMO

BALDRIGHI, J. M. **Estudo temporal da dinâmica folicular e parâmetros endócrinos de novilhas taurinas, zebuínas e bubalinas, mantidas sob mesmo manejo nutricional.** [Temporal study of follicular dynamics and endocrine patterns of taurine, zebu and bubaline heifers, maintained in the same nutritional status]. 2013. 130f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Sabendo do impacto que nutrição e ambiente podem ter sobre a reprodução é de fundamental importância para aplicação nas biotecnologias da reprodução analisar o ciclo reprodutivo de novilhas bovinas (taurinas e zebuínas) e bubalinas, temporalmente, sob as mesmas condições nutricionais e de manejo. Assim, este estudo teve como objetivo analisar temporalmente a dinâmica folicular de novilhas Holandesas, Gir e Búfalas, mantidas sob as mesmas condições de manejo. As fêmeas foram alocadas no Departamento de Reprodução Animal (CBRA/FMVZ/USP), Campus Pirassununga. No Experimento 1 as fêmeas foram pré-sincronizadas com duas doses de prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF; D-cloprostenol, 150 µg IM, Prolise®), com 14 dias de intervalo. O dia da primeira ovulação, após segunda dose de PGF, foi considerado como o dia 0 do ciclo. A partir do D0 foram realizadas avaliações diárias da dinâmica folicular (folículos > 3 mm) por ultrassonografia (Aloka SSD500, 7,5MHz), até à detecção da ovulação subsequente. O Experimento 2 foi realizado após a segunda ovulação, avaliando-se a dinâmica folicular a cada 12h para detectar o momento do desvio da primeira onda folicular. As variáveis resposta foram analisadas pelo PROC GLIMMIX do SAS. Não foi encontrada diferença entre os intervalos inter-ovulatórios (22,3±0,65; 22,1±0,95; 23,8±0,63 dias; Holandesas, Gir e Búfalas, respectivamente). No entanto, em relação às características a seguir, foram encontradas diferenças significativas (P<0,05) em pelo menos um dos grupos genéticos, Holandesas, Gir e Búfalas, respectivamente, para o número de ondas foliculares em um ciclo estral (2,6±0,17<sup>a</sup>, 3,4±0,24<sup>b</sup>, 2,8±0,11<sup>a</sup>

ondas), número de folículos recrutados após primeira onda ( $26,1 \pm 1,7^a$ ,  $66,2 \pm 15,9^b$ ,  $22,7 \pm 1,91^a$  folículos), e segunda ovulação ( $30,2 \pm 3,08^a$ ,  $74,2 \pm 18,8^b$ ,  $27,1 \pm 2,8^a$  folículos), diâmetro do FD da primeira onda ( $15,8 \pm 0,66^a$ ,  $12,3 \pm 0,32^b$ ,  $12,1 \pm 0,03^b$  mm), diâmetro do FD da segunda onda ( $11,8 \pm 0,73^a$ ,  $9,4 \pm 0,52^b$ ,  $10,6 \pm 0,31^{ab}$  mm), diâmetro do folículo ovulatório ( $15 \pm 0,33^a$ ,  $13,7 \pm 0,74^{ab}$ ,  $13,5 \pm 0,46^b$  mm), diâmetro máximo do CL ( $26,8 \pm 0,54^a$ ,  $22,3 \pm 0,98^b$ ,  $19,5 \pm 0,32^c$  mm), concentração máxima de P4 no ciclo ( $7,7 \pm 0,33^a$ ,  $8,0 \pm 0,85^a$ ,  $5,3 \pm 0,28^b$  ng/ml) e duração da dominância do FD da primeira onda ( $8,0 \pm 0,49^a$ ,  $5,2 \pm 1,07^b$ ,  $8,1 \pm 0,44^a$  dias). Ainda com relação aos esteroides, a análise de testosterona plasmática nos 13 primeiros dias do ciclo foi semelhante entre as bovinas e menor para as bubalinas. Insulina e IGF plasmático também foram mensuradas. Novilhas taurinas e bubalinas ( $4,1 \pm 0,67$  mUI/ml,  $6,0 \pm 0,52$  mUI/ml, respectivamente) apresentaram menores concentrações de insulina do que as zebuínas ( $9,0 \pm 2,15$  mUI/ml), sendo que estas concentrações foram maiores durante a fase luteínica do que na fase folicular. Em relação ao desvio folicular no Experimento 2, não foram encontradas diferenças entre as raças para o momento do desvio ( $1,8 \pm 0,15$ ;  $2,1 \pm 0,21$ ;  $1,8 \pm 0,18$  dias), entretanto, novilhas Holandesas apresentaram neste momento maior diâmetro de FD e FS (FD:  $7,9 \pm 0,33$ ; FS:  $7,0 \pm 0,27$  mm;  $P < 0,05$ ) quando comparadas às Gir (FD:  $7,0 \pm 0,32$ ; FS:  $6,2 \pm 0,28$  mm) e às Búfalas (FD:  $6,8 \pm 0,19$ ; FS:  $6,3 \pm 0,29$  mm). Não foram encontradas diferenças para concentrações de IGF-I total no fluido folicular e no plasma das taurinas e das zebuínas, porém as concentrações nas bubalinas foram superiores a das bovinas. Com esses resultados, conclui-se que novilhas de grupos genéticos diferentes (*Bos taurus*, *Bos indicus* e *Bubalus bubalis*) apresentam características de crescimento folicular e luteínico específicos para a raça, quando avaliadas temporalmente e nas mesmas condições de manejo ambiental e nutricional.

Palavras-chave: Dinâmica folicular. Novilhas. *Bos taurus*. *Bos indicus*. *Bubalus bubalis*.

## ABSTRACT

BALDRIGHI, J. M. **Temporal study of follicular dynamics and endocrine patterns of taurine, zebu and bubaline heifers, maintained in the same nutritional status.** [Estudo temporal da dinâmica folicular e parâmetros endócrinos de novilhas taurinas, zebuínas e bubalinas, mantidas sob mesmo manejo nutricional]. 2013. 130 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Considering the impact that nutrition and environment have over reproduction, it is essential for the reproductive biotechnologies to analyze the reproductive cycle of bovine (taurine and zebu) and bubaline heifers at the same time and under the same nutritional management. Therefore, the objective of this work was to study the follicular dynamic of Holstein (n=15), Gir (n=11) and Buffalo (n=15) heifers kept under the same conditions. All heifers were housed at the Department of Animal Reproduction, (CBRA/FMVZ/USP), Pirassununga Campus. Animals were pre-synchronized with two doses of prostaglandin F2 $\alpha$  (PGF; D-cloprostenol, 150 $\mu$ g, IM), fourteen days apart (D0 = day of first ovulation). From D0, it was performed daily ultrasound scan of the ovaries to track follicular dynamics (follicles  $\geq$  3mm) until the occurrence of the second ovulation. After the second ovulation, the follicular dynamic was performed twice daily to detect the time of deviation of the first follicular wave. The response variables were analyzed by PROC GLIMMIX, SAS. No difference was found among the inter-ovulatory interval (22.3 $\pm$ 0.65; 22.1 $\pm$ 0.95; 23.8 $\pm$ 0.63 days) for Holstein, Gir and Buffalo, respectively. Differences were present (P<0.05) in at least one of the genetic groups, Holstein, Gir and Buffalo, respectively, for number of follicular waves (2.6 $\pm$ 0.17<sup>a</sup>, 3.4 $\pm$ 0.24<sup>b</sup>, 2.8 $\pm$ 0.11<sup>a</sup> waves), number of follicles recruited after first (26.1 $\pm$ 1.7<sup>a</sup>, 66.2 $\pm$ 15.9<sup>b</sup>, 22.7 $\pm$ 1.91<sup>a</sup> follicles), and second ovulation (30.2 $\pm$ 3.08<sup>a</sup>, 74.2 $\pm$ 18.8<sup>b</sup>, 27.1 $\pm$ 2.8<sup>a</sup> follicles), diameter of first wave DF (15.8 $\pm$ 0.66<sup>a</sup>, 12.3 $\pm$ 0.32<sup>b</sup>, 12.1 $\pm$ 0.03<sup>b</sup> mm), diameter of second wave DF (11.8 $\pm$ 0.73<sup>a</sup>, 9.4 $\pm$ 0.52<sup>b</sup>, 10.6 $\pm$ 0.31<sup>ab</sup> mm), diameter of

ovulatory follicle ( $15\pm 0.33^a$ ,  $13.7\pm 0.74^{ab}$ ,  $13.5\pm 0.46^b$  mm), maximum diameter of CL ( $26.8\pm 0.54^a$ ,  $22.3\pm 0.98^b$ ,  $19.5\pm 0.32^c$  mm), maximum concentration of P4 during ovulatory cycle ( $7.7\pm 0.33^a$ ,  $8.0\pm 0.85^a$ ,  $5.3\pm 0.28^b$  ng/ml) and length ( $8.0\pm 0.49^a$ ,  $5.2\pm 1.07^b$ ,  $8.1\pm 0.44^a$  days) of first wave dominant follicle dominance. No differences were found among the breeds for the moment of deviation ( $1.8\pm 0.15$ ;  $2.1\pm 0.21$ ;  $1.8\pm 0.18$  days). However, Holstein heifers presented larger DF and SF diameter (FD:  $7.9\pm 0.33$ ; FS:  $7.0\pm 0.27$ mm;  $P<0.05$ ) at deviation when compared with Gir (DF:  $7.0\pm 0.32$ ; SF:  $6.2\pm 0.28$ mm) and Buffalo (DF:  $6.8\pm 0.19$ ; SF:  $6.3\pm 0.29$ mm). Analyzing other steroids, concentration of blood testosterone during the first 13 days of the cycle was similar for the bovine heifers and lower for the bubaline heifers. Blood insulin and IGF-I were also measured. Holstein and bubaline heifers shown smaller concentrations of insulin ( $4.1\pm 0.67$  mUI/ml,  $6.0\pm 0.52$  mUI/ml, respectively) than Gir heifers ( $9.0\pm 2.15$  mUI/ml), and also, when grouping the data collected from luteal phase and follicular phase, the result shows that during the period of high P<sub>4</sub>, insulin concentrations are lower than during the period of high E<sub>2</sub>. No differences were found among bovine breeds for the IGF-I concentration in follicular fluid, but they were lower than the concentrations presented in the bubaline follicular fluid. The results herein presented show that heifers from different genetic groups (*Bos taurus*, *Bos indicus* and *Bubalus bubalis*), maintained at the same nutritional and environmental status, have different folliculogenesis and luteal growth, which are specific to its breed.

Keywords: Follicular Dynamics. Heifers. *Bos taurus*. *Bos indicus*. *Bubalus bubalis*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- EXPERIMENTO 1 .....	64
Figura 2-EXPERIMENTO 2 .....	64
Figura 3- Número de ondas foliculares no ciclo .....	80
Figura 4- Número de folículos presentes no ovário na emergência .....	81
Figura 5- Concentrações de insulina plasmáticas .....	84
Figura 6- Concentrações de IGF-I total plasmático.....	85
Figura 7-Concentrações de testosterona plasmática .....	86
Figura 8- Diâmetro máximo do folículo dominante primeira onda.....	87
Figura 9- Folículo dominante segunda onda - emergência e diâmetro.....	88
Figura 10- Diâmetros do folículo ovulatório até a ovulação.....	89
Figura 11- Diâmetros do folículo dominante na primeira onda .....	91
Figura 12- Duração da dominância do folículo dominante.....	91
Figura 13- Diâmetros do folículo ovulatório para a luteólise.....	92
Figura 14- Diâmetros do CL durante o ciclo ovulatório.....	96
Figura 15- Concentrações plasmáticas de progesterona no ciclo .....	96
Figura 16- Padrão de duas ondas foliculares .....	97
Figura 17- Padrão de 4 ondas foliculares .....	97
Figura 18- Padrão de 3 ondas foliculares .....	98
Figura 19- Corpo Lúteo e concentração de progesterona normalizados para a luteólise .....	99
Figura 20- Diâmetros do folículo dominante e folículo subordinado até o desvio folicular .....	101
Figura 21- Padrão do desvio folicular por raça .....	102
Figura 22- Concentrações de IGF-I no fluido folicular .....	102

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus Celsius
μmol	micromol
μUI	micro unidade internacional
BEN	balanço energético negativo
CL	corpo lúteo
D	dia
E <sub>2</sub>	estradiol
ECC	escore de condição corporal
EPM	erro padrão da média
FD	folículo dominante
FD1	folículo dominante da primeira onda folicular
FD2	folículo dominante da segunda onda folicular
FF	fluido folicular
FSH	hormônio folículo estimulante
g	grama
GLUT	proteína transportadora de glicose
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas
h	horas
IGF	hormônio do crescimento semelhante à insulina
IGFBP	proteína de ligação do IGF
IGFR	receptor do hormônio IGF
Kg	quilograma
L	litro
LH	hormônio luteinizante
mg	miligrama
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
MS	matéria seca
N	número de unidades experimentais
N <sub>2</sub>	nitrogênio
ng	nanograma
NRC	Nutrient requirements of dairy cattle
OPU	aspiração folicular
P	valor de probabilidade
P <sub>4</sub>	progesterona
PB	proteína bruta
PBS	tampão fosfato-salino
r	coeficiente de correlação
R <sup>2</sup>	coeficiente de determinação
RIA	radioimunoensaio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>22</b>
2.1 DINÂMICA FOLICULAR DO CICLO OVULATÓRIO: ASPECTOS GERAIS .....	22
2.2 ENDOCRINOLOGIA DO CICLO ESTRAL .....	23
2.3 CARACTERÍSTICAS RACIAIS DA FISIOLOGIA REPRODUTIVA DE <i>BOS TAURUS</i> , <i>BOS INDICUS</i> E <i>BUBALUS BUBALIS</i> .....	26
<b>2.3.1 Puberdade e Duração do Ciclo Estral</b> .....	<b>26</b>
<b>2.3.2 Comportamento Sexual</b> .....	<b>27</b>
<b>2.3.3 Padrão de Ondas Foliculares</b> .....	<b>30</b>
<b>2.3.4 Emergência de Ondas Foliculares</b> .....	<b>32</b>
<b>2.3.5 Desenvolvimento Folicular</b> .....	<b>33</b>
<b>2.3.6 Crescimento Folicular</b> .....	<b>36</b>
<b>2.3.7 Desenvolvimento e Crescimento Luteínico</b> .....	<b>39</b>
2.4 DESVIO FOLICULAR .....	42
<b>2.4.1 Fatores Envolvidos na Seleção Folicular</b> .....	<b>43</b>
2.4.1.1 Gonadotrofinas .....	43
2.4.1.2 Ambiente Intrafolicular: esteroides e sistema IGF .....	45
2.4.1.2.1 <i>Estradiol</i> .....	46
2.4.1.2.2 <i>Sistema IGF</i> .....	47
2.4.1.2.3 <i>Nutrição e seleção folicular</i> .....	48
2.5 FATORES QUE INTERFEREM NO PADRÃO DE ONDAS FOLICULARES ENTRE BOVINOS E BUBALINOS .....	50
<b>2.5.1 Número de ondas e fase luteínica</b> .....	<b>51</b>
<b>2.5.2 Número de ondas e nutrição</b> .....	<b>52</b>
<b>2.5.3 Número de ondas e dominância do Folículo Dominante da primeira onda</b> .....	<b>52</b>
<b>2.5.4 Número de ondas e Concentração de Esteroides</b> .....	<b>54</b>
<b>3 HIPÓTESE</b> .....	<b>58</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>60</b>
4.1 OBJETIVO GERAL .....	60
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	60
<b>5 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>62</b>
5.1 ANIMAIS E LOCAL DO EXPERIMENTO .....	62

5.2	MANEJO REPRODUTIVO PARA EXAMES ULTRASSONOGRÁFICOS E COLETAS DE SANGUE .....	63
5.3	EXPERIMENTO 1 .....	65
<b>5.3.1</b>	<b>Exames ultrassonográficos .....</b>	<b>65</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Caracterização das ondas de crescimento folicular e crescimento luteínico .....</b>	<b>66</b>
5.3.2.1	Intervalo Inter-Ovulatório e Ondas foliculares .....	66
<b>5.3.3</b>	<b>Crescimento folicular .....</b>	<b>67</b>
<b>5.3.4</b>	<b>Crescimento luteínico.....</b>	<b>67</b>
5.4	EXPERIMENTO 2 .....	68
<b>5.4.1</b>	<b>Caracterização do momento de desvio folicular .....</b>	<b>68</b>
5.5	COLHEITA DO MATERIAL PARA AVALIAÇÃO HORMONAL E BIOQUÍMICA ...	69
<b>5.5.1</b>	<b>Análises hormonais.....</b>	<b>70</b>
5.5.1.1	Ensaio de Progesterona no Plasma.....	70
5.5.1.2	Ensaio de Insulina no Plasma .....	71
5.5.1.3	Ensaio de IGF-I total no Plasma e no Fluido Folicular.....	71
5.5.1.4	Ensaio de Testosterona no Plasma .....	72
5.6	ASPIRAÇÃO FOLICULAR .....	72
<b>5.6.1</b>	<b>Separação e armazenamento do fluído folicular.....</b>	<b>73</b>
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	73
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
6.1	EXPERIMENTO 1: DINÂMICA FOLICULAR DO CICLO OVULATÓRIO .....	76
<b>6.1.1</b>	<b>Comportamento sexual e primeira ovulação. ....</b>	<b>76</b>
<b>6.1.2</b>	<b>Ciclo Ovulatório.....</b>	<b>78</b>
6.1.2.1	Duração do ciclo estral e padrão de ondas foliculares .....	78
6.1.2.2	Crescimento folicular e desenvolvimento folicular .....	80
6.1.2.3	Desenvolvimento e crescimento do Corpo Lúteo .....	92
6.2	EXPERIMENTO 2: DINÂMICA DO DESVIO FOLICULAR .....	100
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>104</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>105</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>123</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As pesquisas desenvolvidas na reprodução de bovinos e bubalinos têm focado no desenvolvimento e no crescimento de folículos ovulatórios, com o objetivo de elucidar e posteriormente controlar o desenvolvimento folicular, para aumentar a eficiência das biotecnologias da reprodução. A maior parte dos estudos de dinâmica folicular ovariana tem focado em raças *Bos taurus*, principalmente a raça Holandesa, sendo os resultados simplesmente, extrapolados para as raças zebuínas e bubalinas.

Segundo dados divulgados pelo IBGE, o rebanho bovino no Brasil ultrapassou 200 milhões de animais em 2011 (IBGE, 2011). A Associação Brasileira dos Criadores de Zebu estima que desse total, 80% tem sangue *Bos indicus* (ABCZ, 2009) refletindo o aumento da adoção desta genética pelo setor pecuário, devido à excelente adaptação destes ao estresse térmico, superior tolerância ao período de seca e superior tolerância aos carrapatos (FRISCH; VERCOE, 1984). No entanto, Alves et al. (2002) afirmam que a fertilidade de vacas zebuínas tem mostrado ser significativamente inferior quando comparada às fêmeas taurinas.

O búfalo doméstico (*Bubalus bubalis*) é um importante recurso agropecuário em diversos países na Ásia, região do mediterrâneo e América Latina. A população mundial de búfalos é de aproximadamente 195 milhões (FAO, 2013) de animais. Os búfalos vêm sendo tradicionalmente considerados como animais de baixa eficiência reprodutiva devido à baixa fertilidade na maioria das condições em que são criados, principalmente devido à puberdade tardia, extensos períodos de anestro pós-parto, baixa demonstração de estro, baixas taxas de concepção e longos intervalo-entre-partos (revisado por PERERA, 2011). No entanto, estudos no Sri Lanka (PERERA et al., 1987), Tailândia (YINDEE et al., 2011), Itália (PRESICCE, 2007), Brasil (BARUSELLI et al., 1997) mostraram que a fertilidade pode ser muito eficaz, planejando-se

cruzamentos genéticos compatíveis com o ambiente e providenciando alimentação adequada para os animais.

Diferenças sazonais nas funções ovarianas foram relatadas em *Bos indicus*, *Bos taurus* (FRISCH; VERCOE, 1984; STAHRINGER; NEUENDORFF; RANDEL, 1990) e em *Bubalus bubalis* (BARUSELLI *et al.*, 1997), sendo que novilhas zebuínas e bubalinas exibem maior variação sazonal que novilhas taurinas. A fim de se determinar a real diferença entre os padrões de crescimento folicular nessas três raças é essencial que elas sejam avaliadas durante a mesma época do ano e sob o mesmo manejo.

Estudos mostraram que os búfalos são animais mais rústicos, quando comparados aos bovinos. Sua função reprodutiva pode ser afetada por fatores ambientais e influenciada por uma série de características fisiológicas o que podem levar à sazonalidade. O aumento do interesse do conhecimento e melhoramento das performances produtivas e reprodutivas nas raças bubalinas vem sendo difundida, não somente nos países onde esses animais são nativos, mas também em outros locais do mundo. Novas biotecnologias aplicadas à reprodução originalmente desenvolvidas em bovinos estão sendo adotadas em bubalinos também. Pela mesma razão de se aprofundar os estudos em *Bos indicus* e encontrar diferenças fisiológicas entre *Bos taurus*, o mesmo deve ser feito com bubalinos. Um aumento na quantidade do conhecimento em mecanismos de fisiologia básica é necessário para que isso leve ao aumento e melhor adaptação dos protocolos hormonais utilizados para melhorar a eficiência e melhorar as características de produção animal.

Mais estudos detalhados são necessários para comparar os aspectos morfológicos e fisiológicos do desenvolvimento folicular entre fêmeas *Bos taurus*, *Bos indicus* e *Bubalus bubalis* para que diferenças na resposta ovariana às gonadotrofinas e aos hormônios esteroides entre estas raças sejam corretamente empregadas. Dessa forma, a fim de desenvolver estratégias para melhorar o desempenho reprodutivo de bovinos e de bubalinos é necessário compreender melhor a fisiologia reprodutiva

dessas raças e respectivas respostas às mudanças ambientais e nutricionais, temporalmente.

Além disso, devido aos impactos que a nutrição e o ambiente podem ter sobre os parâmetros reprodutivos (LEROY *et al.*, 2004, 2005) é de fundamental importância analisar o ciclo reprodutivo destes animais temporalmente e nas mesmas condições de manejo nutricional, para poder realizar ajustes finos nos protocolos já estabelecidos, buscando melhores resultados na reprodução e na produção.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A dinâmica folicular ovariana durante o ciclo estral em raças zebuínas vem sendo amplamente estudada e revisada (ALVAREZ *et al.*, 2000; BASTOS *et al.*, 2010; BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003; CARVALHO *et al.*, 2008; FIGUEIREDO *et al.*, 1997; RHODES; DE'ATH; ENTWISTLE, 1995; SARTORI; BARROS, 2011; SARTORI *et al.*, 2010) e, na maior parte, indiretamente comparada com raças europeias. Porém, poucos estudos compararam temporalmente as características reprodutivas entre zebuínos e taurinos, tanto de corte como de leite. Por conta das variáveis tempo e nutrição, a quantidade limitada de dados disponíveis para o gado zebuíno tem sido comparada com resultados obtidos em fêmeas da raça Holandesa, cujos experimentos foram realizados em outros lugares, sob condições de manejo diferentes.

Em estudos com fêmeas taurinas, associações temporais entre os folículos dominantes e a duração do CL durante o ciclo estral foram relatadas previamente (GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989; SIROIS; FORTUNE, 1988). No entanto, a medida que essas associações são estabelecidas pelo indivíduo, por efeitos ambientais e estão sujeitas a variações sazonais, fica vago aplicar os mesmos dados para todas as raças bovinas ou bubalinas.

### 2.1 DINÂMICA FOLICULAR DO CICLO OVULATÓRIO: ASPECTOS GERAIS

Por definição, a dinâmica folicular pode ser resumida como o processo contínuo de crescimento e de regressão de um grupo de folículos antrais, um dos quais se desenvolve até folículo pré ovulatório (LUCY *et al.*, 1992). A atividade ovariana está sob controle do eixo hipotálamo-hipófise-ovário-útero e seu funcionamento é essencial para o sucesso

reprodutivo (SIROIS; FORTUNE, 1988; revisado por CUMMINS et al., 2012).

Estudos endocrinológicos e ultrassonográficos demonstram que o crescimento folicular durante o ciclo estral em bovinos (GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989; DRIANCOURT, 2001; SARTORI et al., 2010) e bubalinos (BARUSELLI et al., 1997; ALI et al., 2003; PERERA, 2008) ocorre em padrão de ondas de desenvolvimento folicular, que pode variar de 1 a 5 ondas por ciclo. Em cada onda, após o recrutamento de um grupo de folículos, há o desenvolvimento do folículo dominante (FD) que suprime o crescimento dos outros folículos menores (SIROIS; FORTUNE, 1988; GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989; LUCY et al., 1992;). O FD da primeira onda cresce e atinge diâmetro máximo na metade do ciclo, contudo, em altos níveis de progesterona, não ovula e inicia o processo de regressão, permitindo o crescimento de uma nova onda de crescimento folicular. A emergência e a regressão das ondas foliculares ocorrem até que o processo de luteólise seja ativado. O FD que se desenvolve após a luteólise, isto é, o da última onda de crescimento folicular, é o folículo ovulatório (GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989; FORTUNE, 1994) e assim, quando da ausência de fecundação, um novo ciclo se inicia.

## 2.2 ENDOCRINOLOGIA DO CICLO ESTRAL

A emergência de uma onda folicular e subsequente seleção do FD é temporalmente associada, respectivamente, ao aumento e à queda nas concentrações circulantes de FSH (ADAMS *et al.*, 1992). A emergência de uma onda folicular é precedida por um pico de concentração de FSH, tanto em ondas espontâneas, quanto induzidas por hormônios. Substâncias produzidas pelos folículos, em especial o FD, entre elas as inibinas, são responsáveis por suprimir a liberação de FSH e, portanto a emergência da próxima onda folicular (GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989). Ao final do

período de dominância, ou seja, na ovulação ou na metade da fase estática de um FD anovulatório, as concentrações de FSH começam a crescer. Se o FD é removido por ablação folicular, um novo aumento de FSH se inicia em 12 horas, resultando na emergência de uma nova onda folicular em 24 horas (BERGFELT *et al.*, 1997). As menores concentrações de FSH são alcançadas quatro dias após a emergência e esta permanece baixa por mais dois a três dias (ADAMS *et al.*, 2008). No folículo, os receptores para FSH (FSH-R) estão presentes nas células da granulosa, enquanto receptores para LH (LH-R) estão localizados tanto nas células da granulosa quanto nas da teca.

O corpo lúteo (CL) é a principal fonte de progesterona ( $P_4$ ) (SIGH *et al.*, 2003). Angiogênese, proliferação das células da granulosa e da teca pertencentes à parede dos folículos ovulados e respectivas diferenciações (luteinização) resultam num aumento progressivo de concentrações de  $P_4$  plasmática de  $< 1$  ng/ml, aos 3 dias após ovulação para aproximadamente 3 ng/ml ao sexto dia. O pico de concentração de  $P_4$  plasmática ocorre entre os dias 10 e 14 após ovulação, seguido por decréscimo desta concentração após 16 dias, devido à luteólise induzida pela prostaglandina  $F2\alpha$  (PGF), liberada pelo endométrio de fêmeas não prenhes. A luteólise ocorre devido à morte celular por hipóxia resultante de hialinização dos vasos sanguíneos do CL (ARAUJO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2009).

Os FDs, tanto anovulatórios quanto ovulatórios, produzem, entre outros fatores, estradiol ( $E_2$ ). A síntese de  $E_2$  é dependente da produção de andrógenos pelas células da teca a partir da  $P_4$  e subsequente aromatização destes andrógenos para estrógenos, realizada nas células da granulosa. Esse fato é conhecido como teoria das duas células (FORTUNE; QUIRK, 1988). Após a emergência folicular, a concentração de  $E_2$  no fluido folicular (FF) do futuro FD aumenta, no mínimo 20 vezes até o dia da seleção folicular, seguido por uma redução acentuada no período da fase estática do FD anovulatório, antes que esta concentração volte a níveis basais no começo da fase de regressão (SIGH *et al.*, 2003). A

concentração máxima de  $E_2$  no fluido do folículo ovulatório é duas vezes maior do que a concentração no FD anovulatório. Tratamento com  $E_2$  exógeno durante a fase luteínica induz a regressão do FD existente, provavelmente pela supressão de LH e FSH hipofisário, seguida por uma nova liberação de FSH e sincronização de uma nova emergência folicular (BÓ et al., 1995). Além do  $E_2$ , que possui uma grande ação inibitória sobre o FSH, os folículos em desenvolvimento também produzem IGFs, inibinas e folistatina (SINGH et al., 1999) que participam da liberação e da disponibilidade do FSH.

A liberação de FSH e LH é induzida por pulsos de GnRH do hipotálamo. A frequência e a amplitude dos pulsos de LH são influenciadas pelas concentrações circulantes de  $P_4$  e  $E_2$ . Altos níveis de  $P_4$  produzidos pelo CL funcional durante o diestro ou a gestação, suprimem a frequência dos pulsos de LH (JAISWAL et al., 2009). Aumentando-se as concentrações de  $E_2$  adicionado ao decréscimo da  $P_4$  após luteólise, há aumento da frequência dos pulsos de LH, culminando em intenso pico pré-ovulatório de LH.

Embora  $E_2$  e  $P_4$  são considerados os principais hormônios envolvidos no ciclo estral, a lista de metabólitos e nutrientes com efeito direto ou indireto no desenvolvimento folicular é extensa. Os mediadores da função folicular, mais estudados, relacionados à nutrição são leptina, glicose-insulina, hormônio de crescimento (GH) e o sistema IGF. As concentrações de leptina, glicose e insulina estão elevadas quando as fêmeas estão em balanço energético positivo, bem como logo após a alimentação e podem converter informações metabólicas para o folículo (revisado por SCARAMUZZI et al., 2011).

## 2.3 CARACTERÍSTICAS RACIAIS DA FISIOLOGIA REPRODUTIVA DE *BOS TAURUS*, *BOS INDICUS* E *BUBALUS BUBALIS*

### 2.3.1 Puberdade e Duração do Ciclo Estral

O ciclo estral representa um padrão cíclico de atividade ovariana que promove a transição de fêmeas que partem de um período reprodutivo não receptivo para um receptivo, permitindo o cruzamento com o macho e estabelecendo, posteriormente, a gestação.

O aparecimento dos ciclos estrais ocorre na puberdade. Em novilhas taurinas, a puberdade acontece entre 6 a 12 meses de idade, geralmente quando a fêmea atinge 200 a 260 kg (RODRIGUES; KINDER; FITZPATRICK, 2002; revisado por FORDE et al., 2011). Novilhas zebuínas, em geral, atingem a puberdade mais tarde do que as novilhas taurinas, entre 22 a 24 meses (RODRIGUES; KINDER; FITZPATRICK, 2002), porém o peso à puberdade não se mostrou diferente,  $233 \pm 8$  kg (FAJERSSON et al., 1991) ou também se mostrou superior ao apontado por fêmeas taurinas,  $312 \pm 11$  kg (RODRIGUES; KINDER; FITZPATRICK, 2002). Esta puberdade tardia em novilhas zebuínas foi atribuída por alguns autores ao estresse nutricional e ambiental das regiões tropicais (FRISCH; VERCOE, 1984). Porém, Nogueira (2004) observou que independente das variações nutricionais, fatores genéticos também aparentam estar associados ao início da puberdade. Por essas diversas razões, as fêmeas zebuínas podem alcançar a puberdade entre 12 meses até 2 anos de idade (FAJERSSON et al., 1991; NOGUEIRA, 2004; revisado por SARTORI et al., 2010). Em búfalas, a puberdade geralmente acontece quando elas atingem aproximadamente 55 a 60% do peso adulto, em média 275 kg, porém a idade em que isso ocorre pode ser muito variável, de 16 a 46 meses (revisado por PERERA, 2008).

O ciclo estral de fêmeas taurinas tipicamente possui três semanas de duração, podendo variar de 18 a 24 dias (SENGER, 2003). Esse período consiste de duas fases discretas: fase luteínica, com duração de 14 a 18 dias, e fase folicular com duração de 4 a 6 dias (revisado por FORDE et al., 2011). Em gado zebuínio, estudos relataram que a duração do ciclo estral varia de 20 a 26 dias (RHODES; DE'ATH; ENTWISTLE, 1995; FIGUEIREDO et al., 1997; ALVAREZ et al., 2000; BASTOS et al., 2010). Já em bubalinos, os autores relataram duração semelhante às taurinas, entre 18 a 24 dias (BARUSELLI et al., 1997; PERERA, 2008; BARKAWI et al., 2009).

### **2.3.2 Comportamento Sexual**

O comportamento sexual durante o período de estro é uma importante característica reprodutiva que difere claramente entre as raças. Fêmeas *Bos taurus* apresentaram período de receptividade sexual de 30 minutos a 27 horas (LOPEZ; SATTER; WILTBANK, 2004) contra 1 a 20h em fêmeas *Bos indicus* (revisado por BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003). Um estudo que comparou o comportamento reprodutivo de vacas Nelore com vacas Angus por radiotelemetria (Heat-Watch®) também observou que fêmeas da raça Nelore apresentaram estro de menor duração ( $12,9 \pm 2,9$  horas) quando comparado às fêmeas Angus ( $16,3 \pm 4,8$  horas; MIZUTA, 2003).

Esta curta duração do período de aceitação de monta faz com que a detecção do estro em zebuínos seja menos eficiente do que em taurinos, o que compromete as taxas de IA. Além disso, Bó et al. (2003) relataram que mais de 50% dos animais zebuínos iniciam a manifestação de cio no período noturno, entre 18:00h e 6:00h, sendo que cerca de 30% iniciam e encerram o estro durante a noite.

Diferenças na duração e exibição do estro podem ocorrer entre indivíduos da mesma raça dependendo de variações metabólicas e climáticas. Vacas holandesas durante o período de alta produção leiteira apresentaram curto período de estro. Em trabalho publicado por Lopez et al. (2004), foi detectado estro de menor duração (6,2 contra 10,9 horas) e de baixa intensidade (6,3 contra 8,8 montas) entre fêmeas de alta (mais de 39,5 kg/dia) e baixa (menos de 39,5 kg/dia) produção leiteira, provavelmente porque vacas de alta produção apresentaram menores concentrações de E<sub>2</sub> do que as de baixa produção. Essa diferença de concentração também foi relatada em outros estudos quando se comparou novilhas e vacas em lactação (SARTORI; ROSA; WILTBANK, 2002; SARTORI *et al.*, 2004).

O efeito do metabolismo também foi descrito para novilhas Nelore, quando fêmeas desta raça foram submetidas a dietas de alto e baixo consumo (MOLLO *et al.*, 2007). A exibição do estro nas fêmeas que receberam maior oferta alimentar foi de duração e intensidade menores, quando comparado às novilhas que receberam baixo consumo de dieta. Além disso, sabe-se que fêmeas taurinas e zebuínas podem diminuir o período, omitir ou mesmo bloquear sinais de estro em condições que causem algum tipo de estresse, como calor intenso (WOLFENSON; ROTH; MEIDAN, 2000), frio e ou manejo intenso (SARTORI; BARROS, 2011).

Uma das maiores diferenças entre búfalas e fêmeas bovinas é que as primeiras apresentam manifestação dos sinais de estro menos evidente do que as bovinas, sendo que o comportamento homossexual entre as bubalinas é raro (BARUSELLI *et al.*, 1997). O principal sinal de estro é a inquietação. Externamente, mudanças físicas detectáveis incluem inchaço de vulva, mas esta identificação só é possível em animais confinados. A secreção de muco cervical durante o estro é menos intensa do que em bovinos, tendendo a se acumular no assoalho da vagina, sendo eliminado quando o animal se deita ou junto com a urina (PERERA, 2008). Além desses fatores, também foi descrito que a duração do estro pode ser influenciada pelo ambiente. Em climas quentes a duração foi curta (média

de 10 horas; entre 5 e 27 horas) e os sinais de estro ocorreram durante a noite e no início da manhã (MOIOLI *et al.*, 1998).

Conhecer o comportamento de cio e o intervalo estro-ovulação é essencial para estimar o melhor momento da inseminação artificial. Foi relatado que para novilhas taurinas esse período foi entre 28 e 32 horas e para vacas lactantes foi de  $27,6 \pm 5,4$  horas, após o início do estro (WALKER; NEBEL; MCGILLIARD, 1996). Os autores relatam não haver diferença entre o estro induzido por PGF e o estro espontâneo. Para novilhas Nelore, esse intervalo foi de  $26,1 \pm 1,2$  horas para as que exibiram estro natural e  $27,7 \pm 2,4$  horas para as que exibiram estro após duas doses de PGF (PINHEIRO *et al.*, 1998). Ambos os trabalhos mostram que o tempo de ovulação não foi afetado pela luteólise induzida por PGF.

Aparentemente, um único estudo comparou o comportamento estral de vacas taurinas (Angus) e zebuínas (Nelore), utilizando o sistema de radiotelemetria para detecção do estro (MIZUTA, 2003). Apesar de vacas Nelore apresentarem menor duração dos sinais de estro do que vacas Angus ( $12,9 \pm 2,9$  h vs.  $16,3 \pm 4,8$  h, respectivamente), ambas as raças avaliadas apresentaram semelhante intervalo entre o início do estro até a ovulação, resultando em  $27,1 \pm 3,3$  horas contra  $26,1 \pm 6,3$  horas para Nelore e Angus, respectivamente.

Em fêmeas *Bubalis bubalus* foi descrito que o intervalo estro-ovulação varia de acordo com a temperatura ambiente (PERERA, 2008; YINDEE *et al.*, 2011). Em climas mais quentes, a duração do estro tende a ser mais curta e os sinais de cio são exibidos durante a noite, apresentando intervalo estro-ovulação de 34 horas, variando de 24 a 48 horas (PERERA, 2008). Estudos anteriores, realizados em búfalas europeias mostraram que esses animais não só tiveram longa duração dos sinais de estro como também um maior intervalo do início do estro até a ovulação, de  $51,1 \pm 21,5$  horas (MOIOLI *et al.*, 1998).

### 2.3.3 Padrão de Ondas Foliculares

O ciclo estral em bovinos e bubalinos tem como padrão a formação de ondas de crescimento folicular (SIROIS; FORTUNE, 1988; GINTHER; KNOFF; KASTELIC, 1989; GINTHER et al., 1996). Cada onda de crescimento envolve emergência, seleção e dominância seguida por atresia ou ovulação do FD.

Quanto ao número de ondas presentes no ciclo estral de bovinos, diversos trabalhos foram publicados na tentativa de descrever o padrão dessas ondas por ciclo. Foi descrito que fêmeas da raça Holandesa apresentam padrão de duas ou três ondas de crescimento folicular por ciclo estral, tanto em novilhas como em vacas (GINTHER; KNOFF; KASTELIC, 1989; SARTORI et al., 2004; WOLFENSON, et al., 2004) com casos de até quatro ondas (SIROIS; FORTUNE, 1988). Em 2002, Townson et al. relataram que vacas holandesas lactantes com 3 ondas foliculares seriam mais férteis do que vacas com 2 ondas ( $P < 0,058$ ). Segundo esses autores, o período prolongado de persistência do FD ovulatório em vacas com duas ondas seria uma causa provável de diminuição do desempenho reprodutivo. Semelhantes resultados foram reportados em vacas e novilhas Angus e respectivos cruzamentos (AHMAD *et al.*, 1997). Porém, dois recentes estudos relataram o contrário. Cummins et al. (2012) relataram taxas de prenhes semelhantes entre vacas pertencentes ao grupo de  $P_4$  de curta duração (análoga à onda ovulatória de um ciclo de três ondas) e vacas pertencentes ao grupo de longa duração de  $P_4$  (análoga à onda ovulatória de um ciclo com 2 ondas), utilizando um grande número de animais, tanto de vacas, quanto de novilhas. Dias et al. (2012) também não encontraram diferença na taxa de fertilidade quando compararam animais com menor ou maior concentração de  $P_4$  durante a fase de crescimento da onda ovulatória (análogo a 3 versus 2 ondas, respectivamente), tanto em novilhas quanto em vacas lactantes de corte.

Em fêmeas zebuínas, relatos também descrevem o padrão de 2 a 3 ondas, sendo notificada a presença de até 4 ondas de crescimento folicular por ciclo estral nas raças Nelore (FIGUEIREDO *et al.*, 1997) e Gir (VIANA *et al.*, 2000), por exemplo. Em diversos trabalhos, os autores relatam padrões de 2 a 4 ondas foliculares, com predominância de 3 ondas em fêmeas *Bos indicus* (66,7% RHODES; DE'ATH; ENTWISTLE, 1995; SARTORELLI *et al.*, 2005; MOLLO *et al.*, 2007).

Quando se comparou categorias de vacas e novilhas, Figueiredo *et al.* (1997) observaram que as vacas apresentavam maior incidência de 2 ondas foliculares (83,3%) enquanto que a maior parte das novilhas apresentavam 3 ondas (64,7%). Num outro estudo que comparou vacas Angus, Brahman e Senepol, as fêmeas não apresentaram predominância de padrão de ondas foliculares (ALVAREZ *et al.*, 2000).

O crescimento folicular ovariano durante o ciclo estral em búfalas é semelhante ao observado em bovinos e também é caracterizado por ondas de recrutamento, crescimento e regressão folicular (PERERA, 2008). Porém, diferentes observações em relação ao número de ondas foliculares por ciclo estral foram feitas de acordo com os países que estudaram essa espécie.

Baruselli *et al.* (1997) descreveram que 63% das vacas Murrah apresentaram padrão de 2 ondas foliculares enquanto que apenas 33% apresentaram 3 ondas e uma única búfala (1/30 fêmeas) apresentou uma onda. Estudos em novilhas búfalas Egípcias, mostraram predominância de 3 ondas foliculares (54%) durante um ciclo estral (BARKAWI *et al.*, 2009) e em vacas de 6 a 10 anos de idade, Ali *et al.* (2003) relataram a predominância (80%) de duas ondas foliculares por ciclo. Já relatos em fêmeas mediterrâneas indicaram diferenças entre nulíparas e múltíparas (PRESICCE *et al.*, 2004). Após sincronização do estro com P<sub>4</sub> e PGF, novilhas exibiram uma, duas ou três ondas de crescimento folicular. Dispersão essa que não foi verificada no grupo das vacas múltíparas em que todas as fêmeas apresentaram padrão de 2 ondas de crescimento folicular.

Num dos primeiros estudos que definiu o padrão de ondas foliculares na dinâmica folicular de bovinos (RAJAKOSKI, 1960), o autor relatou a existência de duas ondas de crescimento folicular, sendo que a primeira onda iniciou-se entre o 3º e o 4º dia após o estro, evidenciando a presença de um FD até o 11º dia do ciclo. Já a segunda onda começou no 12º dia, quando o folículo da primeira onda tornou-se atrésico, mas perdurou até o final do ciclo estral.

### **2.3.4 Emergência de Ondas Foliculares**

Estudos posteriores mostraram que, em fêmeas taurinas, a emergência da primeira onda de crescimento folicular ocorre no dia da ovulação (D0). Em fêmeas taurinas com 2 ondas foliculares, a onda ovulatória emerge, em média, entre os dias 9 e 10 do ciclo e no padrão de 3 ondas, a segunda ocorre entre os dias 8 e 9 e a ovulatória por volta dos dias 15 e 16 (SARTORI et al., 2004; MAPLETOFT; BÓ; BARUSELLI, 2009). Rhodes et al. (1995) demonstraram que em novilhas Brahman com padrão de 2 ondas foliculares, a emergência da onda ovulatória ocorreu mais tarde, entre os dias 11 e 12 e para o padrão de 3 ondas, a segunda emergência ocorreu por volta do dia 10 e a onda ovulatória ocorreu entre os dias 15 e 16 do ciclo. De forma geral, tanto para taurinos quanto zebuínos, o segundo FD tende a aparecer mais cedo em ciclos estrais com 3 ou 4 ondas foliculares, quando comparado ao padrão de 2 ondas. Esse fato é associado à redução da persistência do primeiro FD em ciclos com 3 ondas (SIROIS; FORTUNE, 1988; RHODES; DE'ATH; ENTWISTLE, 1995; SARTORI et al., 2004; MAPLETOFT; BÓ; BARUSELLI, 2009).

Em bubalinos, estudos ultrassonográficos (BARUSELLI et al., 1997; PRESICCE et al., 2004) revelaram que para os padrões de 2 ondas, as emergências foliculares ocorrem nos dias 0,2 e 9,2, respectivamente, e

para o padrão de 3 ondas foliculares, a primeira, segunda e terceira emergências ocorrem nos dias 1, 10 e 19, respectivamente.

### **2.3.5 Desenvolvimento Folicular**

Um número fixo de folículos primordiais é estabelecido durante o desenvolvimento fetal. Em bovinos, o crescimento folicular se inicia antes do último folículo primordial ser formado e assim continua seu desenvolvimento pela vida fetal, neonatal e adulta (revisado por SCARAMUZZI *et al.*, 2011).

Uma vez que os folículos deixam de ser primordiais, estão comprometidos ao crescimento independente de gonadotrofinas. Conforme o crescimento folicular avança até o estágio de folículo pré-antral, os folículos ganham múltiplas camadas da granulosa, zona pelúcida, camada da teca interna e outra da teca externa, sendo que estas possuem receptores para LH (LUNDY *et al.*, 1999), tornando-se assim, responsivo às gonadotrofinas. A aquisição das enzimas necessárias para produção de andrógenos pela teca é finalizada antes da formação do antro (SCARAMUZZI *et al.*, 2011). O crescimento folicular nos estágios responsivos às gonadotrofinas é constante para garantir o contínuo suprimento de folículos e formar, assim, o padrão de crescimento de ondas. Sobre a influência de FSH, os folículos responsivos, tornam-se dependentes de gonadotrofinas no processo que reflete a dinâmica da retroalimentação negativa entre  $E_2$  – inibina – FSH (WEBB *et al.*, 2004).

No ovário de fetos bovinos há aproximadamente  $2 \times 10^6$  células germinativas no final do primeiro trimestre de gestação, mas este número cai drasticamente durante o último período de crescimento fetal até o nascimento (TANAKA *et al.*, 2001), quando se inicia a ativação folicular. Esse fato sugere que remodelar as camadas da granulosa avasculares para formar um antro e manter a união entre as células da granulosa e o

oócito é um desafio fisiológico (revisado por SCARAMUZZI et al., 2011). Os folículos que são efetivamente recrutados durante a vida reprodutiva da fêmea são aqueles presentes ao nascimento (SOTO-SUAZO; ZORN, 2005; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005), mas esta reserva é altamente variável (ERICKSON, 1966). O destino dos folículos ovarianos durante a vida pós-natal são ovulação ou atresia e estes dois processos causam redução progressiva no número de oócitos, devido ao consumo gradual da reserva de folículos pré antrais (IRELAND et al., 2009).

Na tentativa de estimar possíveis diferenças na população ovariana fetal de folículos pré antrais entre taurinas e zebuínas, Silva-Santos et al. (2011) observaram alta oscilação da população entre indivíduos da mesma categoria e entre raças. Em novilhas Nelore, o número de folículos pré antrais variou de 9.623 até 260.371 e em novilhas Angus esta variação ficou entre 33.798 e 320.729 folículos, tornando-se difícil aplicar um modelo estatístico para inferir sobre diferenças no número de folículos ovarianos.

Diversos trabalhos descreveram que fêmeas *Bos indicus* recrutam maior número de folículos por onda de crescimento folicular do que fêmeas *Bos taurus* (GINTHER et al., 1996; ALVAREZ et al., 2000; BURATINI et al., 2000; BURNS et al., 2005; IRELAND et al., 2007; CARVALHO et al., 2008; GIMENES et al., 2009; BASTOS et al., 2010) o que influencia diretamente na eficiência da técnica de aspiração folicular guiada por ultrassom intravaginal (OPU-PIV).

Em bovinos europeus, foi relatado que o recrutamento da onda folicular é caracterizado pelo crescimento repentino de 8 a 56 folículos por onda (JAISWAL; SINGH; ADAMS, 2004; WEBB et al., 2004; IRELAND et al., 2007). Apesar da altamente variável, estudos mostraram que o número máximo observado por onda folicular, chamado pelos autores de contagem de folículos antrais (AFC) foi altamente repetitivo entre indivíduos, independente da idade, raça, país, estação do ano ou fase da lactação (BURNS et al., 2005; IRELAND et al., 2007). A partir disso, esses grupos classificaram as fêmeas baseando-se na média de AFC durante

duas a quatro ondas foliculares. Os autores observaram que animais que pertenciam ao grupo de baixa contagem folicular (menos que 15 folículos/onda) representavam 15 a 20% das fêmeas, enquanto que o restante dos animais pertencia ao grupo de contagem intermediária de folículos, isto é, entre 16 a 24 folículos/onda (BURNS *et al.*, 2005; IRELAND *et al.*, 2008; MOSSA *et al.*, 2010) e que este número correlacionava positivamente com a fertilidade das fêmeas.

A superioridade do número de folículos apresentada por fêmeas *Bos indicus* e a repetibilidade deste em ciclos sucessivos pode sugerir que fêmeas zebuínas talvez não possuam maior população de folículos pré antrais, mas talvez, menores taxas de atresia folicular quando comparadas às *Bos taurus*, o que resulta em maior número de folículos antrais viáveis (SILVA-SANTOS *et al.*, 2011). De fato, foi relatado que a depleção de reservas foliculares está associada com altas taxas de atresia folicular (KRYSKO *et al.*, 2008).

Os ovários de uma novilha bubalina cíclica possuem um reservatório de apenas 10.000 a 20.000 folículos primordiais (DANELL, 1987) e uma média de 6 a 8 folículos recrutados por onda folicular (BARUSELLI *et al.*, 1997). Além disso, os ovários possuem tamanho menor do que o de bovinos, pesando por volta de 4 g (revisado por PERERA, 2011). Esta pode ser uma das razões para a baixa eficiência na produção de embriões.

Alguns autores relatam que o maior número de folículos presentes no ovário de *Bos indicus* pode ser devido à elevada concentração de IGF-I e de insulina em *Bos indicus* (BURATINI *et al.*, 2000; BARUSELLI; GIMENES; SOUSA, 2007; BASTOS *et al.*, 2010). Esta elevada concentração ocorre mesmo na presença de baixos níveis de FSH, já que animais zebuínos apresentam maiores concentrações plasmáticas de IGF-I e menores concentrações de FSH, quando comparadas às vacas taurinas (ALVAREZ *et al.*, 2000).

Estudos que utilizaram diversos modelos animais demonstraram que o IGF-I não participa da formação do ovário, no recrutamento de folículos primordiais ou no crescimento de folículos independentes de

gonadotrofinas (revisado por SCARAMUZZI et al., 2011). Esses estudos mostram que o IGF-I aumenta a sensibilidade de pequenos folículos (5 mm em bovinos e humanos) à estimulação de gonadotrofinas e simula a transição do estágio de responsividade para dependência de gonadotrofinas (MAZERBOURG et al., 2003). Assim, as maiores concentrações de IGF-I total seria uma explicação plausível do por que fêmeas zebuínas apresentam maior número de folículos presentes no ovário no momento da emergência folicular.

Nas fêmeas, o hormônio anti-mülleriano (AMH), pertencente à superfamília TGFB de fatores de crescimento, é produzido exclusivamente pelas células da granulosa de folículos saudáveis em crescimento (LA MARCA e VOLPE, 2006 de IRELAND et al 2011). Foi observado que concentrações sanguíneas de AMH em novilhas e vacas taurinas estão positivamente correlacionadas com o número de folículos antrais recrutados e o número de folículos e oócitos saudáveis nos ovários (IRELAND et al., 2008).

Outros fatores associados com o número de folículos antrais maiores que 3 mm de diâmetros são os andrógenos produzidos pelos ovários (MOSSA *et al.*, 2010). Neste estudo, as concentrações séricas de testosterona foram menores, em novilhas de corte e vacas de leite com baixo vs. alto número de folículos antrais. Esses autores sugeriram que a produção folicular de andrógenos pelas células da teca está possivelmente associada ao número de folículos em crescimento durante as ondas foliculares e correspondentes ao tamanho da reserva ovariana em bovinos.

### **2.3.6 Crescimento Folicular**

Em bovinos, o crescimento folicular ovariano de 0,3 a 3-5 mm de diâmetro ocorre em mais de 30 dias, mas o desenvolvimento subsequente

é rápido com taxas de crescimento detectadas em grande folículos de até 2 mm/dia (1,5 mm/dia para taurinas, 1,3 mm/dia para zebuínas; BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003 e 1,5 mm/dia para bubalinas: BARUSELLI et al., 1997). Carvalho et al. (2008) relatam taxas de crescimento folicular menores para *Bos indicus* do que para *Bos taurus* e segundo os autores, isso poderia ser devido à influência das concentrações de P<sub>4</sub> circulante em cada raça.

Uma notável diferença entre taurinos, zebuínos e bubalinos apontada por diversos autores refere-se aos diâmetros dos FD de cada onda folicular. Em *Bos taurus*, Ginther; Knopf e Kastelic (1989) relataram que o diâmetro máximo do FD ovulatório variou de acordo com o número de ondas foliculares, observando valores de  $16,5 \pm 0,4$  mm para fêmeas de 2 ondas e  $13,9 \pm 0,4$  mm para fêmeas com 3 ondas foliculares. Nesse estudo, o diâmetro do FD da primeira onda ( $17,1 \pm 0,5$  mm) foi superior ao diâmetro do FD ovulatório. Em outro estudo, que compara novilhas e vacas holandesas em lactação (SARTORI et al., 2004), os autores relataram que o diâmetro máximo do FD ovulatório nas novilhas ( $15,0 \pm 0,2$  mm) atingiu valores inferiores aos apresentados por vacas ( $17,2 \pm 0,5$  mm).

Em trabalho realizado com a raça Nelore (FIGUEIREDO et al., 1997) não foram relatadas diferenças entre o diâmetro máximo do folículo ovulatório entre vacas e novilhas (11 mm). Além disso, esses folículos apresentaram maior diâmetro do que outros FD no mesmo ciclo e em fêmeas com padrão de 3 ondas, sendo o segundo FD menor que o FD da primeira onda. Num outro estudo que comparou, temporalmente, o efeito da PGF no começo e no final do protocolo de sincronização de ovulação em novilhas taurinas, zebuínas e mestiças, o diâmetro do FD no dia 8 do protocolo foi superior para novilhas taurinas ( $11,6 \pm 0,5$  mm) do que para novilhas zebuínas ( $9,5 \pm 0,5$  mm; CARVALHO et al., 2008). Já Bó et al. (2003) observaram maiores diâmetros dos FD da primeira onda, relatando valores de  $13,3 \pm 0,5$  mm para vacas *Bos taurus* e  $12,9 \pm 0,4$  mm para vacas *Bos indicus* criadas a pasto. Nesse estudo, os valores dos diâmetros

dos FD da segunda onda também foram inferiores aos das demais ondas e o tamanho do folículo ovulatório foi superior ao da primeira onda ( $14,8 \pm 0,6$  mm para *Bos taurus* e  $13,0 \pm 0,3$  mm para *Bos indicus*), como reportado anteriormente por Figueiredo et al. (1997). Maiores diâmetros também foram relatados em estudo recente (BASTOS et al., 2010) que comparou temporalmente vacas Nelore e Holandesa não lactantes. O diâmetro máximo dos folículos ovulatórios foram maiores para Holandesas ( $15,7 \pm 0,3$  mm) do que para Nelores ( $13,4 \pm 0,3$  mm). Apesar destes estudos apresentarem valores diferentes para o diâmetro máximo alcançado pelo folículo ovulatório, todos os resultados mostraram que fêmeas taurinas apresentam maiores folículos do que fêmeas zebuínas.

Valores dos diâmetros máximos em cada onda de crescimento folicular também diferem entre bovinos e bubalinos. Fêmeas bubalinas com duas ondas de crescimento folicular apresentaram diâmetros de  $10,5 \pm 0,6$  mm a  $12,4 \pm 0,8$  mm para a primeira onda e  $11,0 \pm 0,7$  mm a  $13,8 \pm 0,4$  mm para a segunda onda ovulatória. Fêmeas com três ondas de crescimento folicular apresentaram diâmetros máximos de  $13,3 \pm 1,8$  mm;  $11,1 \pm 2,1$  mm e  $13,4 \pm 1,3$  mm (BARUSELLI et al., 1997; PRESICCE et al., 2004). Essa variação mostrou-se associada à genética e à categoria da fêmea. Para búfalas com duas ondas de crescimento folicular, tanto a taxa de crescimento quanto o diâmetro do maior folículo foi significativamente menor para novilhas do que para vacas (revisado por PERERA, 2011). Outro fator que interferiu no diâmetro máximo foi observado por Yindee et al. (2011). Os diâmetros dos folículos ovulatórios aumentaram entre a primeira e segunda ovulação pós-parto ( $13,5 \pm 0,5$  para  $14,3 \pm 0,3$  mm) e o diâmetro do folículo ovulatório que resultou na formação de um CL foi significativamente superior nas fêmeas que emprenharam, comparado às fêmeas que não emprenharam.

### 2.3.7 Desenvolvimento e Crescimento Luteínico

Como o diâmetro do CL foi positivamente correlacionado ao tamanho do folículo ovulatório (VASCONCELOS et al., 2001; SARTORI; ROSA; WILTBANK, 2002), pode-se concluir que fêmeas que apresentam maior diâmetro do folículo ovulatório, como as taurinas, apresentam maior tamanho de CL e maior concentração de P<sub>4</sub> no ciclo subsequente.

Enquanto estudos em taurinos relataram volume máximo do CL de 7303mm<sup>3</sup> para novilhas e 11248 mm<sup>3</sup> para vacas lactantes Holandesas (SARTORI et al., 2004) e diâmetros variando de 19 a 30 mm (GINTHER; KNOFF; KASTELIC, 1989; ALVAREZ et al., 2000; LYNCH et al., 2010), estudos em *Bos indicus* relataram volume do CL entre 1987 mm<sup>3</sup> a 5199 mm<sup>3</sup> e diâmetros equivalentes a 17 e 21 mm (RHODES; DE'ATH; ENTWISTLE, 1995; FIGUEIREDO et al., 1997; ALVAREZ et al., 2000; MOLLO et al., 2007; MACHADO et al., 2008). Em estudo analisando temporalmente vacas Nelore e Holandesas (BASTOS et al., 2010), os valores do volume do CL para as Holandesas (7611 ± 512 mm<sup>3</sup>) foi muito inferior ao reportado por Sartori et al. (2004) para Holandesas em lactação, mostrando valores similares aos reportados para novilhas taurinas, mas ainda superiores aos resultados obtidos em vacas Nelore (4917 ± 548 mm<sup>3</sup>).

Apesar da superioridade no volume e no diâmetro do CL, vacas taurinas apresentam menores concentrações de P<sub>4</sub> (5,8 ± 0,6 ng/ml) quando comparadas às novilhas de mesma raça (7,3 ± 0,4 ng/ml; SARTORI et al., 2004) e quando comparadas temporalmente às vacas zebuínas (4,6 ± 0,4 ng/ml vs 4,1 ± 0,18 ng/ml para zebuínas e taurinas, respectivamente, BASTOS et al., 2010).

Em bubalinos, o CL geralmente não está proeminente na superfície do ovário e, muitas vezes, pode ser confundido com um folículo, devido à consistência. Essas características diminuem a acurácia na identificação de estruturas ovarianas por palpação retal (PERERA et al., 1987). Em estudo

realizado com novilhas bubalinas após tratamento com implante auricular de P<sub>4</sub> (GIMENES et al., 2009), os diâmetros do CL observados no dia 0 (dia em que foi observada à ovulação) ficaram entre 18,8 ± 1,5 a 19,1 ± 1,7 mm. Os autores observaram maiores concentrações de P<sub>4</sub> (entre 5 e 6 ng/ml) nas novilhas bubalinas quando comparadas às zebuínas (2 a 3 ng/ml) e às taurinas (1 a 4 ng/ml), submetidas ao mesmo protocolo. Já Yindee et al. (2011), avaliando búfalas no pós-parto, encontraram tanto diâmetro (14,6 ± 0,34 mm), quanto, concentração de P<sub>4</sub> (1,2 a 3,2 ng/ml) menores do que o primeiro trabalho, mas similares aos valores reportados para bovinas.

A produção de leite por vaca aumentou consideravelmente nas últimas décadas devido, principalmente ao ganho genético para produção leiteira ligada às mudanças de manejo nutricional. No entanto, foi observada, concomitantemente, um decréscimo na eficiência da reprodução nessas fêmeas (WASHBURN et al., 2002). Múltiplas causas podem estar envolvidas nesse decréscimo, sendo uma delas a maior ingestão de matéria seca (IMS) que vacas lactantes de alta produção consomem. Existe uma alta correlação entre a IMS e a produção leiteira em vacas de leite (HARRISON et al., 1990). Porém efeitos negativos da IMS foram observados na reprodução, não apenas em gado leiteiro. Em novilhas de corte, foi reportado que um aumento na ingestão de alimentos anterior à IA diminuiu a sobrevivência embrionária (DUNNE et al., 1999). O decréscimo na eficiência reprodutiva em animais recebendo alto padrão nutricional pode ser devido à alterações nas concentrações hormonais circulantes. Há uma relação inversa entre os níveis de ingestão alimentar e P<sub>4</sub> plasmática periférica em ovelhas. O aumento da IMS leva a um aumento da taxa de metabolização de P<sub>4</sub> (PARR et al., 1993). De forma semelhante, o aumento do plano nutricional em porcas ovariectomizadas aumentou a metabolização de P<sub>4</sub> e também aumentou o fluxo sanguíneo para a veia porta hepática de maneira proporcional (PRIME; SYMONDS, 1993).

Um experimento foi realizado para estudar se o aumento do fluxo sanguíneo hepático, resultante da elevada taxa de ingestão, aumenta o metabolismo de  $P_4$  e  $E_2$  em vacas lactantes (SANGSRITAVONG et al., 2002). Esses autores observaram que ocorre um aumento agudo da metabolização de  $E_2$  e  $P_4$  em resposta à alimentação e esse fato foi aparentemente relacionado com mudanças agudas no fluxo sanguíneo hepático. Esse estudo também mostrou que, em vacas lactantes, o contínuo fornecimento de um bom plano nutricional leva, cronicamente ao aumento do fluxo sanguíneo hepático e à metabolização de  $P_4$  e  $E_2$ .

As concentrações de  $P_4$  circulantes são determinadas pelo balanço entre a produção de  $P_4$ , principalmente pelo CL, e pelo metabolismo de  $P_4$ , realizado principalmente pelo fígado. Em gado leiteiro, o volume do tecido luteínico é o primeiro fator determinante de produção de  $P_4$ . No entanto, discrepâncias entre o volume do CL e concentrações circulantes de  $P_4$  são geralmente devido ao alto metabolismo de  $P_4$ , resultante do aumento excessivo do fluxo sanguíneo no fígado. Por outro lado, se a produção de  $P_4$  aumenta devido ao aumento do volume luteínico, sem alterações no fluxo sanguíneo hepático, a  $P_4$  circulante irá aumentar (WILTBANK et al., 2011).

As diferenças nas concentrações circulantes de esteroides foram relatadas entre categorias: novilhas (SARTORI et al., 2004), vacas secas (BASTOS et al., 2010) e vacas em lactação (LOPEZ et al., 2005) e entre raças bovinas (*Bos taurus* e *Bos indicus*). Esses trabalhos atribuíram menores concentrações em vacas lactantes devido ao maior metabolismo hepático de esteroides que essas fêmeas apresentam durante a lactação. Além disso, as maiores concentrações endógenas de  $P_4$  em zebuínas pode explicar porque essa raça apresenta maior sensibilidade a dispositivos de  $P_4$  em protocolos para sincronização da ovulação.

Esse fato pode levar à hipótese de que a taxa de metabolização da  $P_4$  é maior nas novilhas taurinas e por isso, a concentração encontrada no plasma dessas novilhas é menor, mesmo possuindo um CL maior. Um

estudo do presente grupo esta sendo conduzido para confirmar qual (ou se) dessas hipóteses é válida.

## 2.4 DESVIO FOLICULAR

A seleção folicular é um termo usado em espécies monovulatórias para indicar que apenas um folículo adquire condição de dominante sobre os demais folículos (FORTUNE et al., 2001). Um aumento no FSH induz o recrutamento de um grupo de folículos dependentes de gonadotrofinas da reserva de folículos sensíveis às gonadotrofinas (VIÑALES et al., 1999). Por volta de dois a três dias após a emergência, um desses folículos alcança o status de dominante por desenvolver receptores de LH nas células da granulosa e por se tornar independente de FSH.

O maior folículo presente na onda folicular produz diversas substâncias que reduzem as concentrações de FSH abaixo do limiar necessário para sustentar os outros folículos dependentes de gonadotrofinas. Assim, a dominância alcançada pelo folículo potencialmente ovulatório induz a atresia em todos os outros folículos remanescentes que foram recrutados e que não obtiveram êxito na troca da dependência absoluta de FSH para LH (CAMPBELL, 1999). Na presença de níveis de  $P_4$  acima de 1 ng/ml, o FD entra em atresia, devido à alta amplitude e baixa frequência dos pulsos de LH e uma nova onda se inicia (GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989; WEBB et al., 1999). O FD somente irá ovular quando a concentração de  $P_4$  for baixa, em função da luteólise (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004). O FD, após a ovulação, passa por um processo de luteinização, formando o corpo lúteo que secreta  $P_4$ .

Quando o futuro FD emerge do grupo de folículos antrais recrutados, seu diâmetro aumenta continuamente e se sobressai como o maior folículo do grupo (FORTUNE et al., 2001). Foi descrito que em vacas taurinas, o futuro FD emerge 6 horas antes do que os outros folículos da

onda. Esta emergência antecipada resulta em uma vantagem para o tamanho deste futuro FD, antes do final da fase de crescimento, comum entre os folículos, e início da de desvio (GINTHER et al., 2003). Entretanto, em 3% dos casos, um folículo subordinado (FS) pode ser inicialmente maior do que o futuro FD, porém a taxa de crescimento tende a ser inferior, não alcançando o estágio definitivo (GINTHER et al., 1996).

Em fêmeas taurinas, estudos reportaram que o desvio folicular, em média, tem início por volta do dia 2,8 após a emergência folicular (10,7 horas antes da ovulação), quando o FD atinge em média 8,5 mm a 9,0 mm de diâmetro (GINTHER et al., 1996; SARTORI et al., 2001; BASTOS et al., 2010). Quando avaliado por categoria animal, as holandesas em alta lactação tiveram o desvio folicular quando o FD atingiu 9,8 mm e as novilhas, 8,3 mm (SARTORI et al., 2004).

Em novilhas e vacas zebuínas da raça Nelore, o período de desvio não difere dos taurinos, variando entre 2,4 a 2,9 dias após a ovulação, porém foi reportado que a seleção folicular em *Bos indicus* ocorre com diâmetros menores, quando o FD atinge entre 5 a 7 mm (FIGUEIREDO et al., 1997; SARTORELLI et al., 2005; GIMENES et al., 2008; BASTOS et al., 2010). Para novilhas bubalinas foi encontrado um valor semelhante para o momento do desvio, 2,6 dias após a ovulação com diâmetros de 7,2 mm para o FD e 6,4 mm para o FS (GIMENES et al., 2011).

### **2.4.1 Fatores Envolvidos na Seleção Folicular**

#### **2.4.1.1 Gonadotrofinas**

Um conceito clássico de regulação da função ovariana é de que fatores endócrinos, principalmente as gonadotrofinas (LH e FSH), estimulam o crescimento e a diferenciação luteínica e folicular (FORTUNE;

RIVERA; YANG, 2004). Sendo o desenvolvimento folicular ovariano dependente do suporte destas gonadotrofinas.

Independente do estágio de desenvolvimento folicular, a troca da dependência do FD de FSH (ADAMS *et al.*, 1992) para LH (KULICK *et al.*, 1999) ocorre devido à presença de receptores para LH-R nas células da granulosa. No final do período de dominância, isto é, próximo à ovulação ou na fase estática do FD anovulatório, concentrações circulantes de FSH começam a crescer (ADAMS *et al.*, 2008). Estas concentrações aumentam 1,5 a 2 vezes pelos próximos 2 dias e atingem o pico aproximadamente 12 a 24 horas, antes da emergência da próxima onda, quando o futuro FD está com 4-5 mm de diâmetro. Se o FD existente é removido (ablação folicular), o aumento dos níveis de FSH é iniciado dentro de 12 horas, resultando na emergência de uma nova onda folicular nas próximas 24 horas (BERGFELT *et al.*, 1997).

Em bovinos da raça Holandesa, foi descrito que a seleção do FD associou-se com a troca da dependência de FSH para LH (FORTUNE, *et al.*, 2001; GINTHER *et al.*, 2001). Receptores para FSH estão presentes apenas nas células da granulosa, enquanto que receptores para LH estão localizados tanto nas células da granulosa quanto nas da teca. Foi descrito que o FD expressa mais receptores para LH na granulosa do que os FS e, portanto é capaz de direcionar a dependência de gonadotrofinas para o LH durante a escassez de FSH e continua a crescer enquanto que os subordinados regridem (ADAMS *et al.*, 2008).

No entanto, foi observado em taurinas que o FD após o desvio folicular não adquire capacidade ovulatória até que atinja 10 mm de diâmetro (SARTORI *et al.*, 2001). Em novilhas zebuínas, também foi reportado que o FD somente adquiriu capacidade ovulatório após o desvio, quando os FDs atingiram, em média 7,6 mm. Já em búfalas a capacidade ovulatória ocorreu após o desvio, com diâmetros a partir de 8,5 mm (GIMENES *et al.*, 2011).

Em vacas Nelore cruzadas, todas as isoformas de LH-R foram encontradas apenas quando os folículos alcançaram 7 mm de diâmetro,

sendo que a abundância aumentou de acordo com o tamanho (NOGUEIRA et al., 2007; MONTEIRO et al., 2009). Dessa forma, os dados obtidos em fêmeas bovinas e bubalinas sugerem que a expressão dos LH-R é uma consequência, e não uma causa do desvio folicular (revisado por SARTORI et al., 2010).

Em estudo realizado por Evans e Fortune (1997), a expressão de mRNA para receptores de gonadotrofinas e concentrações de enzimas esteroidogênicas foram observadas no futuro FD e FS, no dia 2 e no dia 3 da primeira onda folicular. Os autores reportaram que no dia 2, a diferença de diâmetro entre os folículos foi de 1 mm, não sendo encontradas diferenças nos níveis de mRNA para receptores de gonadotrofinas ou de enzimas. No entanto, as análises do dia 3, quando o FD estava 3 mm maior que o maior subordinado e produzindo maiores concentrações de E<sub>2</sub> do que no dia 2, os autores encontraram diferenças nas expressões de mRNA. As expressões tanto de LH-R quanto de 17-hidroxiase foram maiores na teca interna e as expressões de FSHr e aromatase foram maiores nas células da granulosa do FD vs. FS. Os autores não encontraram expressão de LH-R nas células da granulosa do FD, sugerindo que esta aquisição deva ocorrer em estágios tardios na diferenciação do FD. Já outros estudos apontam o surgimento de LH-R nas células da granulosa ao redor do período de seleção do FD, quando o diâmetro encontra-se entre 8 e 9 mm (WEBB et al., 1999). Diversas isoformas de LH-R podem ser expressas nas células da teca e da granulosa em momentos diferentes do crescimento folicular (SIMÕES et al., 2010), o que poderia explicar a incongruência desses achados.

#### 2.4.1.2 Ambiente Intrafolicular: esteroides e sistema IGF

Um dos estágios do desenvolvimento folicular que depende de mudanças no ambiente intrafolicular ocorre no início do crescimento. Este

início esta relacionado com a comunicação oócito e células do *cumulus*. Sinais vindos do oócito causam a diferenciação de subtipos de células da granulosa, fazendo com que estas sigam um caminho de desenvolvimento diferente daquelas que compõem as células da granulosa murais (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004). O ambiente intrafolicular também está envolvido na regulação da etapa crítica da transição entre o final do desenvolvimento folicular e a seleção do FD.

A seleção do FD está associada com a diminuição das concentrações sanguíneas de FSH durante os primeiros três dias da onda, aumento das concentrações circulantes de E<sub>2</sub>, aumento de IGF-I e aumento na expressão de receptores de LH nas células da granulosa (SARTORI *et al.*, 2001). O aumento gradual de tamanho do FD leva a um aumento das concentrações de E<sub>2</sub>, de androstenediona e de inibina produzidos por ele (revisado por FORDE *et al.*, 2011).

#### 2.4.1.2.1 Estradiol

Foi demonstrado que o FD possui maiores concentrações de E<sub>2</sub> no fluido folicular (FF) do que os FS da mesma onda (EVANS; FORTUNE, 1997; FORTUNE, 1994; MIHM *et al.*, 2000). Dois dias após, isto é, no dia 5 do ciclo, o folículo morfologicamente dominante possui maior concentração de E<sub>2</sub> no FF quando comparado aos níveis inferiores apresentados pelos subordinados (BADINGA *et al.*, 1992).

Em ondas não ovulatórias, quando o FD se desenvolve durante a fase luteínica, as altas concentrações de E<sub>2</sub> produzidas pelo FD não são sustentadas (FORTUNE, 1994) e acabam diminuindo, levando a um aumento transitório de FSH (GINTHER *et al.*, 2000). No entanto, se a luteólise ocorrer durante o desenvolvimento do FD, o aumento de E<sub>2</sub> é contínuo, ou não ocorre diminuição, e os níveis no FF rapidamente aumentam para níveis pré-ovulatórios superiores a 1 µg/ml (FORTUNE;

HANSEL, 1985; BRIDGES; FORTUNE, 2003). Esses fatos indicam uma característica chave da síntese de E<sub>2</sub> no processo de dominância folicular. Porém, análises de mRNAs de receptores de gonadotrofinas e de enzimas esteroidogênicas intrafoliculares não revelaram quais mudanças este aumento de E<sub>2</sub> folicular desencadeiam (FORTUNE; HANSEL, 1985; EVANS; FORTUNE, 1997).

#### 2.4.1.2.2 Sistema IGF

Ginther et al. (2001) verificaram que as concentrações intrafoliculares de IGF-I livre não diferiram entre os dois maiores folículos antes do desvio folicular. Entretanto, após este período, o FD apresentou níveis mais elevados de IGF-I do que o maior subordinado. Ainda sugere que, a diferença de concentração de IGF-I entre os folículos ovarianos é o estopim do desvio folicular e conseqüentemente, dos mecanismos de seleção folicular (revisado por BEG; GINTHER, 2006). Adicionalmente, há indícios de que a indução dos receptores de LH pode ser, ao menos em parte, mediada pelo IGF-I, pois se demonstrou que a limitação na produção de IGF-I impede a dominância folicular e o desenvolvimento folicular além de 8 mm (CHASE *et al.*, 1998).

Corroborando com essas evidências, outros trabalhos também sugerem que mudanças intrafoliculares no sistema IGF do futuro FD são peças críticas da seleção de um folículo dentre o grupo recrutado de tamanho similar para crescimento, diferenciação e potencial ovulações futuras (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004). O sistema IGF ovariano é complexo, possuindo dois ligantes, dois receptores, seis proteínas ligadoras (IGFBPs) e pelo menos, uma protease de proteína ligadora de IGF (PAPP-A; revisado por LUCY, 2001).

Todos esses componentes fazem com o que o suprimento de IGF-I no folículo seja controlado sem a intervenção do eixo hipotalâmico. Assim,

a atividade do IGF-I intra-ovariana é regulada principalmente pelas IGFBPs, indicando que é a biodisponibilidade e não a concentração total que é alterada durante a foliculogênese. Neste estudo, Mazerbourg et al. (2003) relataram que em vacas taurinas, as concentrações intrafoliculares de IGFBPs foram menores em folículos de 1 a 2 mm de diâmetro quando comparados aos folículos pre-ovulatórios e que as concentrações destas aumentaram a medida que os folículos tornavam-se atresícos. Além desses achados, os autores observaram que as baixas concentrações de IGFBPs em folículos crescentes são provavelmente causadas pelas elevadas taxas de degradação proteolítica das IGFBPs feita pela PAPP-A.

Em bovinos, foi descrito que a expressão de mRNA para a PAPP-A nas células da granulosa, *in vitro*, é maior em folículos ovulatórios e correlaciona-se positivamente com concentrações de aromatase e LH-R (MAZERBOURG et al., 2001). Outros trabalhos também reportaram que a atividade da PAPP-A é maior nos FD do que nos FS entre os dias 2 e 3 da primeira onda folicular, sendo que os níveis de atividade correlacionaram positivamente com E<sub>2</sub> e negativamente com as IGFBPs (RIVERA; FORTUNE, 2003).

#### 2.4.1.2.3 Nutrição e seleção folicular

Além das interações entre células do *cumulus* e oócito, sabe-se que características do fluido folicular (FF) também são afetadas pela condição fisiológica da fêmea, por exemplo, nutrição. Tanto o estágio do folículo (tamanho, fase de atresia ou de crescimento) como as características do FF influenciam na qualidade dos oócitos (LEROY *et al.*, 2004).

Uma das funções do IGF é promover a síntese de E<sub>2</sub> em folículos antrais. Contrariamente, algumas IGFBPs podem ter efeito negativo sobre o IGF, prevenindo a ligação com os receptores. Já as PAPP-A quebram as IGFBPs, permitindo que o IGF se ligue ao receptor. Assim, mudanças em

qualquer um dos componentes deste sistema pode potencialmente afetar o desenvolvimento folicular (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004).

A insulina e os IGFs são essenciais para desencadear e manter o crescimento folicular, pois participam de mecanismos reguladores das células foliculares e a formação do CL, estimulando a esteroidogênese no FD e a proliferação das células da granulosa. O IGF ainda atua sinergicamente com o FSH e LH regulando a proliferação e a diferenciação das células da granulosa e da teca (ARMSTRONG et al., 2002). Além disso, o aumento do crescimento folicular pode ser influenciado por maiores concentrações de glicose para as células foliculares, induzido pela insulina.

Britt (1994) relatou que folículos que cresceram durante o período de balanço energético negativo, durante o pós-parto precoce em vacas de leite, poderiam ser afetados por mudanças metabólicas desfavoráveis e por isso, poderiam conter oócitos incompetentes. As concentrações sanguíneas de IGF-I se mostraram reduzidas durante um severo balanço energético negativo (LUCY, 2008) e assim, o sistema IGF pode transmitir estas informações metabólicas para o folículo.

Como dito anteriormente, o IGF-I é um potente estimulador do crescimento folicular e da secreção de  $E_2$  (MAZERBOURG et al., 2003) e parece ser também, essencial para uma foliculogênese normal e subsequente seleção folicular (MIHM; EVANS, 2008). Assim, em condições fisiológicas normais, a atividade do IGF-I no folículo é mantida sobre o controle rigoroso dos sistemas intrafoliculares que previnem supra-atividade do IGF-I folicular. Durante o balanço energético negativo, baixo IGF-I inibe a foliculogênese, mas durante o balanço energético positivo, elevado IGF-I aparenta ter mínimo efeito no folículo por conta da inibição intrafolicular realizada pelas IGFBPs e pelo sequestro do receptor de IGF-I pelo IGF-II (SCARAMUZZI et al., 2011).

Um modelo para ilustrar a sequência de eventos que ocorre antes do início do desvio de diâmetro durante a seleção folicular foi descrita em revisão feita por BEG; GINTHER (2006) e no trabalho de Scaramuzzi et al.

(2011). Em bovinos, a manutenção ou o aumento do IGF-I livre, ocorre via ativação do sistema IGF pelas PAPP-A e, conseqüente aumento do E<sub>2</sub> e dos LH-R no futuro FD. Ao mesmo tempo, as concentrações de IGF-I livres diminuem no futuro FS. As mudanças intrafoliculares no futuro FD aparentemente aumentam o desenvolvimento do maior folículo à diminuição do FSH e ao aumento do LH. Os demais folículos em crescimento na onda possuem a mesma capacidade de dominância, porém não alcançaram o mesmo nível de complexidade antes de serem negativamente afetados pelas mudanças nas concentrações de gonadotrofinas. Assim, o maior folículo, agora sozinho, continua a crescer e se torna dominante.

## 2.5 FATORES QUE INTERFEREM NO PADRÃO DE ONDAS FOLICULARES ENTRE BOVINOS E BUBALINOS

Um determinado padrão de número de ondas foliculares pode ter implicações importantes no manejo reprodutivo de um rebanho, por exemplo, diversos trabalhos associam o padrão de ondas foliculares com a fertilidade (AHMAD et al., 1997; TOWNSON et al., 2002; BLEACH; GLENCROSS; KNIGHT, 2004; CUMMINS et al., 2012). Identificar os fatores associados com esses padrões pode fornecer importantes informações aos mecanismos controladores da onda folicular e ter implicações importantes para um correto manejo reprodutivo e no desenvolvimento de efetivos protocolos de sincronização e de superovulação ovariana.

Ao se fazer o levantamento dos dados referentes às disparidades entre taurinos, zebuínos e bubalinos, pode-se observar que o padrão do número de ondas foliculares por ciclo correlaciona-se com grande parte das variáveis fisiológicas estudadas. Por esse motivo, faz-se necessário separar e ressaltar os possíveis fatores endócrinos, metabólicos e

fisiológicos que estão envolvidos na determinação do número de ondas que uma novilha ou vaca apresentará.

Foi demonstrado que o padrão de ondas foliculares tende a se repetir num mesmo indivíduo por ciclos consecutivos (novilhas Brahman: RHODES; DE'ATH; ENTWISTLE, 1995); novilhas e vacas Nelore: (FIGUEIREDO *et al.*, 1997) independente da estação do ano ou da idade de novilhas; novilhas *Bos taurus*: (JAISWAL *et al.*, 2009). Porém, outros trabalhos relataram que o padrão de ondas, num mesmo indivíduo, pode alternar entre ciclos de 2, 3 e até 4 ondas (novilhas *Bos taurus*: PRICE; CARRIÈRE, 2004; SICHTAR *et al.*, 2010).

### **2.5.1 Número de ondas e fase luteínica**

Em 2011, Boer *et al.*, na tentativa de investigar quais mecanismos seriam possíveis candidatos na regulação do número de ondas por ciclo, desenvolveram um modelo matemático do ciclo estral bovino. Esses autores observaram que diferenças no número de ondas em ciclos naturais podem ocorrer devido às mudanças nos mecanismos regulatórios do período de duração da fase lútea e da taxa de crescimento folicular. Porém, como esse estudo baseou-se apenas em modelos matemáticos, as causas para tais mecanismos regulatórios não foram apontadas. O que os autores puderam concluir é que a mudança da duração do ciclo é o resultado e não a causa na mudança do padrão de ondas.

As correlações entre o número de ondas foliculares com a duração do período luteínico, as concentrações de  $P_4$  e o tamanho do CL são divergentes (GINTHER; KNOFF; KASTELIC, 1989; BARUSELLI *et al.*, 1997; ALVAREZ *et al.*, 2000; VASCONCELOS *et al.*, 2001), sendo que destes estudos não explicou-se qual o possível mecanismo envolvido entre longevidade do CL e número de ondas foliculares

### **2.5.2 Número de ondas e nutrição**

Vários estudos demonstraram que a nutrição apresenta papel importante na reprodução de ruminantes, pois alterações nutricionais podem influenciar diretamente o desempenho reprodutivo (MURPHY *et al.*, 1991; RHODES; DE'ATH; ENTWISTLE, 1995; WEBB *et al.*, 2004). Foi relatado que o estado nutricional e metabólico pode alterar os padrões de crescimento folicular, parâmetros endócrinos e atividade secretória do útero de bovinos (LEROY *et al.*, 2008). Estudos realizados em novilhas taurinas sugeriram um possível efeito do consumo alimentar sobre o número de ondas foliculares durante o ciclo estral (MURPHY *et al.*, 1991). Nele, os autores demonstraram que restrições na dieta reduziram o diâmetro máximo e a persistência do FD e tenderam a aumentar a proporção de ciclos estrais com 3 ondas foliculares. Outro grupo, estudando o efeito do consumo alimentar na reprodução de novilhas zebuínas (MOLLO *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2008) não observou tal efeito no padrão de ondas foliculares, porém observaram que nas dietas com restrição alimentar, a taxa de crescimento do folículo ovulatório foi menor. Os autores sugeriram que esses resultados podem estar associados com as maiores concentrações de insulina observada no grupo de alta ingestão alimentar. No entanto, não foram observadas diferenças nas concentrações de IGF-I total.

### **2.5.3 Número de ondas e dominância do Folículo Dominante da primeira onda**

Outra possível regulação do padrão de ondas foliculares e, conseqüentemente, na duração do ciclo estral em bovinos pode estar

relacionada ao desenvolvimento do FD da primeira onda folicular (FD1). Em trabalho publicado por Jaiswal et al (2009) em novilhas cruzadas Hereford, o FD1 num ciclo com duas ondas, apresentou maior duração do período de dominância que o mesmo folículo de um animal com 3 ondas. Além disso, esses autores observaram que o início da regressão do FD1 no padrão de duas ondas ocorreu mais tardiamente do que no padrão de 3 ondas e foi associado com atraso do diâmetro máximo do FD da segunda onda, assim como foi associado à antecipação do início da luteólise.

Algumas descobertas sustentam esse fato. Primeiro, um maior tempo de atividade do FD retarda o pico de FSH e subsequente emergência da segunda onda (SIROIS e FORTUNE, 1988; GINTHER; KNOPF; KASTELIK, 1989; SARTORI et al., 2004). Já curtos períodos de atividade da dominância (ADAMS et al., 1992) ou remoção dos fatores inibitórios do FD (BADINGA et al., 1992) aceleram a emergência da onda seguinte. Segundo, a depleção da população visível de folículos nos ovários, por volta do dia 10 do ciclo, aumentam a duração da fase luteínica (ARAÚJO et al., 2009), enquanto que FD com alta capacidade estrogênica exercem efeito negativo na duração do CL (SANTOS et al., 2009). E terceiro, um curto período de dominância do FD1 causado por restrição alimentar (MURPHY et al., 1991; RHODES; DE'ATH; ENTWISTLE, 1995) ou estresse térmico (GUZELOGLU et al., 2001), resultaram na antecipação da emergência da segunda onda folicular (DRIANCOURT, 2001) e aumento na predominância de ciclos com 3 ondas.

Em novilhas pré-púberes e prenhes, as mudanças no desenvolvimento folicular são evidentes. O aumento progressivo dos intervalos entre ondas durante o período pré para pós-púbere foi associado ao aumento progressivo do diâmetro do FD (EVANS; ADAMS; RAWLINGS, 1994). Em estudo que comparou novilhas pós-púberes de diferentes idades (14 a 17 meses e 18 a 24 meses de idade) foi observada prevalência de 3 ondas no grupo mais jovem e 2 ondas no grupo mais "velho" (JAISWAL et al., 2009). Além da redução do período de

dominância, foi relatado que prevalência de padrões de 4 ondas em *Bos indicus*, quando comparada com *Bos taurus*, pode ser consequência do menor diâmetro alcançado pelo FD1 em *Bos indicus*. (revisado por BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003; BARUSELLI; GIMENES; SOUSA, 2007; SARTORI et al., 2010). Em outro estudo feito em fêmeas zebuínas (VIANA et al., 2010), a redução do diâmetro do FD1, duração da dominância e intervalo entre ondas foliculares foi associado com o aumento do número de ondas por ciclo estral.

#### **2.5.4 Número de ondas e Concentração de Esteroides**

As hipóteses sugeridas sobre o efeito da dominância do FD da primeira onda acarretam em investigações endócrinas sobre a síntese, liberação e metabolismo dos hormônios esteroides e de fatores de crescimento ligados à dinâmica ovariana. Diferenças nas concentrações de  $P_4$  durante o desenvolvimento folicular apresentaram grande impacto no crescimento folicular e na concentração de  $E_2$  (CERRI et al., 2011). Nesse estudo, baixas concentrações de  $P_4$  circulantes durante o crescimento folicular promoveram o aumento do diâmetro do folículo ovulatório e o aumento nas concentrações de  $E_2$  durante o proestro. Consequentemente, o diâmetro do CL formado foi também maior em vacas do grupo baixa versus alta  $P_4$ . No entanto, curiosamente, as concentrações de ambos os grupos (alta vs. baixa  $P_4$  no período folicular) ao sexto dia pós IA, foram semelhantes.

Estudos anteriores (VASCONCELOS et al., 2001; Cerri et al., 2009) relatam que a ovulação dos folículos maiores foi positivamente relacionada com as concentrações de  $P_4$  na primeira metade do ciclo estral subsequente. Nesses estudos, os folículos atingiram maior diâmetro devido a um período maior de crescimento folicular, diferente do delineamento de crescimento folicular sobre diferentes concentrações de

P<sub>4</sub>. Considerando essas observações, Cerri et al. (2011) sugeriram que a maturidade ou a idade dos folículos ovulatórios e não somente o diâmetro, é influenciada pela capacidade esteroidogênica do CL resultante.

A P<sub>4</sub> e o E<sub>2</sub> são os hormônios principais para desencadear a cascata luteolítica, via regulação da expressão de receptores de P<sub>4</sub>, receptores de E<sub>2</sub> e receptores de ocitocina (ARAÚJO et al., 2009; SANTOS et al., 2009). A baixa exposição de P<sub>4</sub> no endométrio pode promover liberação prematura de PGF, o que pode ser causado pela expressão insuficiente de receptores de P<sub>4</sub> e consequente assincronia da expressão de receptores de E<sub>2</sub> e de ocitocina no endométrio (GARVERICK *et al.*, 1992). No estudo publicado por Cerri et al. (2011), as baixas concentrações de P<sub>4</sub> durante o período de desenvolvimento folicular induziram prematura expressão de receptores de E<sub>2</sub> no útero, alta liberação uterina de PGF e aumento das chances de uma luteólise prematura. Outros autores também sugeriram que baixas concentrações de E<sub>2</sub> no período de pró-estro podem levar à expressão insuficiente de receptores de P<sub>4</sub> no início do ciclo subsequente e consequente síntese prematura de PGF (MANN; LAMMING, 2000). No entanto, o endométrio deve sofrer exposição tanto de P<sub>4</sub> quanto de E<sub>2</sub> no ciclo anterior para que o momento exato da cascata luteolítica aconteça, sem prejudicar o desenvolvimento folicular.

Um modelo fisiológico foi proposto por Araújo et al. (2009) para o desencadeamento da luteólise em ruminantes. Pulsos de ocitocina são liberados pela hipófise posterior e durante a luteólise, estes pulsos são amplificados pela ocitocina liberada pelo CL. Após o endométrio adquirir receptores de ocitocina, a secreção de PGF é estimulada por esses pulsos de ocitocina, após esta se ligar ao seu receptor. A aquisição da responsividade à ocitocina pelo epitélio endometrial parece depender da ação sincrônica de P<sub>4</sub> e E<sub>2</sub> e seus respectivos receptores. Durante o início da fase luteínica até a metade, a expressão de receptores E<sub>2</sub> é suprimida no endométrio, provavelmente pela ação inibitória das concentrações crescentes de P<sub>4</sub>. A partir do dia 12 até o dia 16 do ciclo, a quantidade de receptores de P<sub>4</sub> cai radicalmente, enquanto que os receptores de E<sub>2</sub>

.....

umentam simultaneamente (CERRI et al., 2011) em parte pelo estímulo do próprio  $E_2$  em aumentar a expressão de seus receptores. Adicionalmente, a "ativação" dos receptores de  $E_2$  uterinos pelas concentrações de  $E_2$  circulantes e foliculares estimula a síntese de receptores de ocitocina no endométrio, com subsequente secreção de PGF induzida por ocitocina, pelo útero.

Para Araújo et al. (2009), o momento entre a presença de um FD ativamente liberando  $E_2$  e a responsividade do útero a esse  $E_2$  parece ser o fator determinante na duração da fase luteínica. Assim, vacas com 3 ondas foliculares tiveram interrupção da secreção de  $E_2$  do segundo FD antes da aquisição da responsividade uterina ao  $E_2$ . Assim, o momento da luteólise é atrasado, não por conta do atraso na aquisição de resposta ao  $E_2$  (na verdade é a consequência), mas por causa das insuficientes concentrações de  $E_2$  circulante até que o terceiro FD produza  $E_2$  suficiente para ativar a cascata luteolítica. Essa conclusão foi baseada no modelo de "turnover" da inibição da expressão de receptores de  $P_4$  para a estimulação de receptores de  $E_2$  e de ocitocina no endométrio de bovinos, por volta do dia 12 do ciclo (MANN; PAYNE; LAMMING, 2001).

Outro estudo (OKUMU *et al.*, 2010), corroborando em parte com os já citados, mostrou que o mRNA de receptores de  $P_4$  e sua tradução diminuíram e o mRNA de receptores de  $E_2$  aumentaram com a progressão do ciclo estral. Também nesse estudo, foi demonstrado que as concentrações de  $P_4$  sanguíneas no início do ciclo estral podem alterar tanto a expressão dos receptores de  $P_4$  quanto de mRNA de receptores de  $E_2$  no endométrio durante a metade da fase luteínica.

Como descrito, diversas são as variáveis envolvidas na foliculogênese e no desenvolvimento luteínico. As fêmeas bovinas e bubalinas possuem resposta única a essas variáveis, de acordo com seu fenótipo e seu metabolismo. Dessa forma, faz-se mais necessário minimizar variáveis que podem ser controladas, como a nutrição e ambiente a fim de detectar demais respostas que só dependem de como aquela fêmea, ou aquela categoria de fêmeas irá responder. A partir

desses resultados, pode-se então, supor com um pouco mais de precisão, o desenvolvimento folicular e luteínico de bovinas e bubalinas, para posterior incrementar a aplicação das biotecnologias da reprodução, criadas especificamente para tais fêmeas.

### 3 HIPÓTESE

Novilhas de grupos genéticos diferentes, como *Bos taurus*, *Bos indicus* e *Bubalus bubalis*, apresentam características únicas na fisiologia reprodutiva do ciclo estral quando avaliadas temporalmente e sob as mesmas condições de manejo nutricional.

Sobre as diversas características da fisiologia reprodutiva do ciclo ovulatório nos três grupos genéticos, as hipóteses são:

- Duração do Ciclo Ovulatório: novilhas taurinas e bubalinas apresentam a mesma duração do ciclo estral e zebuínas apresentam ciclo ovulatório de maior duração
- Número de Folículos Presentes no Ovário inferiores a 5 mm no dia da primeira e segunda ovulações: novilhas zebuínas apresentam maior número de folículos no ovário nos dias da primeira e segunda ovulações quando comparados às novilhas taurinas e estas, maiores, quando comparadas às novilhas bubalinas e possuem maiores concentrações de IGF-I total e insulina no plasma.
- Número de Ondas Foliculares por Ciclo Estral: novilhas zebuínas apresentam maior número de ondas foliculares por ciclo ovulatório quando comparadas às novilhas taurinas e bubalinas.
- Diâmetro dos Folículos Dominantes: novilhas taurinas apresentam maior diâmetros de folículos dominantes em cada onda folicular e no desvio folicular.
- Novilhas taurinas apresentam maior diâmetro do CL e maior concentração de  $P_4$  durante o ciclo ovulatório.
- O desvio folicular ocorre no mesmo momento, após a ovulação, para as três raças, sendo que as taurinas apresentam maiores diâmetros.
- Novilhas taurinas e bubalinas possuem maior duração da dominância do folículo dominante da primeira onda.

- As concentrações de P4 e Testosterona são maiores em novilhas zebuínas quando comparadas a novilhas taurinas e bubalinas.
- A taxa de crescimento folicular de novilhas taurinas é maior do que em novilhas zebuínas e bubalinas.
- O dia da luteólise ocorre mais tardiamente no ciclo ovulatório em novilhas zebuínas do que em novilhas taurinas e bubalinas.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Descrever o crescimento e desenvolvimento folicular e luteínico em novilhas taurinas (*Bos taurus*), zebuínas (*Bos indicus*) e bubalinas (*Bubalus bubalis*).

Determinar o momento e o diâmetro dos folículos dominante e subordinado no desvio folicular em novilhas taurinas, zebuínas e bubalinas.

Determinar as concentrações de progesterona, testosterona, insulina (plasma) e IGF-I (plasma e fluido folicular) em momentos específicos (folicular e luteínico) do ciclo ovulatório e desvio folicular.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a dinâmica folicular em taurinos, zebuínos e bubalinos quanto:

1. Duração do ciclo ovulatório.
2. Número de ondas foliculares.
3. Número de folículos presentes no ovário no momento da emergência da primeira onda folicular.
4. Dia da emergência folicular de cada onda folicular.
5. Taxa de crescimento do FD de cada onda, diâmetro do CL e da P<sub>4</sub>.
6. Diâmetros dos FD de cada onda folicular.

7. Diâmetro do CL para cada dia e diâmetro máximo.
8. Dia da luteólise.
9. Concentrações plasmáticas de P4, Testosterona, insulina e IGF-I

Avaliar o momento do desvio folicular em taurinos, zebuínos e bubalinos quanto:

1. Diâmetros dos futuros FD e FS no momento da ovulação.
2. Taxas de crescimento do FD e FS até o momento do desvio.
3. Diâmetro do FD e FS no desvio.
4. Momento do desvio folicular em dias após a ovulação.
5. Concentrações plasmáticas de insulina e IGF-I e de IGF-I no FF.

## 5 MATERIAL E MÉTODO

### 5.1 ANIMAIS E LOCAL DO EXPERIMENTO

Foram utilizadas 15 novilhas da raça Holandesa, em média,  $430 \pm 21,11$  kg e idade entre 24 e 30 meses, 11 novilhas da raça Gir, pesando  $358,09 \pm 46,5$  kg, em média, e idade entre 18 e 24 meses e 16 novilhas bubalinas da raça Murrah, com peso médio de  $546,1 \pm 35,12$  kg com 36 meses de idade. Os animais foram alocados no Departamento de Reprodução Animal da FMVZ, Campus da USP em Pirassununga, entre maio e agosto de 2010.

Durante o experimento, as fêmeas foram mantidas em um mesmo piquete de capim *Brachiaria decumbens* e foram suplementadas com 2 a 2,5 kg de concentrado comercial por animal (Apêndice A) e 20 kg de cana de açúcar picada por animal, duas vezes ao dia, distribuídos em três cochos. O espaço de cocho para cada animal foi de 0,6 a 0,8 m. As fêmeas tiveram acesso livre à água e ao sal mineral. A dieta foi calculada de acordo com as exigências descritas pelo NRC 2001 para dieta de manutenção para novilhas (Apêndice A). O controle do peso corporal foi registrado por semana, durante o período de experimento (Apêndice B). O manejo sanitário foi realizado de acordo com as normas do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

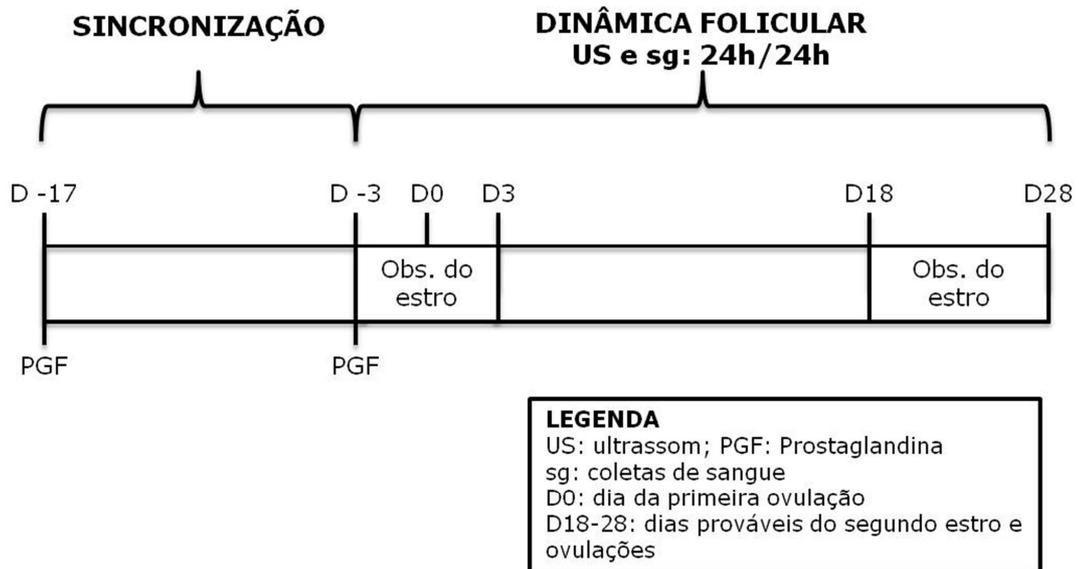
Para assessorar na detecção do estro das bubalinas e taurinas foram utilizados, respectivamente, dois búfalos e um touro Jersey previamente esterilizados pela técnica de epididimocaudectomia.

## 5.2 MANEJO REPRODUTIVO PARA EXAMES ULTRASSONOGRÁFICOS E COLETAS DE SANGUE

As novilhas foram sincronizadas utilizando duas injeções intramusculares de prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF; D-cloprostenol, 150µg IM, Prolise<sup>®</sup> Tecnopec, São Paulo, SP), com 14 dias de intervalo. No momento das administrações de PGF foram realizadas coletas de sangue e a partir da segunda dose de PGF, as fêmeas foram submetidas ao exame ultrassonográfico dos ovários (US; Aloka<sup>®</sup> SSD-500 Micrus, 7,5MHz), para identificar o momento da primeira ovulação.

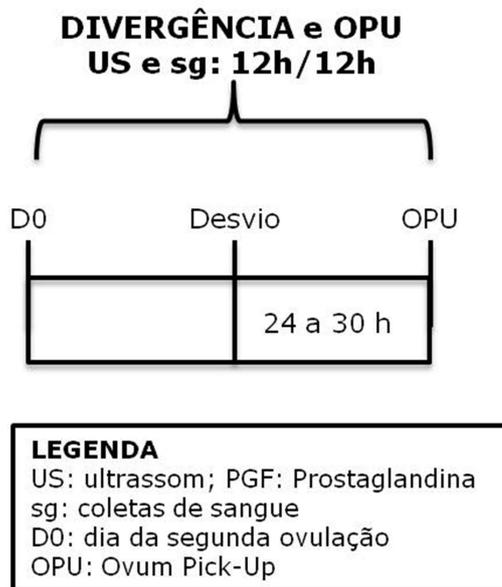
O estro das novilhas foi detectado tanto por meio de observação visual como pelo uso do adesivo Estrotect (Estrotect<sup>™</sup>, Rockway Inc., WI, EUA). O adesivo foi afixado sobre a região sacral das novilhas, após limpeza da região. A detecção visual ocorreu duas vezes ao dia (6:00 am e 18:00 pm, durante uma hora) e em duas etapas diferentes, correspondentes à primeira ovulação e a segunda ovulação, respectivamente. No EXPERIMENTO 1 (Figura 1), a fixação dos adesivos e as observações de estro iniciaram após a segunda administração de PGF e durou até que todos os animais ovulassem (Dia 0 - D0). No EXPERIMENTO 2 (Figura 2), a fixação dos adesivos e as observações iniciaram a partir do dia 18 do ciclo estral, após a primeira ovulação (D0), e perdurou até o momento da segunda ovulação.

Figura 1 - Modelo experimental gráfico dos exames ultrassonográficos e das coletas de sangue do EXPERIMENTO 1



Fonte: BALDRIGHI, J.M. (2013)

Figura 2 - Modelo experimental gráfico dos exames ultrassonográficos e das coletas de sangue do EXPERIMENTO 2



Fonte: BALDRIGHI, J.M. (2013)

### 5.3 EXPERIMENTO 1

#### 5.3.1 Exames ultrassonográficos

A partir da segunda dose de PGF, as novilhas foram submetidas a exames ultrassonográficos diários, via transretal, das 8:00 às 12:00 horas da manhã, para avaliação da dinâmica folicular. O mesmo aparelho de ultrassom foi utilizado com transdutor transretal de potência de 7,5MHz. Os exames foram realizados pelo mesmo operador para minimizar erros de manejo e interpretação.

Os ovários foram avaliados, por ultrassonografia, durante um ciclo ovulatório, isto é, entre duas ovulações consecutivas (intervalo inter-ovulatório – IIO). A imagem foi congelada para determinar as respectivas dimensões foliculares e luteínicas, desenhando os diagramas com a posição de cada folículo e CL no ovário (Figura 1). Foram registrados folículos de diâmetro igual ou superior a 3 mm.

Para as novilhas Gir que não ovularam com o protocolo de pré-sincronização de PGF, foi realizado um protocolo de indução de ciclicidade de modo a “reativar” o ovário. Este protocolo foi realizado em seis novilhas para que pudessem ser utilizadas no Experimento 2 (Figura 2). Para isso, foi realizado protocolo hormonal (Apêndice C) para promover duas ovulações antes do início do experimento de Desvio. A primeira ovulação foi induzida por Cipionato de Estradiol (ECP) e a segunda pela PGF, causando a lise do CL após a primeira ovulação. Essa segunda ovulação foi programada para ocorrer por volta do dia 21 do ciclo estral das demais novilhas participantes.

### **5.3.2 Caracterização das ondas de crescimento folicular e crescimento luteínico**

#### 5.3.2.1 Intervalo Inter-Ovulatório e Ondas foliculares

O dia da ovulação foi definido como o dia 0 (início do Intervalo Inter-Ovulatório - IIO). O momento da ovulação foi definido quando o folículo dominante não foi mais visualizado no ovário. Os IIOs foram classificados nos seguintes grupos:

a) duas ondas foliculares, sendo a primeira com um folículo dominante anovulatório e a segunda com um folículo dominante ovulatório;

b) três ondas foliculares, sendo a primeira e a segunda onda com folículos anovulatórios e a terceira com folículo dominante ovulatório;

c) quatro ondas foliculares, sendo a primeira, segunda e terceira onda com folículos anovulatórios e a quarta onda com um folículo dominante ovulatório.

Para as três raças foi comparado:

a) duração do IIO (dias);

b) número de ondas foliculares no IIO;

c) número de folículos presentes na primeira onda de crescimento folicular no dia da primeira e da segunda ovulações (folículos de 3 mm).

### 5.3.3 Crescimento folicular

As mensurações foram feitas medindo-se o folículo, em imagem congelada no ultrassom, de maneira que fosse possível visualizar o maior diâmetro da esfera anecóica.

Para cada onda folicular foram observadas diferentes respostas da dinâmica folicular, dentre as quais, ressaltam-se:

- d) dia da emergência folicular da 2ª e 3ª ondas subsequentes;
- e) taxa de crescimento (mm/dia) do folículo dominante (FD);
- f) diâmetro (mm) máximo do FD;
- g) dia do diâmetro máximo do FD;
- h) persistência (dias) do FD, isto é, duração da dominância do FD de todas as ondas foliculares.
- i) diâmetro máximo do folículo ovulatório.

Para o cálculo das taxas de crescimento, cálculo do coeficiente de inclinação da reta (slope) foi feito em gráfico no Microsoft® Excel® 2011 para Mac, a partir dos diâmetros foliculares registrados diariamente.

O cálculo da persistência da dominância folicular foi feito a partir do dia da emergência folicular até a emergência da onda subsequente.

### 5.3.4 Crescimento luteínico

As mensurações foram feitas medindo-se o maior (a) e o menor (b) diâmetro dos CLs, formando um ângulo de 90 graus e calculando-se a média aritmética entre elas  $[(a+b)/2]$ . Essa média foi determinada como sendo o diâmetro do CL. A partir desta, calculou-se o volume dessa estrutura como se fosse uma esfera, isto é  $(3/4)*(\pi)*(raio)^3$ . O raio foi calculado dividindo-se o valor do diâmetro por 2. Nos casos de CL

cavitário, o volume da cavidade também foi mensurado e seu valor descontado do volume total do CL.

Em cada IIO foram avaliadas diferentes respostas da dinâmica luteínica, dentre as quais, ressaltam-se:

- a) a taxa de crescimento (mm/dia) do CL até o momento de platô;
- b) o volume do CL por dia de avaliação;
- c) o volume máximo (mm) do CL;
- d) duração da fase de crescimento do CL (dias);
- e) fase luteínica: persistência (dias) do CL até a luteólise;
- f) fase de regressão do CL.

As taxas de crescimento foram determinadas da mesma forma utilizada para os folículos. A determinação da fase luteínica baseou-se nas mensurações ultrassonográficas e nas concentrações plasmáticas de progesterona ( $P_4$ ) no plasma sanguíneo. A luteólise foi definida no dia em que a concentração da  $P_4$  plasmática e o volume do CL reduziram pelo menos 50% da média das quatro concentrações maiores e volumes maiores no ciclo, como descrito anteriormente (ARAÚJO et al., 2009).

## 5.4 EXPERIMENTO 2

### 5.4.1 Caracterização do momento de desvio folicular

A partir da segunda ovulação, todas as novilhas foram examinadas a cada 12 horas, por ultrassonografia transretal, para o acompanhamento da dinâmica folicular, a fim de detectar:

- a) o diâmetro (mm) do futuro FD e FS no momento zero, isto é, no dia da segunda ovulação;

- b) a taxa de crescimento (mm) do FD e FS até o desvio;
- c) o diâmetro (mm) do FD e do FS no desvio;
- d) o momento (horas após segunda ovulação) em que ocorreu o desvio.

Os ovários foram mapeados, registrando-se o diâmetro dos maiores folículos presentes no ovário após segunda ovulação. Retrospectivamente, os dois maiores folículos foram identificados e classificados como FD, o maior folículo presente e FS, o segundo maior folículo. O início da desvio folicular foi definido pelo fim da taxa de crescimento semelhante dos dois folículos. A cada doze horas, os diâmetros foram computados e os dados armazenados em gráficos do programa Microsoft® Excel® 2011 para Mac. O momento do desvio folicular foi identificado por dois métodos:

- visual: pelos gráficos, como o dia em que a taxa de crescimento diária do FD foi superior à taxa de crescimento diária do FS;
- matemático: mesmas observações gráficas feitas pelo método visual, acrescentado de modelo de regressão linear segmentada, para dois segmentos, descrito por Bergfelt et al. (2003).

Como descrito anteriormente por Gimenes et al. (2008), não foram encontradas diferenças no momento do desvio entre os dois métodos, portanto, no presente trabalho, ambos foram utilizados para identificar o momento da desvio folicular. Os dados foram normalizados para o dia do desvio visual.

## 5.5 COLHEITA DO MATERIAL PARA AVALIAÇÃO HORMONAL E BIOQUÍMICA

No Experimento 1, uma primeira amostra de sangue foi colhida no momento da primeira administração de PGF (D -17, Figura 1) e após a segunda administração (14 dias de intervalo, D -3, aproximadamente), os intervalos de colheita ocorreram a cada 24 horas. No Experimento 2, as

amostras foram coletadas a partir da segunda ovulação, a cada 12 horas, até que fosse identificado o momento do desvio folicular.

Em cada um desses períodos foram coletados 10 mL de sangue da veia jugular de cada fêmea. As amostras de sangue foram colhidas em tubos com anticoagulante (NaF+EDTA) e mantidas em gelo até o processamento. As amostras foram centrifugadas a 1500 x g por 30 minutos. O plasma foi então pipetado e acondicionado em criotubos e microtubos de centrifuga identificados por animal e dia em que a fêmea se encontrava no ciclo ovulatório, sendo armazenados em freezer a -20°C.

Para cada animal foram feitas 4 alíquotas. As alíquotas permaneceram armazenadas a -20°C, até o momento da realização das análises hormonais e bioquímicas.

### **5.5.1 Análises hormonais**

#### 5.5.1.1 Ensaio de Progesterona no Plasma

As dosagens de P<sub>4</sub> foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia do Curso de Medicina Veterinária / UNESP / Araçatuba. A P<sub>4</sub> plasmática foi mensurada desde o dia da segunda dose de PGF, diariamente, até o dia em que os animais ovularam pela segunda vez. Foi utilizado kit de radioimunoensaio (RIA) para P<sub>4</sub>, Coat – A – Count<sup>®</sup>, Siemens Medical Solution Diagnostic<sup>®</sup>, Los Angeles, CA, EUA. O protocolo utilizado seguiu as recomendações da *Diagnostic Product Corporation*. O coeficiente de variação intra-ensaio foi 0,32%.

#### 5.5.1.2 Ensaio de Insulina no Plasma

As análises de insulina foram realizadas pela técnica de RIA, utilizando o kit Insulina Coat – A – Count<sup>®</sup> (Siemens Medical Solution Diagnostic<sup>®</sup>, Los Angeles, CA, EUA), no Laboratório de Endocrinologia da UNESP / Araçatuba. Foram selecionadas amostras de duas fases do ciclo estral: fase folicular e fase luteínica. Para a fase folicular, foram utilizadas amostras de plasma de três dias consecutivos: um dia antes da ovulação, no dia da ovulação e um dia após a ovulação. Para a fase luteínica, foram utilizadas duas amostras de plasma de dois dias consecutivos e estas duas foram escolhidas no período de platô de P<sub>4</sub>, sendo a primeira amostra na metade do ciclo ovulatório de cada novilha e a outra amostra no dia seguinte. O protocolo utilizado seguiu as recomendações da *Diagnostic Product Corporation*. O coeficiente de variação intra-ensaio foi 4,34%.

#### 5.5.1.3 Ensaio de IGF-I total no Plasma e no Fluido Folicular

As análises de IGF-I foram realizadas no Instituto Butantan, no Laboratório de Biotecnologia Molecular da Dr Elizabeth A. L. Martins pela técnica de Ensaio de Imunoabsorção ligado à Enzima (ELISA). Foi utilizado o kit da R&D Systems<sup>®</sup>, Quantikine<sup>®</sup> ELISA. Duas fases de avaliação foram novamente escolhidas para as dosagens. A primeira luteínica, nas mesmas amostras realizadas para a dosagem de insulina e a segunda folicular, no dia em que a segunda ovulação foi detectada. Além desses dois períodos, o IGF-I foi dosado no plasma das novilhas no período que compreendeu o desvio folicular: 12 horas antes do momento do desvio, no momento que o desvio folicular foi detectado, 12 e 24 horas após o desvio e no fluido folicular. O protocolo utilizado seguiu as recomendações da *R&D Systems*<sup>®</sup>.

#### 5.5.1.4 Ensaio de Testosterona no Plasma

As dosagens de testosterona foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia do Curso de Medicina Veterinária / UNESP / Araçatuba. A testosterona plasmática foi mensurada desde o dia da segunda dose de PGF, diariamente, até o dia 13 após ovulação. Foi utilizado kit de radioimunoensaio (RIA) para P<sub>4</sub>, Coat - A - Count<sup>®</sup>, Siemens Medical Solution Diagnostic<sup>®</sup>, Los Angeles, CA, EUA. O protocolo utilizado seguiu as informações do fabricante. O coeficiente de variação intra-ensaio foi 4,34%.

#### 5.6 ASPIRAÇÃO FOLICULAR

Os FD foram aspirados 24 a 30 horas após o período de desvio folicular. As sessões de aspiração folicular foram realizadas com aparelho de ultrassom Aloka<sup>®</sup> SSD 900 equipado com transdutor endocavitário, micro-convexo de 7,5 MHz, adaptado a uma guia de biópsia para aspiração folicular. Foi conectado a este uma agulha descartável de 19 G e linha de aspiração de teflon de 0,1cm de diâmetro interno e 66 cm de comprimento. Todo o sistema, com as agulhas e os adaptadores para agulha e linha de aspiração totalizaram 1180 µl.

Esse sistema foi conectado a uma seringa de 5 ml. Foi aspirado um FD por fêmea por seringa. Para cada raça foi mensurado o diâmetro do FD antes de ser aspirado e o volume de fluido folicular (FF) recuperado na seringa. O sistema utilizado não foi lavado com nenhuma solução.

### 5.6.1 Separação e armazenamento do fluido folicular

Após colheita, o conteúdo aspirado foi colocado numa placa de Petri (35 mm) para procura do oócito oriundo do FD. Caso encontrado, o oócito de cada FD foi retirado do fluido folicular (FF). O volume do FF foi mensurado de forma aproximada com o auxílio de micropipeta. O FF foi então centrifugado a 1500 g por 10 minutos e o sobrenadante foi dividido em duas alíquotas em criotubos e congelados à -80°C.

## 5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis-resposta: IIO, número de folículos recrutados, número de ondas foliculares no IIO, taxa de crescimento folicular, dia da 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e ou 4<sup>a</sup> emergência, diâmetro do FD da 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> onda, diâmetro do folículo ovulatório, duração do período de dominância do FD da 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> onda, duração do período total e relativo de dominância, diâmetro máximo do CL no IIO, duração da fase de crescimento do CL, duração da fase de platô do CL, duração da fase luteínica, diâmetro do FD e FS no momento zero, diâmetro do FD e FS no desvio folicular, taxas de crescimento do FD e FS até o desvio e momento de desvio folicular foram analisadas por ajustes de modelos lineares mistos (PROC GLIMMIX do programa SAS for Windows 9.3), considerando no modelo estatístico o grupo genético (Holandesa, Gir e Búfala). A normalidade e a homogeneidade das variâncias dos dados foram verificadas pela análise de resíduos utilizando o *Guide Data Analysis* do SAS. Dados que não atenderam às premissas da análise estatística foram transformados em conformidade. As diferenças encontradas foram investigadas pelo "least square means" (LSMEANS), considerando significância quando  $P < 0,05$ . Para algumas variáveis não foram encontradas diferenças na ANOVA, porém mostraram-se diferentes

no teste de médias. Para essas variáveis resposta utilizou-se o resultado da comparação de médias (LSMEANS).

Para as variáveis não paramétricas foi utilizado o teste N-Parway Kruskal-Wallis e teste de comparação de médias Wilcoxon. Para avaliar a associação entre duas variáveis, foi realizado o teste de Correlação de Spearman.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os estudos da dinâmica folicular em bovinos iniciaram com trabalhos histológicos do ovário e progrediram após o advento do ultrassom. Diversos estudos foram feitos para desvendar os mecanismos fisiológicos envolvidos no ciclo estral, em parte para melhorar a produção de um rebanho. Devido a isso, os estudos focando a fisiologia e a endocrinologia da fêmea bovina cresceram ainda mais com o intuito de controlar este ciclo e fazê-lo responder às necessidades de um produtor.

Assim, as raças utilizadas como padrão foram as taurinas, devido à localização dos polos de pesquisa se situarem no hemisfério norte e as raças *Bos taurus* serem as mais adaptadas a climas temperados. Esses estudos foram realizados principalmente em gado de leite, com o objetivo de aumentar a reprodução e conseqüentemente a produção.

Com o passar dos anos e o desenvolvimento dos países tropicais, cresceu também a população de raças zebuínas, visto que estas foram, e ainda são, as mais adaptadas às condições ambientais entre os trópicos. Com o crescimento da população consumidora de produtos de origem animal e a conscientização ecológica, apareceu também a necessidade de melhorar a produção e a reprodução destes animais. Dessa forma, os resultados obtidos nas fêmeas taurinas começaram a ser aplicados no rebanho zebuínico. Porém, com o passar do tempo, pesquisadores e produtores de gado zebuínico e bubalino não encontravam os mesmos resultados produtivos apresentados no modelo taurino. A partir dessa problemática, foram iniciados os estudos feitos em novilhas e vacas zebuínas e, mais tarde, bubalinas, para desvendar quais seriam as diferenças fisiológicas entre estas raças e assim, conseguir adaptar e aplicar os conhecimentos anteriormente divulgados.

Com o descobrimento de algumas semelhanças e diferenças entre as raças apontadas, veio também o conhecimento de que o ciclo estral bovino e bubalino não é um acontecimento isolado que compreende

apenas o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, e sim resultado de diversas cascatas de eventos. Eventos estes multifatoriais como clima, alimentação, categoria reprodutiva, status produtivo, peso corporal e genética que atuam na dinâmica folicular favorável ou desfavoravelmente à foliculogênese e à reprodução.

Deste modo, este trabalho representa um grande avanço para o entendimento da dinâmica folicular de novilhas *Bos taurus*, *Bos indicus* e *Bubalus bubalis* já que os animais utilizados no experimento foram mantidos temporalmente, sob as mesmas condições de manejo, o que poderá contribuir para melhorar a eficiência dos protocolos hormonais utilizados na multiplicação de animais geneticamente superiores e no aumento do desempenho reprodutivo nestes rebanhos.

## 6.1 EXPERIMENTO 1: DINÂMICA FOLICULAR DO CICLO OVULATÓRIO

Os resultados com as médias e erro padrão da media das variáveis estudadas estão ilustrados nos Quadros 1 e Quadro 2, no Apêndice C. No texto, os valores foram discutidos, mas nem sempre especificados.

### 6.1.1 Comportamento sexual e primeira ovulação.

Após a segunda dose de PGF, somente as novilhas que ovularam participaram do experimento da Dinâmica Folicular. Todas as novilhas Holandesas foram detectadas em estro e ovularam (15/15). Em relação às outras duas raças, apenas 45,5% das novilhas Gir foram detectadas em estro e ovularam (5/11) e 56,3% das novilhas bubalinas foram detectadas em estro (9/16) e ao todo, 15 ovularam.

Segundo Mizuta (2003) e Lopez et al (2004) a duração do estro em *Bos taurus* é maior do que em *Bos indicus*, o que pode facilitar a detecção em taurinos. Porém, Lopez et al. (2004) relataram que, aproximadamente, 50% das vacas taurinas que ovularam foram detectadas em estro. Nesse estudo, os autores correlacionaram esse fato com variações metabólicas decorrentes da lactação, no caso, alta ou baixa produção de leite, visto que utilizaram primíparas e múltiparas. No presente estudo, todas as fêmeas utilizadas foram nulíparas, o que pode explicar a diferença na manifestação do estro.

Além do fator metabolismo, o estro também pode variar em situações de estresse. Wolfenson, Roth e Meidan (2000) divulgaram estudo do efeito do estresse térmico na manifestação do estro, já Sartori e Barros (2011) relataram alterações no comportamento sexual ligadas ao estresse de manejo intenso. Situação semelhante foi encontrada no presente estudo. Desde a primeira PGF, as fêmeas foram manejadas todos os dias, sem que nenhum procedimento fosse feito, somente para condicionamento dos animais. Porém, as novilhas Gir não responderam às duas administrações de PGF e quando foi iniciada a rotina diária das coletas de sangue e dos exames de ultrassom, bloquearam a ovulação, provavelmente devido ao estresse causado pelo manejo intenso.

Para contornar essa situação e poder utilizar estas novilhas Gir e a novilha holandesa que não ovulou no Experimento 2 de Desvio Folicular foi utilizado um protocolo hormonal (Apêndice B), a base de  $P_4$  e  $E_2$  para induzir a ovulação nestes animais. Cinco dias após a ovulação induzida, foi administrada nova dose de PGF, para que estas novilhas iniciassem o ciclo da mesma maneira que as outras cinco. Essa metodologia foi feita baseando-se em Figueiredo et al. (1997) que compararam a Dinâmica Folicular seguida de ovulação espontânea ou seguida da ovulação causada por luteólise induzida por PGF, sem haver diferença entre os dois métodos.

Após esse tratamento, cinco das seis novilhas ovularam e puderam participar do Experimento 2. A novilha que não ovulou também não

respondeu ao protocolo hormonal com progestágeno. Esta novilha foi a mais nova e a mais leve do grupo *Bos indicus* e talvez tenha sofrido mais com o manejo intenso, sendo que o protocolo hormonal utilizado não foi suficiente para fazer com que ela retomasse a ciclicidade.

A falha na detecção do estro de seis novilhas bubalinas pode ser devido ao comportamento sexual discreto e as vezes ausente, uma peculiaridade das bubalinas (PERERA, 2008). Mesmo utilizando dois rufiões bubalinos, visto que as búfalas apresentam baixo comportamento homossexual (BARUSELLI et al., 1997), e adesivos para detecção de monta, nos momentos em que não foi feita a observação visual do estro, apenas 53,3% das novilhas que ovularam foram detectadas em estro. A novilha bubalina que não ovulou apresentou cisto folicular e não participou do primeiro nem do segundo experimento.

Dessa forma, após o término das pré-sincronizações de PGF, foram utilizadas no Experimento 1: 14 novilhas Holandesas, 5 novilhas Gir e 15 novilhas bubalinas.

### **6.1.2 Ciclo Ovulatório**

#### **6.1.2.1 Duração do ciclo estral e padrão de ondas foliculares**

Não foram encontradas diferenças na duração do IIO entre as três raças estudadas. A duração do intervalo foi de 19 a 25 dias para Holandesas e Gir e de 20 a 29 dias para Búfalas.

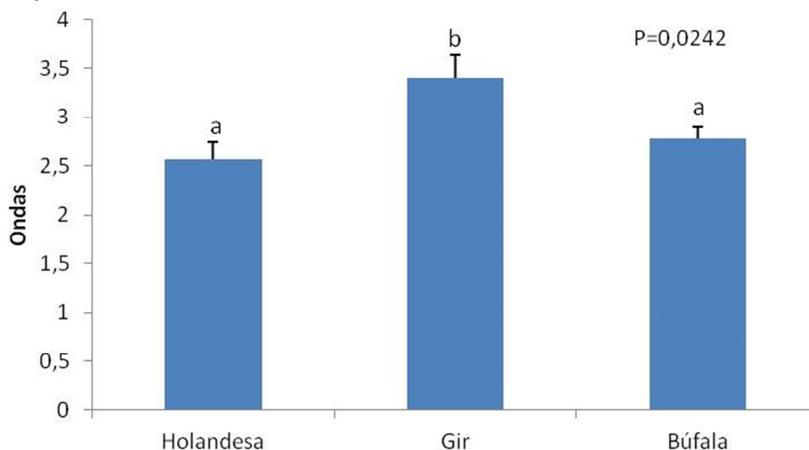
A duração do ciclo ovulatório variou entre bovinos e bubalinos, de modo geral. Intervalos semelhantes foram encontrados por diversos autores que estudaram o ciclo estral em bovinas (FIGUEIREDO, et al., 1997; BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003; SENGER, 2003; BASTOS et al.,

2010) e bubalinas (BARUSELLI et al., 1997; PERERA, 2008; BARKAWI et al., 2009).

Similar aos diversos trabalhos (SIROIS e FORTUNE, 1988; LUCY et al., 1992; RHODES; DE'ATH; ENTUWISTLE, 1995; SARTORI et al., 2004), a duração do IIO correlacionou-se positivamente com o número de ondas foliculares no presente estudo ( $r=0,69$ ,  $P<0,0001$ ). Apesar da ausência na diferença do IIO e da correlação positiva, as novilhas taurinas apresentaram menor número de ondas foliculares do que as novilhas zebuínas e as bubalinas apresentam padrão semelhante às taurinas ( $2,5 \pm 0,1$  ondas,  $3,4 \pm 0,2$  ondas e  $2,7 \pm 0,1$ , respectivamente,  $P=0,02$ ; Figura 3).

No caso específico de novilhas, foi relatado que o padrão de ondas foliculares pode-se alterar de acordo com a idade. Segundo alguns autores, quanto mais jovem a novilha, maior foi o número de ondas registrado por ciclo ovulatório (EVANS; ADAMS; RAWLINGS, 1994; JAISWAL et al., 2009). As novilhas zebuínas utilizadas no presente estudo eram mais jovens em relação às taurinas e às bubalinas, porém, o número de animais e o delineamento deste estudo não foi desenhado para responder se a idade interferiu ou não no padrão de ondas foliculares. Novilhas Holandesas e Bubalinas apresentaram padrão de 2 e 3 ondas foliculares (Holandesas: 7 animais com duas ondas e 7 animais com três ondas; Bubalinas: 3 animais com duas ondas e 12 animais com três ondas) e novilhas Gir apresentaram padrão de 3 e 4 ondas (3 animais com três ondas e dois animais com quatro ondas).

Figura 3 - Médias, EPM e valor de P para o Número de Ondas foliculares apresentadas em um ciclo ovulatório para novilhas Holandesas (N=14), Gir (N=5) e Búfalas (N=15).



Fonte: BALDRIGHI, J.M. (2013)

Legenda: Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa.

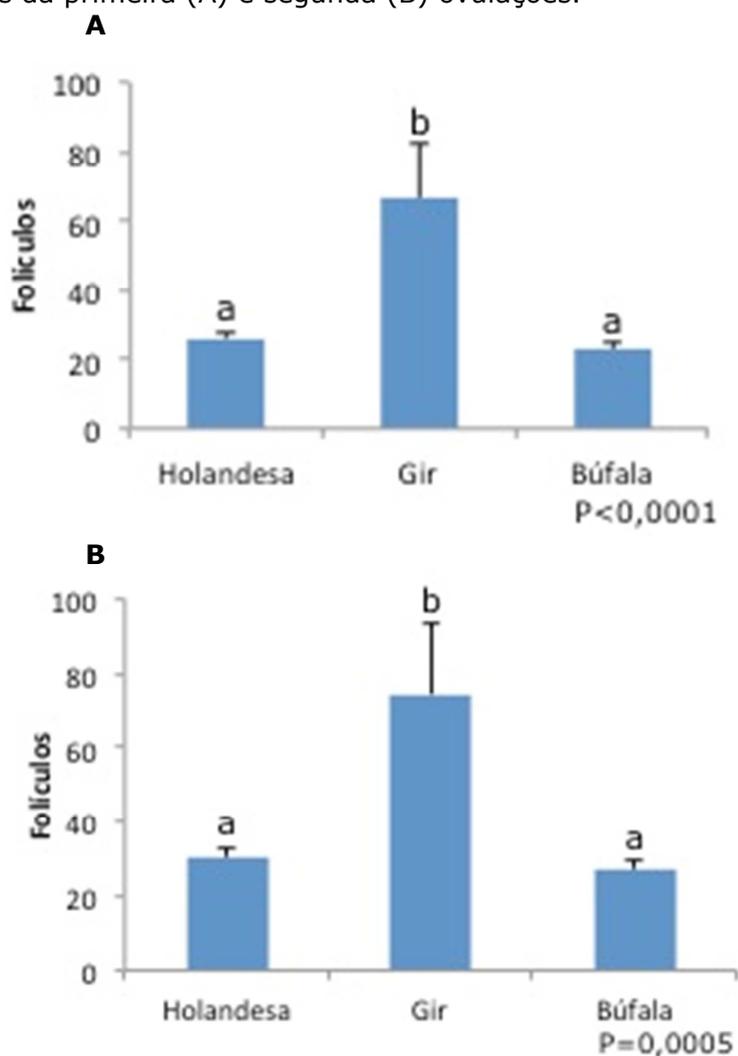
Alguns autores reportam resultados similares para as raças estudadas, isto é, novilhas zebuínas apresentam maior incidência de 3 ondas foliculares (RHODES; DE'ATH; ENTWISTLE, 1995; FIGUEIREDO et al., 1997; BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003; SARTORELLI et al., 2005; MOLLO et al., 2007) quando comparado às novilhas taurinas (SIROIS; FORTUNE, 1988; TOWNSON et al., 2002) e às bubalinas (BARKAWI et al., 2009). Porém, nesses estudos diferentes categorias animais foram estudadas, bem como diferentes raças foram utilizadas. O que se sabe hoje é que o padrão de ondas foliculares e do crescimento folicular pode sofrer influência de diversos fatores como duração do FD1, duração da fase luteínica, concentração de  $P_4$  e nutrição. A maioria desses fatores será discutida posteriormente.

#### 6.1.2.2 Crescimento folicular e desenvolvimento folicular

Após a primeira ovulação, foi iniciada a coleta de dados referentes à dinâmica folicular. Os folículos presentes no ovário, no dia em que o folículo ovulatório do ciclo anterior desapareceu, foram contados.

Corroborando com a literatura, as novilhas taurinas e bubalinas apresentam menor número de folículos no suposto dia da emergência da primeira onda folicular (GINTHER et al., 1996; ALVAREZ et al., 2000; BURATINI et al., 2000; BURNS et al., 2005; IRELAND et al., 2007; CARVALHO et al., 2008; GIMENES et al., 2009; BASTOS et al., 2010). Os resultados obtidos estão ilustrados na figura 4. Porém, no presente estudo, o número de folículos presentes no ovário, no dia da ovulação, esta acima da média reportada por esses autores. Pode-se tentar explicar esse evento porque foram contados todos os folículos presentes no ovário no dia da ovulação, que se encontravam abaixo de 5 mm.

Figura 4 – Número de folículos < 5mm presentes no ovário na primeira onda folicular, nos dias da primeira (A) e segunda (B) ovulações.



Fonte: BALDRIGHI, J.M. (2013)

Legenda: Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa. Valores nas barras indicam média, EPM e P para novilhas Holandesa (N=14), Gir (N=5) e Búfala (N=15).

Além da diferença no número de folículos, também foi encontrada correlação positiva entre as duas ovulações para todas as raças ( $r=0,69$ ;  $P<0,0001$ ). Foi reportado que o número de folículos primordiais presentes no ovário ao nascimento é altamente variável entre animais da mesma raça (BURNS et al., 2005; IRELAND et al., 2007; SILVA-SANTOS et al., 2011), o que explica a alta variação encontrada em ambos os momentos. No entanto, alguns autores relataram que o número de folículos recrutados em ondas consecutivas possui de moderada a alta repetibilidade entre ondas foliculares (SINGH et al., 2004; BURNS et al., 2005; IRELAND et al., 2007) e outros autores relataram que o crescimento de folículos pré-antrais e antrais mantém-se relativamente constante até que a fêmea atinja 7 a 9 anos de idade (ERICKSON, 1996) e a mulher atinja 35 a 40 anos de idade (GOUGEON et al., 1994).

Esses estudos, junto com o presente relato, indicam que o número de folículos antrais durante cada onda tende a se manter, relativamente, constante durante a vida do animal, até seu envelhecimento. Porém, dificilmente as fêmeas bovinas alcançam idades superiores a 9 anos. Isso dificulta a observação da diminuição de folículos recrutados por onda folicular, junto com a diminuição da reserva ovariana, devido ao avançar da idade. Adicionado ao fator idade, compara-se também a população de folículos pré-antrais existentes no ovário de novilhas. Devido à alta variação encontrada por Silva-Santos et al. (2009), na qual não foi identificado diferenças entre as raças, se conjectura se esta diferença realmente existe. Talvez as fêmeas zebuínas tenham menores taxas de atresia folicular do que as taurinas (e bubalinas), mas isso são só especulações.

Uma possível explicação para esse fato pode estar relacionado com o sistema IGF-I e insulina. Alguns relatos apontam que a superioridade da população folicular de *Bos indicus* pode ser devido à elevada concentração desses hormônios (ALVAREZ et al., 2000; BURATINI, et al., 2000). Também foi demonstrado que o IGF-I aumenta a sensibilidade de folículos

pequenos (< que 5 mm), mas não participa da formação do ovário, do recrutamento de folículos primordiais ou no crescimento dos folículos independentes de gonadotrofinas (MAZERBOURG et al., 2003). No entanto, no Experimento 1 não foi dosado IGF-I plasmático.

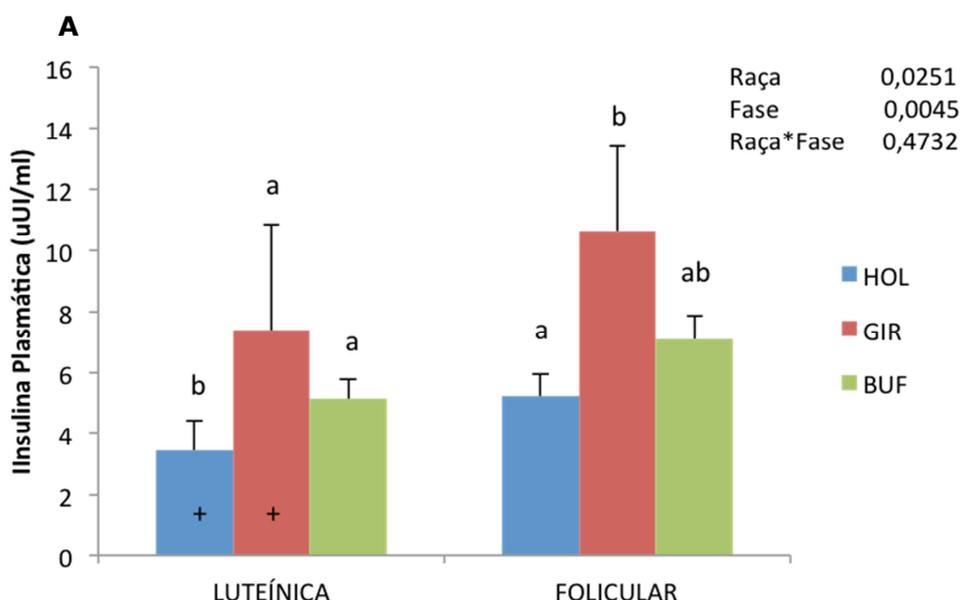
O papel da insulina na foliculogênese ainda é incerto, porém, foi publicado que roedores “knock-out” para o gene produtor de receptores de insulina tiveram a foliculogênese bloqueada (revisado por SCARAMUZZI et al., 2011) e que a foliculogênese sofre influência da nutrição (WEBB et al., 2004). No presente estudo, foi mensurado a concentração de insulina em duas fases distintas para as três raças. Apesar de altamente variável entre as fêmeas, as novilhas zebuínas tenderam a expressar maiores concentrações plasmáticas do que as fêmeas holandesas na fase luteínica e concentrações semelhantes às novilhas bubalinas (Figura 5A;  $P=0,08$ ). Na fase folicular, a diferença entre Holandesa e Gir persistiu ( $P=0,04$ ) e as bubalinas apresentaram valores plasmáticos semelhantes às duas raças bovinas. Foi feito também análise de interação entre raça e fase, porém, sem diferença significativa. Visto isso, os dados de insulina luteínica e folicular foram agrupados, para identificar o efeito raça (Figura 5B). Novilhas Holandesas mostraram menores concentrações de insulina do que novilhas Gir na fase folicular ( $P=0,02$ ). Tais resultados podem indicar uma possível razão do maior número de folículos recrutados nos zebuínos, visto que a insulina interage com o FSH para estimular as células da granulosa a produzirem  $E_2$  (SPICER, 2004). Já as bubalinas mostraram níveis inferiores às bovinas, o que pode explicar, em parte, o baixo número de folículos recrutados que esta raça apresenta.

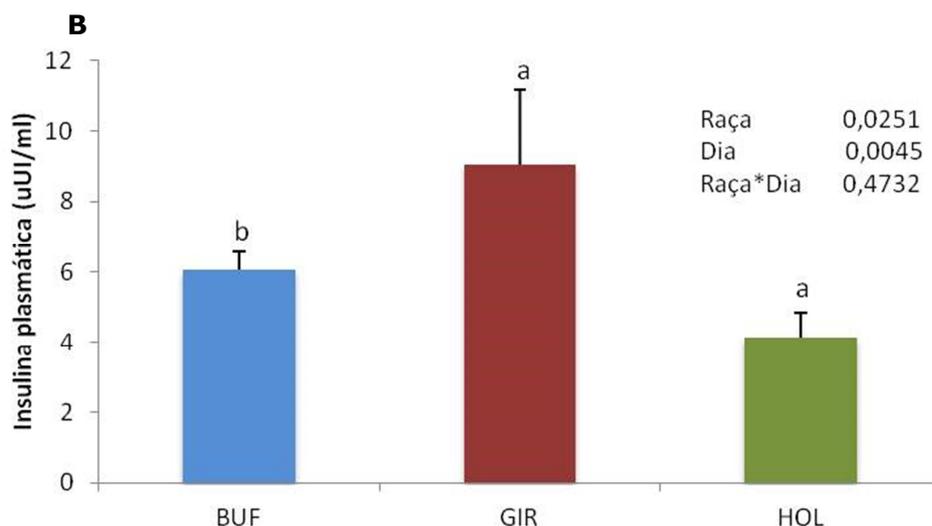
O efeito do sistema glicose-insulina no folículo parece certo, porém, como dito anteriormente, não se sabe ao certo por qual (quais) mecanismo (s) este sistema regula a foliculogênese. Se for considerado a função da insulina de manter a saúde e a integridade das células da granulosa, como faz em qualquer outra célula, pode-se concluir que este

sistema por si só participa na foliculogênese por atuar na proliferação e diferenciação celular.

Concentrações de IGF-I total no plasma também foram mensurados nos mesmos pontos utilizados para insulina durante as fases luteínica e folicular. Todas as novilhas apresentaram menores concentrações de IGF-I na fase de platô da P<sub>4</sub>, porém nesta fase, não houve diferença entre as raças. Na fase folicular, apesar das maiores concentrações de IGF-I quando comparado à fase luteínica, as novilhas bubalinas apresentaram maiores concentrações do que taurinas (Figura 6). Provavelmente, essa diferença está relacionada à massa corpórea das bubalinas e não a alguma implicação sobre o ciclo dessas fêmeas.

Figura 5 – Concentrações plasmáticas de insulina das três raças na fase luteínica e fase folicular (A) e concentrações plasmáticas de insulina comparadas para cada raça (B).

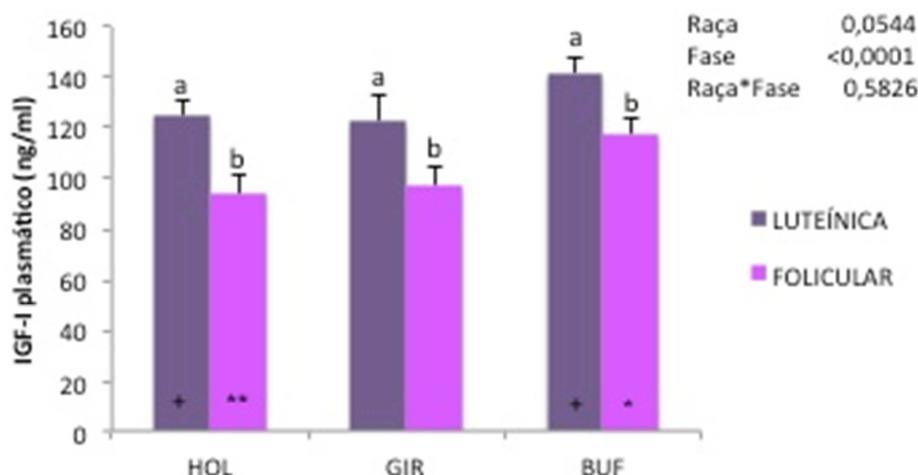




Fonte: BALDRIGHI, J.M. (2013)

Legenda: Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa. Valores nas barras indicam média, EPM e P para novilhas Holandesa (N=14), Gir (N=5) e Búfala (N=15).

Figura 6 – Concentrações plasmáticas de IGF-I total das três raças na fase luteínica e fase folicular.



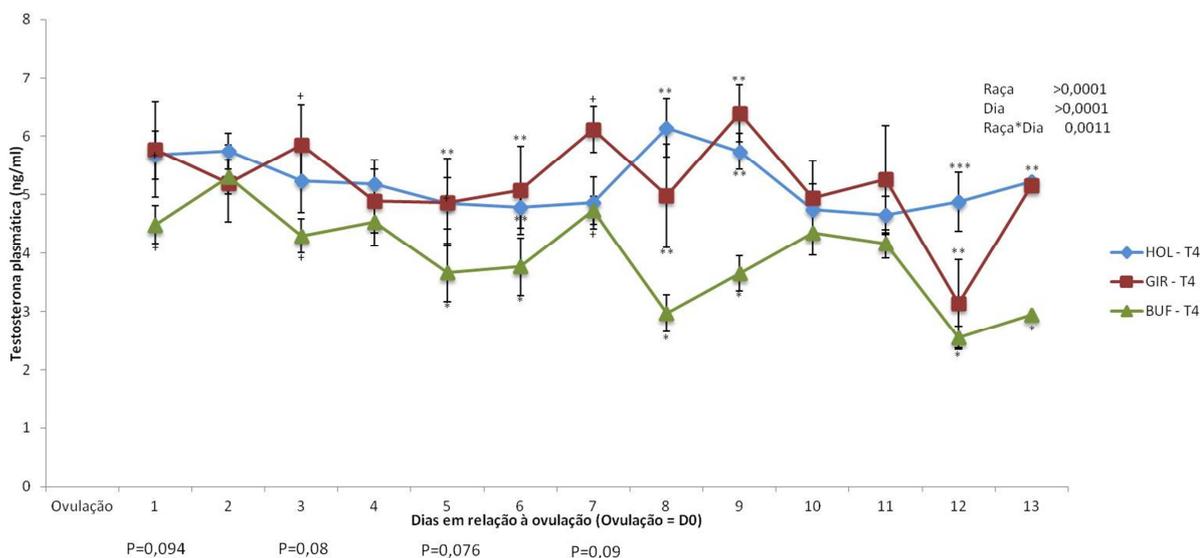
Fonte: BALDRIGHI, J.M. (2013)

Legenda: Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa. Valores nas barras indicam média, EPM e P para novilhas Holandesa (N=14), Gir (N=5) e Búfala (N=15).

Os andrógenos também foram associados à variação do número de folículos antrais presentes nos ovários, durante as ondas foliculares. Segundo Mossa et al. (2010), as concentrações de testosterona foram menores em fêmeas que apresentaram baixos números de folículos > 3 mm presentes no ovário. Essa hipótese foi investigada no presente

estudo, no qual se avaliou as concentrações de testosterona nos 13 primeiros dias do ciclo estral (Figura 7). As novilhas taurinas apresentaram concentrações de testosterona igual, ou inferior às zebuínas já as bubalinas mostraram concentrações menores do que as bovinas, durante o período avaliado. Os valores encontrados foram menores aos divulgados por Mossa et al. (2010), visto que este grupo utilizou vacas em lactação. Considerando que a atividade esteroidogênica das células da teca é regulada, principalmente pelo LH e que a capacidade da hipófise de produzir gonadotrofinas não é influenciada pelo número de folículos presentes nos ovários, a diferença apontada, principalmente pelas bubalinas e em menor grau pelas taurinas, pode ser por uma menor resposta das células da teca ao LH, nestas duas raças. O fato de Holandesas e Búfalas apresentarem menores concentrações de  $P_4$  do que as novilhas Gir, fornece mais poder a essa hipótese, mas esta informação será discutida posteriormente.

Figura 7 – Concentrações plasmáticas de testosterona por dia nas três raças do dia 1 após ovulação até dia 13.

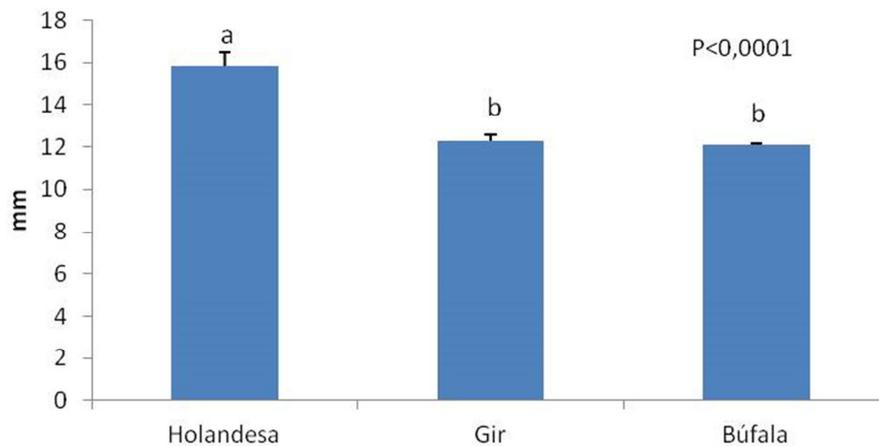


Fonte: BALDRIGHI, J.M. (2013)

Legenda: Valores nos pontos indicam média, EPM e P para novilhas Holandesa (N=14), Gir (N=5) e Búfala (N=15). Número de "\*" diferentes nos pontos indicam diferença significativa entre as raças no mesmo dia.

O diâmetro do folículo dominante da primeira onda (FD1) foi maior em Holandesas do que nas outras duas raças (Figura 8), corroborando com estudos que trabalharam com estas espécies (BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003; CARVALHO et al., 2008; BASTOS et al., 2010), porém, a taxa de crescimento deste FD1 foi igual em Holandesas ( $1,4\pm 0,1$  mm/dia) e novilhas Gir ( $1,2\pm 0,5$  mm/dia) e, superior nas bubalinas ( $1,0\pm 0,3$  mm/dia;  $P<0,0001$ ). O diâmetro do segundo folículo (FD2) também foi superior em novilhas taurinas (Figura 9) do que em zebuínas, mas inferior ao diâmetro da primeira onda, nas fêmeas que apresentaram padrão de 3 a 4 ondas.

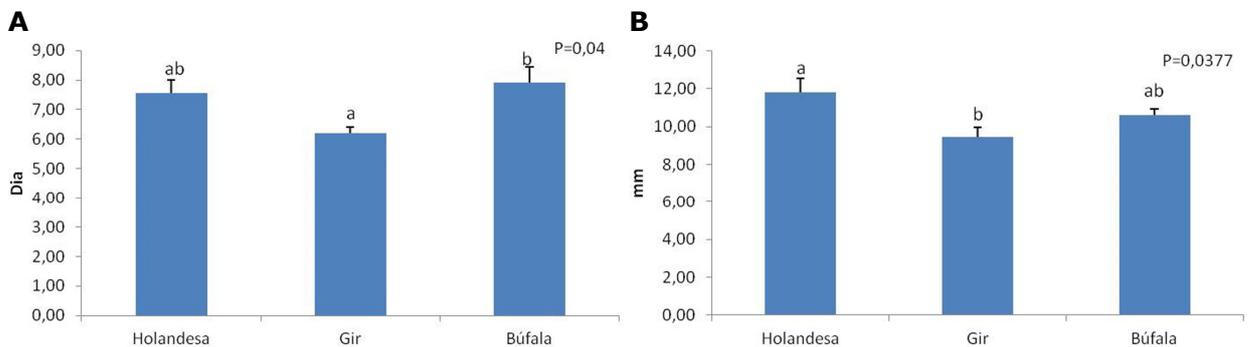
Figura 8 – Diâmetro máximo do FD1 em cada raça. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa. Valores nas barras indicam média, EPM e P para novilhas Holandesa (N=14), Gir (N=5) e Búfala (N=15).



Fonte: BALDRIGHI, J.M. (2013)

Legenda: Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa. Valores nas barras indicam média, EPM e P para novilhas Holandesa (N=14), Gir (N=5) e Búfala (N=15).

Figura 9 – Dia da emergência da segunda onda folicular (A) e diâmetro máximo do FD2 (B) em cada raça, para os animais que apresentaram 3 a 4 ondas foliculares.

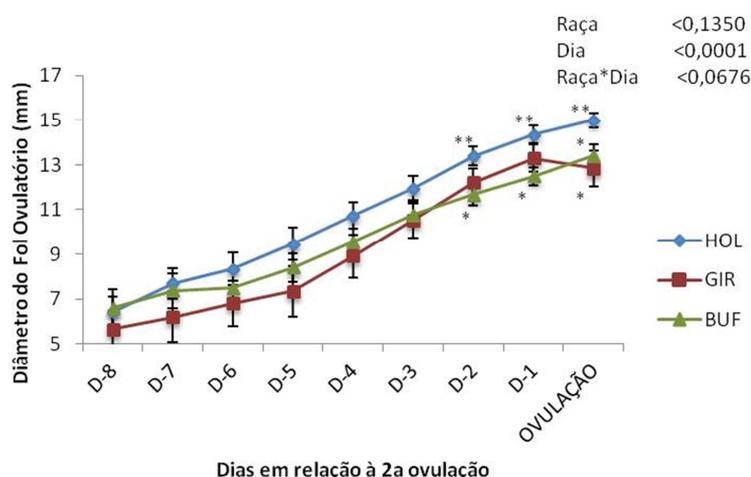


Fonte: BALDRIGHI, J.M. (2013)

Legenda: Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa. Valores nas barras indicam média, EPM e P para novilhas Holandesa (N=14), Gir (N=5) e Búfala (N=15).

Em relação ao diâmetro do folículo ovulatório, as novilhas taurinas apresentaram novamente, maior diâmetro quando comparado às bubalinas (Figura 10), porém, ao contrário do publicado para o FD1, foram semelhantes às novilhas zebuínas. Apesar de numericamente superior (Apêndice C – Quadro 1), essa igualdade pode estar relacionada à alta taxa de crescimento folicular de zebuínas e bubalinas, adicionado ao maior intervalo entre a luteólise e a ovulação, apresentado por estas novilhas. Como as zebuínas e as bubalinas apresentaram menores diâmetros foliculares no momento da luteólise, quando comparado às novilhas Holandesas, o FD presente no ovário das duas primeiras levou mais tempo para desencadear a cascata da ovulação. O FD presente no ovário das Holandesas já havia atingido a capacidade ovulatória devido ao seu maior diâmetro (SARTORI et al., 2001; GIMENES et al., 2008), desencadeando o processo ovulatório antes (SIROIS; FORNTUNE, 1988; GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989; SARTORI et al., 2004).

Figura 10 - Diâmetros foliculares do folículo ovulatório em relação aos dias do ciclo estral, normalizado para o dia da segunda ovulação, nas três raças (até não ser mais detectado por US).



Fonte: BALDRIGHI, J.M. (2013)

Legenda: Valores em cada ponto indicam média  $\pm$  EPM e valores de P para novilhas Holandesa (N=14), Gir (N=5) e Búfala (N=15). Número de "\*" diferentes nos pontos indicam diferença significativa entre as raças no mesmo dia.

Após o período de crescimento folicular, os FD1 das taurinas e das bubalinas mantiveram os respectivos diâmetros por alguns dias, até que uma nova onda foi iniciada, sendo que estes começaram a diminuir, lentamente. Mesmo com a superioridade constante do diâmetro folicular das novilhas Holandesas sobre as bubalinas, ambos permaneceram no ovário, pelo menos até o término do ciclo. Já o FD1 das novilhas zebuínas não apresentaram fase estática. Um ou dois dias após atingir o diâmetro máximo, o FD1 iniciou rapidamente a regressão, até que não foi mais visto por volta da metade do IIO (Figura 11). Essa diferença na "persistência" do FD da primeira onda em taurinas e bubalinas reflete na duração da dominância deste folículo sobre os demais, tornando o poder inibitório, sobre as outras estruturas ovarianas mais duradouro, quando comparado às novilhas zebuínas. No presente estudo foi encontrada maior duração da dominância do FD1 (Figura 12) em Holandesas e em Búfalas ( $8,0 \pm 0,49$  e  $8,0 \pm 0,44$  dias, respectivamente) do que nas novilhas Gir ( $5,2 \pm 1,07$ ;  $P=0,013$ ). Esse fato pode explicar o maior número de ondas foliculares apresentado pelas zebuínas. Com o curto período de dominância, provavelmente o "feed-back" negativo sobre o FSH é

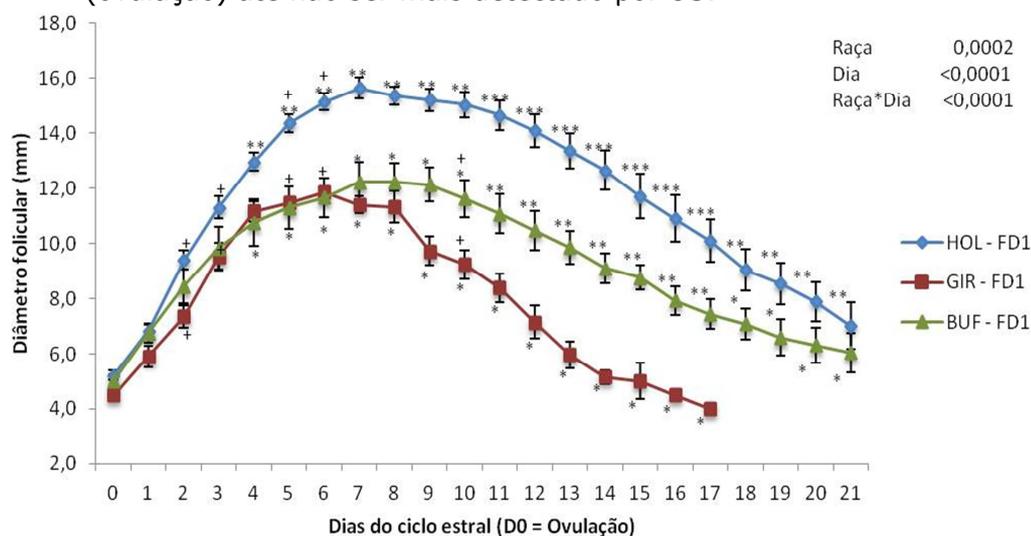
encerrado, sendo que a concentração aumenta, estimulando um novo grupo de folículos a crescer e a emergência da segunda onda folicular.

Assim, pode-se observar que a segunda onda folicular das novilhas taurinas e bubalinas iniciou mais tarde (dia  $7,5 \pm 0,44$  e  $7,9 \pm 0,55$ , respectivamente) quando comparado às novilhas zebuínas que tiveram a emergência da segunda onda no dia  $6,2 \pm 0,2$  ( $P=0,04$ ).

Esses resultados, semelhantemente ao reportado na literatura (JAISWAL et al., 2009) indicam que a duração e o diâmetro do FD1 pode influenciar a emergência da onda subsequente e a duração do IIO. Apesar da diferença numérica entre Gir e as outras duas raças, não foi encontrado diferença em relação à duração da fase luteínica, isto é, dia em que ocorreu a luteólise. Porém, observou-se no presente estudo correlações negativas entre a duração do FD1 e o número de ondas ( $r=-0,51$ ;  $P=0,001$ ). Como descrito anteriormente, quanto maior a duração da dominância do FD1, mais longo será o efeito inibitório do FD1 na liberação de FSH e com isso, a segunda onda emerge mais tarde e o ciclo ovulatório se estende.

A ausência de diferenças significantes na duração da fase luteínica pode indicar que as novilhas zebuínas, apesar de possuírem maior número de ondas no intervalo, não tiveram maior duração do IIO, o que não condiz com outros autores (BARUSELLI et al., 1997; ARAÚJO et al., 2009; JAISWAL, et al., 2009; CERRI et al., 2011).

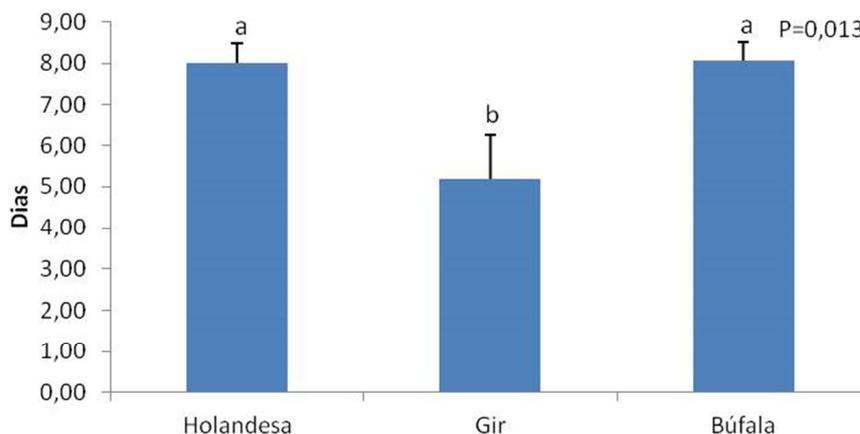
Figura 11 – Diâmetros do FD da primeira onda folicular por dia nas três raças, do dia 0 (ovulação) até não ser mais detectado por US.



Fonte: BALDRIGHI, J.M. (2013)

Legenda: Valores em cada ponto indicam média ± EPM e valores de P para novilhas Holandesa (N=14), Gir (N=5) e Búfala (N=15). Número de "\*" diferentes nos pontos indicam diferença significativa entre as raças no mesmo dia.

Figura 12 – Duração da dominância do FD1.



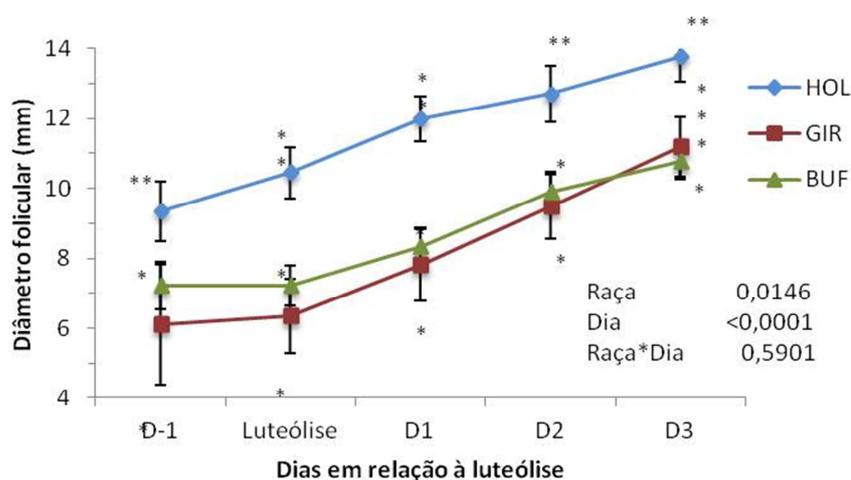
Fonte: BALDRIGHI, J.M. (2013)

Legenda: Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa. Valores nas barras indicam média, EPM e P para novilhas Holandesa (N=14), Gir (N=5) e Búfala (N=15).

As novilhas taurinas também apresentaram maiores diâmetros do folículo ovulatório do que as zebuínas e as bubalinas, no momento da luteólise (Figura 13). Porém, as mesmas diferenças não foram encontradas no momento da ovulação, diferente do relatado por

Figueiredo et al. (1997) e Bastos et al. (2010). Talvez, a maior taxa de crescimento encontrada nas zebuínas pode ter sido responsável pela igualdade dos diâmetros com as taurinas. As novilhas bubalinas se igualaram às zebuínas, porém apresentaram menor diâmetro do folículo na ovulação quando comparadas às taurinas, diâmetros esses similares aos descritos anteriormente (BARUSELLI et al., 1997; PRESICCE et al., 2004).

Figura 13 – Diâmetro do folículo ovulatório por dia nas três raças normalizado para o dia da luteólise..



Fonte: BALDRIGHI, J.M. (2013)

Legenda: Valores em cada ponto indicam média  $\pm$  EPM e valores de P para novilhas Holandesa (N=14), Gir (N=5) e Búfala (N=15). Número de "\*" diferentes nos pontos indicam diferença significativa entre as raças no mesmo dia

### 6.1.2.3 Desenvolvimento e crescimento do Corpo Lúteo

No dia em que foi detectado o desaparecimento do FD ovulatório, após a primeira ovulação, iniciou-se juntamente com a análise folicular, a análise do desenvolvimento e do crescimento do CL. Logo nos primeiros dias de formação foram registradas diferenças entre as raças. Primeiro em relação à ecogenicidade. Novilhas taurinas apresentaram CL inicialmente com ecogenicidade moderada e alguns cavitários (4/14), isto é, uma

região anecóica circundada pela massa luteínica em formação, com bordos bem definidos. As novilhas zebuínas apresentaram, logo nos primeiros dias, um CL de moderada ecogenicidade, com limites bem definidos em relação ao parênquima ovariano. Porém, apesar da fácil identificação do CL apresentado pelas representantes bovinas, todo o trabalho foi voltado para a identificação e delimitação do CL das novilhas bubalinas. Nas fêmeas bubalinas os CL se apresentaram com baixa ecogenicidade, dificilmente possuíam protuberâncias, com diâmetros reduzidos e de difícil delimitação. Esses achados são similares ao relatados por autores que trabalharam com bubalinas (PERERA et al., 1987). Segundo estes autores, as características do CL em bubalinas faz com que sua detecção por palpação retal aconteça em apenas 50% das vezes e que o tamanho também influencia na produção de  $P_4$  no ciclo.

A cavidade anecóica dos CLs das Holandesas foi regredindo de acordo com a evolução do ciclo e por volta da metade do ciclo ovulatório, nenhum animal apresentou cavidade. Como esperado, o volume e o diâmetro do CL em taurinas foi superior ao das zebuínas e das bubalinas (Figura 14), similarmente ao já reportado para as três raças (GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989; FIGUEIREDO et al., 1997; ALVAREZ et al., 2000; BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003; SARTORI et al., 2004; GIMENEZ et al., 2008; YINDEE et al., 2011). Porém, apesar de correlacionar positivamente com o tamanho do folículo ovulatório do ciclo anterior ( $r=0,57$ ;  $P=0,0004$ ), a concentração de  $P_4$  em taurinas foi igual, ou até mesmo, inferior, em alguns dias, às concentrações exibidas pelas zebuínas (Figura 15), como descrito por BASTOS et al. (2010).

Em bubalinos, não só o tamanho do CL foi menor, como também sua concentração circulante de  $P_4$ , durante quase todo o ciclo, em desacordo com o publicado por Gimenez et al. (2008). Nesse grupo, os autores observaram maiores concentrações de  $P_4$  quando comparadas às taurinas e às zebuínas. Porém, o estudo publicado utilizou um protocolo hormonal a base de  $P_4$  e  $E_2$  para a sincronização da ovulação.

As concentrações de  $P_4$  podem estar relacionadas com as concentrações de testosterona e com a população de folículos presentes no ovário (MOSSA et al., 2010), considerando que a primeira é precursora da segunda. Portanto, com base nos resultados mostrados e na literatura levantada no presente estudo, uma conclusão simples é de que as novilhas Gir apresentam maior número de folículos presentes no ovário devido à alta produção de  $P_4$  e conseqüentemente de testosterona. Também essa conclusão pode ser aplicada às bubalinas que apresentaram menores concentrações tanto de  $P_4$  quanto de testosterona, além de menor contagem de folículos < 5 mm presentes no momento das ovulações. Já para as taurinas, duas hipóteses são levantadas. Considerando o baixo número de folículos na emergência da primeira onda, concentrações de  $P_4$  e testosterona iguais ou inferiores às zebuínas, porém com maior tamanho de CL, a primeira hipótese envolve o elevado metabolismo hepático de esteroides (WILTBANK et al., 2006), e, a segunda hipótese, uma menor eficiência das células da teca na resposta ao LH para a síntese de esteroides.

As diferentes concentrações de  $P_4$  durante o ciclo ovulatório encontradas podem também levar a compreender o impacto que esse hormônio tem no crescimento folicular, conseqüentemente no padrão de ondas foliculares. Sabe-se que  $P_4$  e  $E_2$  são os hormônios principais para desencadear a cascata luteolítica via a regulação da expressão de receptores de  $P_4$ ,  $E_2$  e ocitocina no útero. Assim, o endométrio deve sofrer exposição tanto de  $P_4$  quanto de  $E_2$  para que o momento exato da cascata luteolítica aconteça (ARAÚJO et al., 2009; SANTOS et al., 2009; OKUMU et al., 2010). Correlacionando essas informações com os resultados encontrados, as novilhas Holandesas, assim como as novilhas Gir, apresentaram um rápido crescimento de  $P_4$  no início do ciclo, porém, o diâmetro alcançado pelo FD1 foi maior nas novilhas Holandesas. Tal fato poderia indicar que, nessa raça, ocorreu maior liberação de  $E_2$  na primeira onda folicular, comparado com às zebuínas. Em seguida, devido ao curto período de dominância encontrado pelo FD1 nas Gir, uma nova onda se

.....

iniciou por volta do dia 6,2 após a ovulação, enquanto que as novilhas Holandesas que apresentaram padrão de duas ondas iniciaram a segunda onda, em média, no dia 9,5 após a ovulação (Figura 16 e 17) e as que apresentaram 3 ondas, tiveram a segunda emergência no dia 7,6 (Figura 18). Esses resultados indicam uma diferença de, aproximadamente 3 dias entre os padrões de duas e três ondas. Três dias, aos quais os úteros das Holandesas foram expostos às concentrações de  $P_4$  e  $E_2$ .

O FD da segunda onda foi inferior do que o da primeira, para as duas raças, porém o das Gir foi ainda inferior do que o FD2 das Holandesas, o que pode indicar, novamente, menores concentrações de  $E_2$  circulantes. Dessa forma, uma nova onda emerge nas novilhas Gir com padrão de 3 ondas ao redor do dia 14 do ciclo e por volta do dia 11 para o padrão de 4 ondas. As novilhas Holandesas de duas ondas seguem com o crescimento do FD até a ovulação enquanto que as novilhas com padrão de três ondas iniciam a onda ovulatória também ao redor do dia 16 do ciclo. Até esse momento, formulou-se a hipótese de que as novilhas taurinas apresentaram concentrações suficientes para induzir a cascata da luteólise, o mesmo não ocorrendo com as novilhas zebuínas.

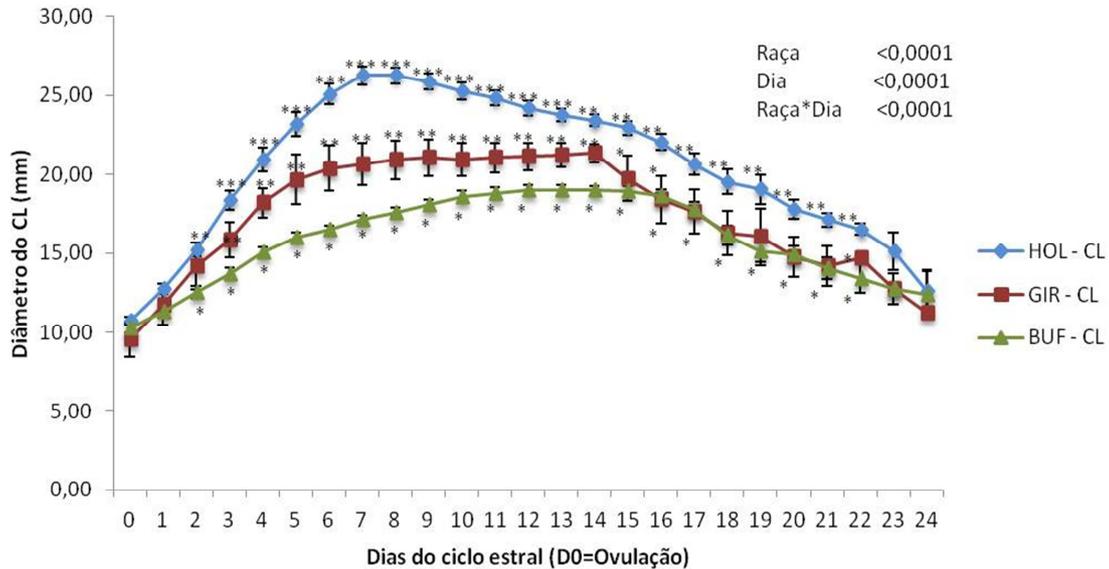
Não foram encontradas diferenças entre as raças para o dia da luteólise, provavelmente porque estes valores foram agrupados por raça e assim avaliados, não por padrão de ondas. Afinal, o presente estudo foi delineado para identificar diferenças entre as raças.

Ao avaliar todos os resultados, o modelo proposto de que quantidades mínimas de  $P_4$  e  $E_2$  são necessárias para desencadear a cascata luteolítica parece responder o porquê de certas diferenças encontradas no ciclo ovulatório de novilhas Holandesas e Gir (Figura 19).

Curiosamente, as novilhas bubalinas apresentaram menores concentrações de  $P_4$  durante quase todo o ciclo, mas com diâmetros dos FDs e emergências foliculares com valores intermediários às novilhas bovinas (ora semelhante às taurinas, ora semelhante às zebuínas). Talvez seja possível que a longa duração do FD1 tenha compensado o menor diâmetro em relação à produção de  $E_2$ , além de servir para retardar a

emergência da segunda onda folicular. Porém, seu comportamento intermediário impede maiores conclusões.

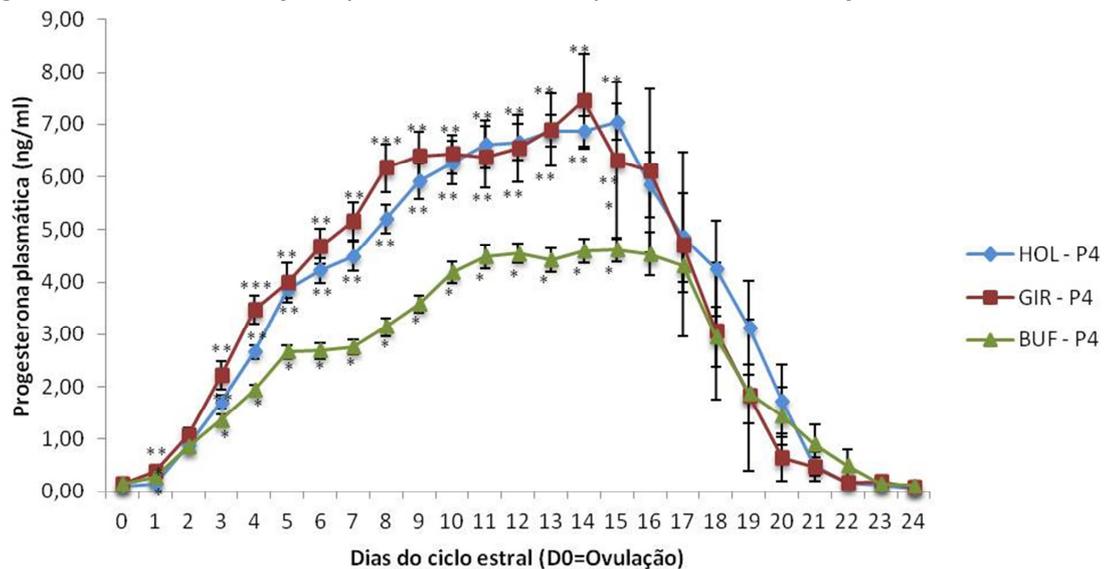
Figura 14 – Diâmetro luteínico por dia nas três raças.



Fonte: BALDRIGHI, J.M. (2013)

Legenda: Valores em cada ponto indicam média ± EPM. Valores de P para raça, dia e interação das novilhas Holandesa (N=14), Gir (N=5) e Búfala (N=15). Número de "\*" diferentes nos pontos indicam diferença significativa entre as raças no mesmo dia.

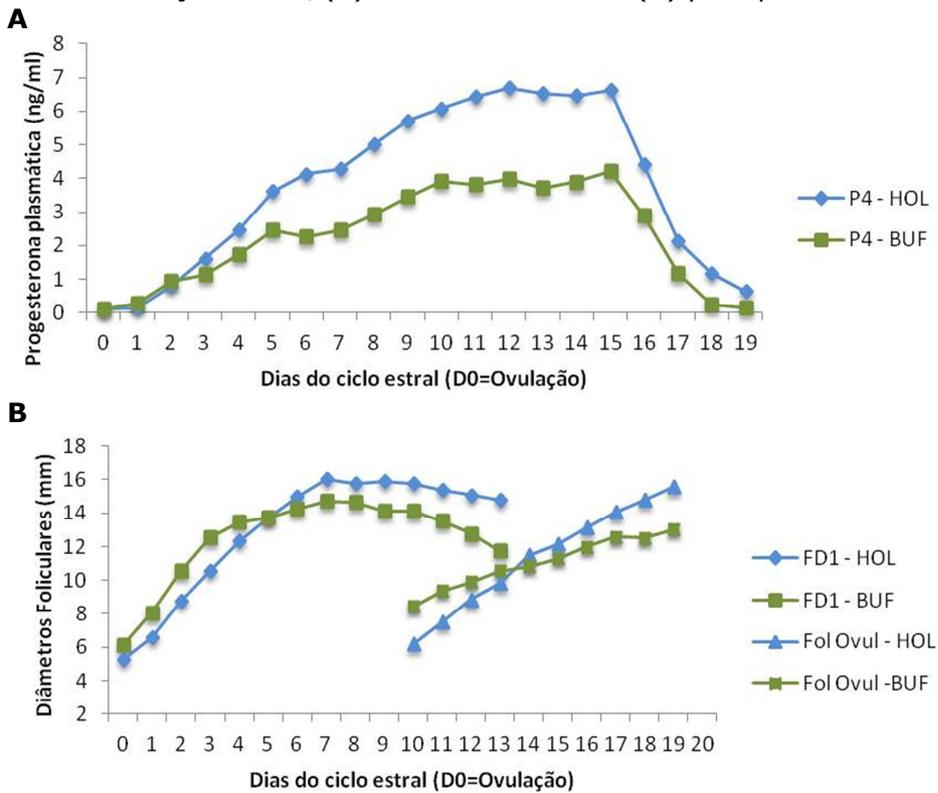
Figura 15 – Concentrações plasmáticas de P<sub>4</sub> por dia nas três raças.



Fonte: BALDRIGHI, J.M. (2013)

Legenda: Valores em cada ponto indicam média ± EPM. Novilhas Holandesa (N=14), Gir (N=5) e Búfala (N=15). Número de "\*" diferentes nos pontos indicam diferença significativa entre as raças no mesmo dia (P<0,05).

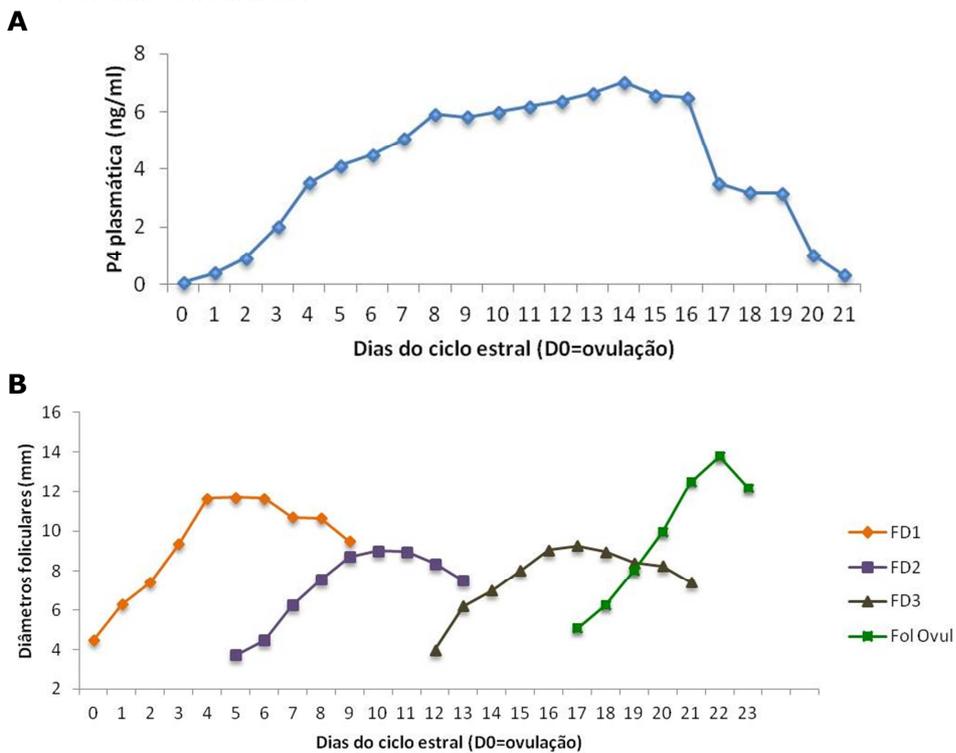
Figura 16 – Concentrações de P<sub>4</sub> (A) e ondas foliculares (B) para padrão de 2 ondas



Fonte: BALDRIGHI, J.M. (2013)

Legenda: Valores em cada ponto indicam média do dia. Novilhas Holandesa (N=8) e Búfalas (N=4).

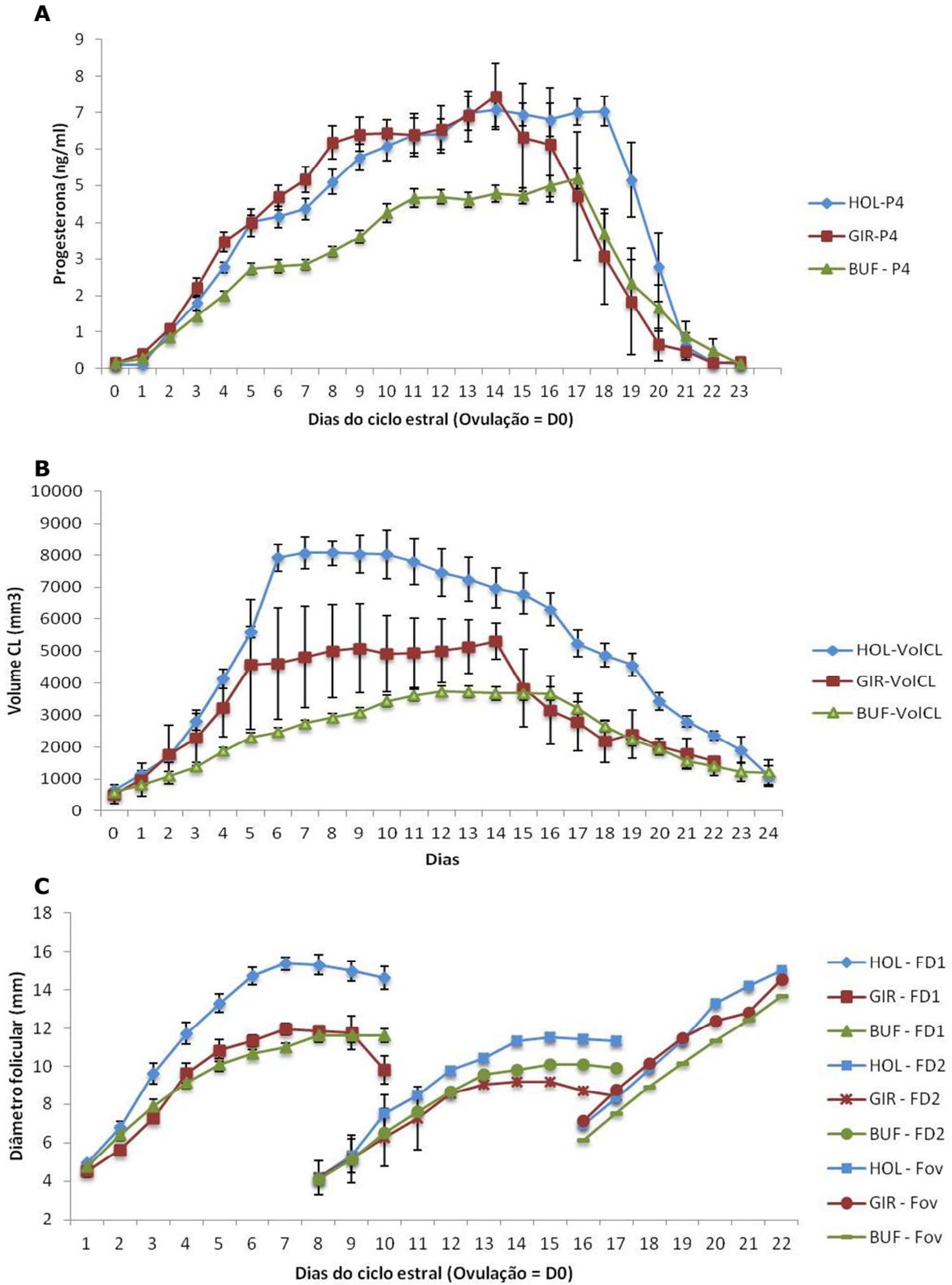
Figura 17 – Concentrações de P<sub>4</sub> (A) e ondas foliculares (B) para fêmeas com padrão de 4 ondas foliculares.



Fonte: Baldrighi, J. M. (2013)

Legenda: Valores em cada ponto indicam média do dia. Novilhas Gir (N=2).

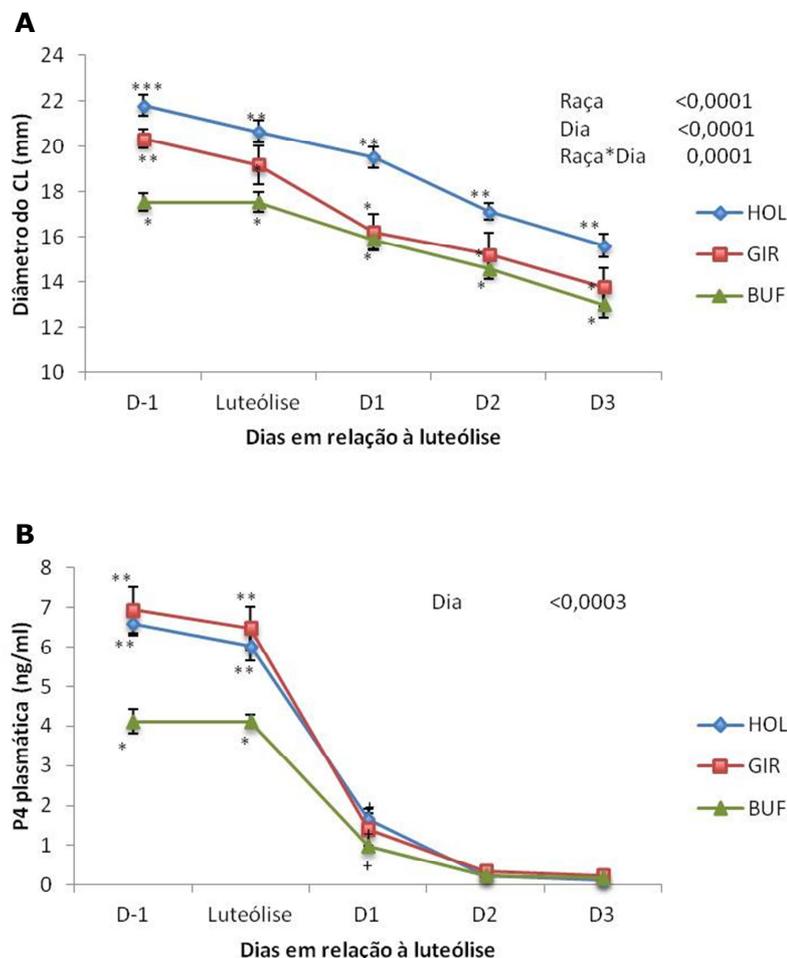
Figura 18 – Concentrações de P<sub>4</sub> (A), volume do CL (B) e ondas foliculares (C) para fêmeas com padrão de três ondas.



Fonte: BALDRIGHI, J.M. (2013)

Legenda: Valores em cada ponto indicam média±EPM do dia. Novilhas Holandesa (N=6), Gir (N=3) e Búfalas (N=11).

Figura 19 – Diâmetro do CL (A) e concentrações de P<sub>4</sub> (B) normalizado para luteólise.



Fonte: BALDRIGHI, J.M. (2013)

Legenda: Valores em cada ponto indicam média ± EPM. Valores de P para raça dia e interação. Novilhas Holandesa (N=14), Gir (N=5) e Búfala (N=15). Número de “\*” diferentes nos pontos indicam diferença significativa entre as raças no mesmo dia.

A partir do dia 17 do ciclo, as novilhas iniciaram as manifestações de estro novamente. Todas as novilhas Holandesas (15/15) manifestaram sinais de estro tanto pelo método visual como pelo Estroject e ovularam. No entanto, apenas 72,7% das fêmeas Gir (8/11) foram visualmente detectadas em estro e todas ovularam. A detecção de estro nas bubalinas novamente apresentou falhas, sendo que 87,0% (13/15) delas foram observadas visualmente em estro e todas ovularam.

## 6.2 EXPERIMENTO 2: DINÂMICA DO DESVIO FOLICULAR

Para o Experimento 2, foram utilizadas: 14 novilhas Holandesas, 10 novilhas Gir e 15 novilhas Búfalas.

Retrospectivamente, os futuros FD e FS foram identificados no momento da ovulação e os diâmetros foram registrados. Não foram observadas diferenças entre as raças, porém, novilhas taurinas apresentaram diâmetro numericamente maior no momento da ovulação.

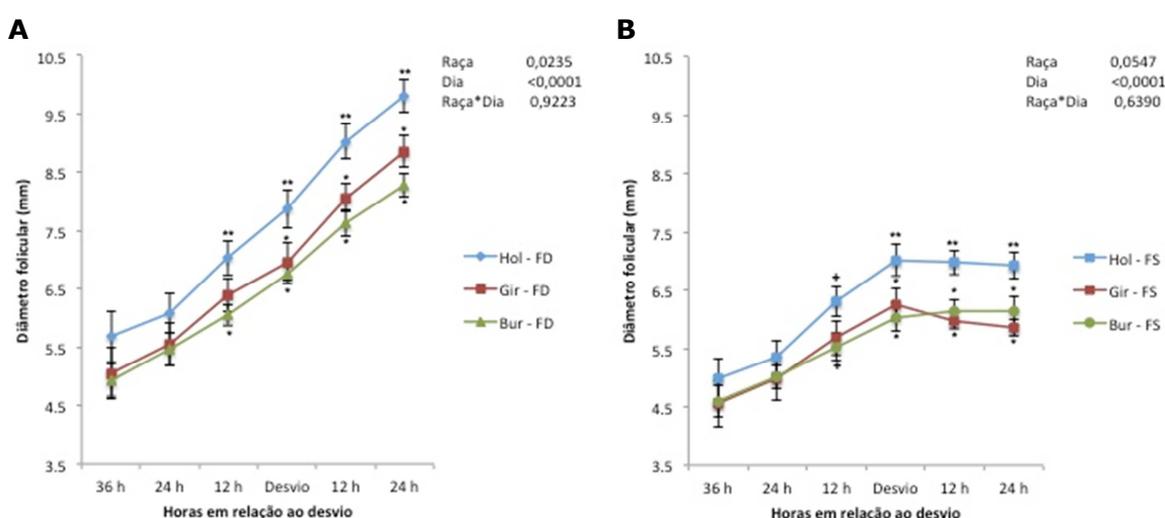
As novilhas Holandesas apresentaram maiores diâmetros foliculares no desvio (Figura 19), corroborando com relatos anteriores entre taurinas (GINTHER et al., 1996), zebuínas (SARTORELLI et al., 2005; GIMENES et al., 2008) e bubalinas (GIMENES et al., 2011). Entretanto, o diâmetro do FD das taurinas foi inferior ao publicado por Ginther et al. (1996) e Sartori et al. (2001). Já as zebuínas apresentaram diâmetros maiores do que visto na literatura e em relação as bubalinas, o valor foi semelhante. Essas alterações podem indicar efeito do número de partos, fase da produção (vaca em lactação e vaca no período seco) ou tanto do ambiente como da nutrição que cada fêmea recebeu no local de cada experimento. Quando avaliadas sob as mesmas condições, como no presente estudo, talvez esta seja a maneira no qual o crescimento folicular da primeira onda se comporte.

Apesar das taurinas apresentaram diâmetros maiores ao desvio, o momento em que este ocorreu após a ovulação foi similar para as taurinas ( $1,8 \pm 0,15$  dias), zebuínas ( $2,1 \pm 0,21$  dias) e bubalinas ( $1,8 \pm 0,18$  dias). Essa similaridade do momento do desvio também foi confirmada por autores que trabalham com *Bos taurus*, *Bos indicus* e *Bubalus bubalis* (GINTHER et al., 1996; FIGUEIREDO et al., 1997; SARTORELLI, et al., 2005; BASTOS et al., 2010; GIMENES et al., 2011). Porém, o momento do desvio encontrado no presente estudo foi anterior aos reportados por esses autores, que variou entre 2,5 a 2,9 dias, por diferenças do que foi definido como D0. Alguns autores calcularam momento do desvio a partir

da demonstração de estro da fêmea, e não da ovulação, como no presente estudo.

Avaliando-se as taxas de crescimento dos FD e FS, não foram observadas diferenças entre as três raças até o momento do desvio, passando a diferir somente após o desvio (Figuras 20 e 21). As bubalinas apresentaram crescimento menor do que as taurinas em relação à taxa de crescimento do FS até o desvio.

Figura 20 – Diâmetro do FD (A) e FS (B) em relação ao desvio folicular.

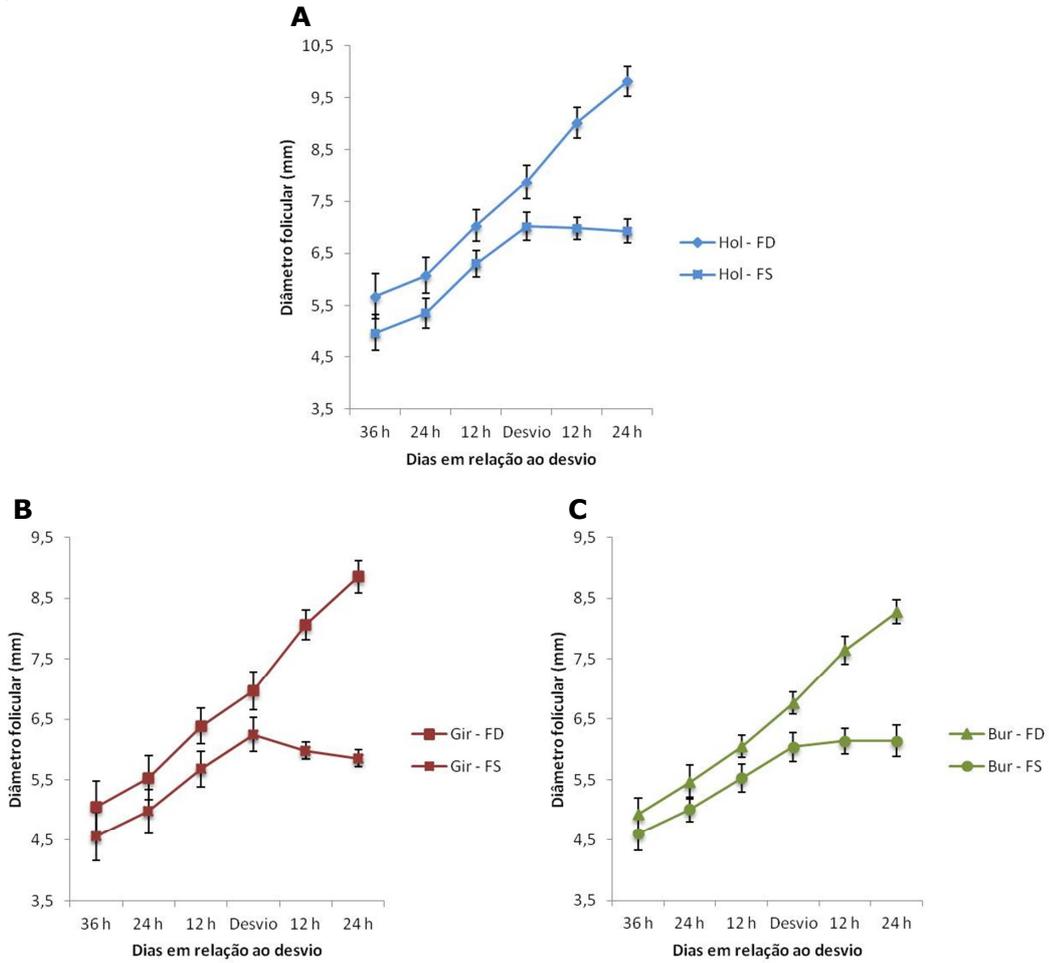


Fonte: BALDRIGHI, J.M. (2013)

Legenda: Valores em cada ponto indicam média  $\pm$  EPM. Valores de P para raça dia e interação. Novilhas Holandesa (N=14), Gir (N=10) e Búfala (N=15). Número de “\*” diferentes nos pontos indicam diferença significativa entre as raças no mesmo dia.

Para alguns autores, a diferença no diâmetro dos dois maiores folículos é explicada por uma menor taxa de crescimento do FS (GINTHER et al., 2001; PRESICCE et al., 2004; GIMENES et al., 2008; GIMENES et al., 2011). Como esse evento não foi encontrado no presente estudo, pode-se concluir que o futuro maior folículo possui uma vantagem de diâmetro em relação aos demais no momento da emergência folicular. Apesar de não encontrar diferenças significativas, devido à alta variação encontrada, percebe-se que as novilhas taurinas apresentam uma superioridade numérica em relação ao diâmetro folicular inicial.

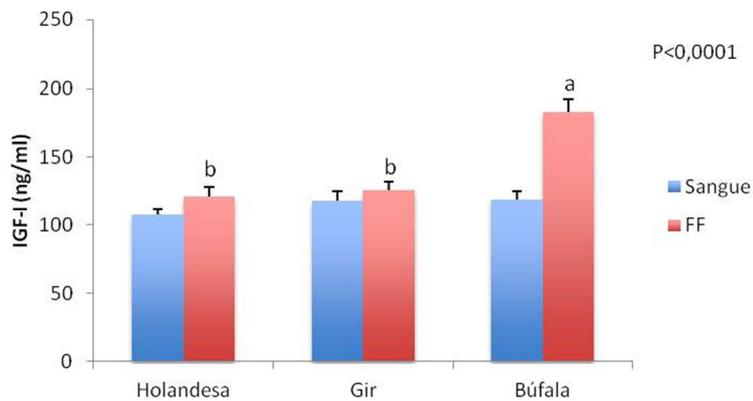
Figura 21 – FD e FS de novilhas (A) Holandesas (N=14), (B) Gir (N=10) e (C) Búfalas (N=15).



Fonte: BALDRIGHI, J.M. (2013)

Legenda: Valores em cada ponto indicam média ± EPM.

Figura 22 – Concentração de IGF-I total no sangue no dia do desvio e no FF, 24 a 30 h após desvio.



Fonte: BALDRIGHI, J.M. (2013)

Valores em barras indicam média ± EPM. Valor de P. Novilhas Holandesa (N=14), Gir (N=10) e Búfala (N=15). Letras diferentes em barras indicam diferença significativa.

Foi descrito por Ginther et al. (2003) que em vacas taurinas, o futuro FD emerge 6 horas antes do que os outros folículos da onda. Assim, mesmo com taxas de crescimento similares, seu diâmetro acaba sendo superior no momento do desvio.

De forma a entender a diferença entre os diâmetros no momento do desvio folicular, foi mensurado IGF-I total no plasma e no FF, 24 a 30 horas após identificado o momento do desvio. Não foram encontradas diferenças entre as raças em relação ao IGF-I no plasma, no dia em que foi detectado o desvio folicular. Porém, no FF, as bubalinas apresentaram maiores concentrações de IGF-I total (Figura 22).

Esse resultado vai contra o reportado na literatura sobre as maiores concentrações de IGF-I em *Bos indicus* do que em *Bos taurus* (BURATINI et al., 2000; ALVAREZ et al., 2000) e sobre as concentrações de IGF-I que aumentam de acordo com o crescimento dos folículos (MAZERBOURG et al., 2003). Porém, é notório que o sistema IGF sofre alteração de acordo com o tipo de alimentação fornecida e ao balanço energético em que as fêmeas se encontram. Assim, quando são avaliadas fêmeas de mesma classe, no mesmo ambiente e mantidas sob a mesma alimentação e em condições fisiológicas normais, a atividade do IGF-I no folículo é mantida sobre rigoroso controle das IGFBPs que previnem a super-atividade do IGF-I, como relatado por Scaramuzzi et al. (2011). Dessa forma, como no presente estudo mensurou-se apenas as concentrações de IGF-I livres, os reais valores de IGF-I que estão biodisponíveis no FF e no sangue não foram detectados, uma possível explicação para a similaridade das concentrações encontradas. Estudos estão sendo realizados para detectar as concentrações de IGF-I livre no plasma e no FF das novilhas utilizadas no presente estudo.

## 7 CONCLUSÕES

Novilhas Holandesas, Gir e Búfalas apresentam diferenças em relação à fisiologia reprodutiva do ciclo ovulatório e do desvio folicular quando mantidas no mesmo ambiente e no mesmo manejo nutricional.

As novilhas taurinas apresentam maiores diâmetros de folículos dominantes nas ondas foliculares, maior diâmetro de CL e maior diâmetro de folículo dominante no momento do desvio folicular.

As novilhas zebuínas apresentam maior número de ondas foliculares no ciclo ovulatório, maior número de folículos recrutados na emergência da primeira onda e maior concentração de insulina.

As novilhas bubalinas apresentam menor tamanho de CL e menores concentrações de progesterona durante o ciclo ovulatório.

As novilhas taurinas e zebuínas apresentam semelhantes concentrações de progesterona durante o ciclo, indicando diferenças ou na menor eficiência do CL taurino, ou na maior metabolização de esteroides por elas.

A maior duração do folículo dominante da primeira onda folicular, adicionado ao atraso da segunda emergência folicular em taurinas e bubalinas pode estar relacionado com o padrão do número de ondas foliculares no ciclo ovulatório.

A curta dominância do folículo dominante da primeira onda das novilhas zebuínas pode ser resposta do efeito inibitório das crescentes concentrações de progesterona alcançadas logo no início do ciclo, indicando maior sensibilidade das novilhas zebuínas em relação à concentração de progesterona.

## REFERÊNCIAS

- ABCZ. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE ZEBÚ. Manual do serviço de registro genealógico das raças zebuínas e PMGZ. 2009. Disponível em: <<http://www.abcz.org.br/>>. Acesso em: 07 dez. 2012
- ADAMS, G. P.; MATTERI, R.; KASTELIC, J.; KO, J. C. H.; GINTHER, O. J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 94, p. 177-188, 1992.
- ADAMS, G. P.; JAISWAL, R.; SINGH, J.; MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, v. 69, n. 1, p. 72-80, 1 jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17980420>>. Acesso em: 21 set. 2012.
- AHMAD, N.; TOWNSEND, E. C.; DAILEY, R. A.; INSKEEP, E. K. Relationships of hormonal patterns and fertility to occurrence of two or three waves of ovarian follicles, before and after breeding, in beef cows and heifers. *Animal Reproduction Science*, v. 49, p. 13-28, 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432097000572>>. Acesso em: 17 nov. 2012.
- ALI, A.; ABDEL-RASEK, A.K.; ABDEL-GHAFFAR, S.; GLATZEL, P. S. Ovarian follicular dynamics in buffalo cows (*Bubalus bubalis*). *Reproduction in Domestic Animals*, v. 38, n. 3, p. 214-218, jun. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12753556>>.
- ALVAREZ, P.; SPICER, L. J.; CHASE JR, C. C.; PAYTON, M. E.; HAMILTON, T. D.; STEWART, R. E.; HAMMOND, A. C.; OLSON, T. A.; WETTEMANN, R. P. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *Journal of Animal Science*, v. 78, p. 1291-1302, 2000. Disponível em: <<http://www.animal-science.org/content/78/5/1291.short>>. Acesso em: 16 nov. 2012.
- ARAUJO, R. R.; GINTHER, O. J.; FERREIRA, J. C.; PALHÃO, M. M.; BEG, M. A.; WILTBANK, M. C. Role of follicular estradiol-17 $\beta$  in timing of luteolysis in heifers. *Biology of Reproduction*, v. 81, n. 2, p. 426-437, ago. 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2849814&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 19 nov. 2012.
- ARMSTRONG, D. G.; BAXTER, G.; HOGG, C. O.; WOAD, K. J. Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine

preantral follicles. *Reproduction*, v. 123, n. 6, p. 789-797, jun. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12052233>>.

BADINGA, L.; DRIANCOURT, M. A.; SAVIO, J. D.; WOLFENSON, D.; DROST, M.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W. Endocrine and Ovarian Responses Associated with the First-Wave Dominant Follicle in Cattle. *Biology of Reproduction*, v. 47, p. 871-883, 1992. Disponível em: <<http://www.biolreprod.org/content/47/5/871.short>>. Acesso em: 21 set. 2012.

BARKAWI, A. H.; HAFEZ, Y. M.; IBRAHIM, S. A.; ASHOUR, G.; EL-ASHEERI, A. K.; GHANEM, N. Characteristics of ovarian follicular dynamics throughout the estrous cycle of Egyptian buffaloes. *Animal Reproduction Science*, v. 110, n. 3-4, p. 326-334, fev. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18799274>>. Acesso em: 17 nov. 2012.

BARUSELLI, P. S.; MUCCIOLO, R. G.; VISINTIN, J. A.; VIANA, W. G.; ARRUDA, E. H.; MADUREIRA, E. H.; OLIVEIRA, C. A.; MOLERO-FILHO, J. R. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v. 47, n. 8, p. 1531-1547, jun. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16728096>>.

BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; SOUSA, J. N. D. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, n. 2, p. 205-211, 2007. Disponível em: <<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/205.pdf>>. Acesso em: 21 set. 2012.

BASTOS, M. R.; MATTOS, M. C. C.; MESCHIATTI, M. A. P.; SURJUS, R. S.; GUARDIEIRO, M. M.; FERREIRA, J. C. P.; MOURÃO, G. B.; PIRES, A. V.; BIEHL, M. V.; PEDROSO, A. M.; SANTOS, F. A. P.; SARTORI, R. Ovarian function and circulating hormones in non lactating Nelore versus Holstein cows. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 38, n. Supl 2, p. 776, 2010.

BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction*, v. 132, n. 3, p. 365-377, set. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16940278>>. Acesso em: 7 nov. 2012.

BERGFELT, D. R.; SMITH, C. A.; ADAMS, G. P.; GINTHER, O. J. Surges of FSH during the follicular and early luteal phases of the estrous cycle in heifers. *Theriogenology*, v. 48, p. 757-768, 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X97002999>>. Acesso em: 21 set. 2012.

BLEACH, E. C. L.; GLENCROSS, R. G.; KNIGHT, P. G. Association between ovarian follicle development and pregnancy rates in dairy cows

undergoing spontaneous oestrous cycles. *Reproduction*, v. 127, n. 5, p. 621-629, maio 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15129018>>. Acesso em: 14 mar. 2013.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTÍNEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 78, n. 3-4, p. 307-326, out. 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432003000976>>. Acesso em: 21 set. 2012.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*, v. 43, p. 31-40, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X9400010R>>. Acesso em: 13 dez. 2012.

BRIDGES, P. J.; FORTUNE, J. E. Characteristics of developing prolonged dominant follicles in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 25, n. 2, p. 199-214, ago. 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0739724003000535>>. Acesso em: 27 mar. 2013.

BURATINI, J.; PRICE, C. A.; VISINTIN, J. A.; BÓ, G. A. Effects of Dominant Follicle Aspiration and Treatment with Recombinant Bovine Somatotropin (BST) on ovarian Follicular Development in Nelore (*Bos indicus*) Heifers. *Theriogenology*, v. 54, p. 421-431, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X00003599>>. Acesso em: 21 set. 2012.

BURNS, D. S.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; KNIGHT, P. G.; IRELAND, J. J. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biology of Reproduction*, v. 73, n. 1, p. 54-62, jul. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15744026>>. Acesso em: 21 set. 2012.

CAMPBELL, B. K. The modulation of gonadotrophic hormone action on the ovary by paracrine and autocrine factors. *Anatomy, Histology, Embryology*, v. 28, n. 4, p. 247-251, ago. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10488630>>.

CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, N. A. T.; REIS, E. L.; NICHI, M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, v. 69, n. 2, p. 167-175, 15 jan. 2008.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17980904>>. Acesso em: 28 out. 2012.

CERRI, R. L. A.; CHEBEL, R. C.; RIVERA, F.; NARCISO, C. D.; OLIVERIA, R. A.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. P. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: I. Ovarian and embryonic responses. *Journal of Dairy Science*, v. 94, n. 7, p. 3342-3351, jul. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21700020>>. Acesso em: 16 nov. 2012.

CERRI, R. L. A.; RUTIGLIANO, H. M.; BRUNO, R. G. S.; SANTOS, J. E. P. Progesterone concentration, follicular development and induction of cyclicity in dairy cows receiving intravaginal progesterone inserts. *Animal Reproduction Science*, v. 110, n. 1-2, p. 56-70, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18243597>>. Acesso em: 27 mar. 2013.

CHASE, C. C.; KIRBY, C. J.; HAMMOND, A. C.; OLSON, T. A.; LUCY, M. C. Patterns of ovarian growth and development in cattle with a growth hormone receptor deficiency. *Journal of Animal Science*, v. 76, p. 212-219, 1998. Disponível em: <<http://www.animal-science.org/content/76/1/212.short>>. Acesso em: 27 mar. 2013.

CUMMINS, S. B.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O.; BUTLER, S. T. Genetic merit for fertility traits in Holstein cows: II. Ovarian follicular and corpus luteum dynamics, reproductive hormones, and estrus behavior. *Journal of Dairy Science*, v. 95, n. 7, p. 3698-3710, jul. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22720927>>. Acesso em: 16 nov. 2012.

DIAS, F. C. F.; MAPLETOFT, R. J.; KASTELIC, J. P.; ADAMS, G. P.; COLAZO, M. G.; STOVER, B. C.; DOCHI, O.; SINGH, J. Effect of length of progesterone exposure during ovulatory wave development on pregnancy rate. *Theriogenology*, v. 77, n. 2, p. 437-444, 15 jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21975220>>. Acesso em: 16 nov. 2012.

DOS SANTOS, R. M.; GOISSIS, M. D.; FANTINI, D. A.; BERTAN, C. M.; VASCONCELOS, J. L. M.; BINELLI, M. Elevated progesterone concentrations enhance prostaglandin F<sub>2</sub>α synthesis in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v. 114, n. 1-3, p. 62-71, ago. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19004582>>. Acesso em: 19 nov. 2012.

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, v. 55, p. 1211-1239, 2001. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X01004794>>  
. Acesso em: 18 nov. 2012.

DUNNE, L. D.; DISKIN, M. G.; BOLAND, M. P.; O'FARRELL, K. J.; SREENAN, J. M. The effect of pre- and post-insemination plane of nutrition on embryo survival in beef heifers. *Animal Science*, v. 69, p. 411-417, 1999.

ERICKSON, B. H. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 10, n. 6, p. 97-105, 1966.

EVANS, A. C.; ADAMS, G. P.; RAWLINGS, N. C. Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 100, n. 1, p. 187-194, jan. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8182588>>.

EVANS, A. C.; FORTUNE, J. E. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology*, v. 138, n. 7, p. 2963-2971, jul. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9202241>>.

FAJERSSON, P.; BARRADAS, H. V.; ROMAN-PONCE, H.; COOK, R. M. The effects of dietary protein on age and weight at the onset of puberty in Brown Swiss and Zebu heifers in the tropics. *Theriogenology*, v. 35, n. 4, p. 845-855, 1991.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. P. Ovarian Follicular Dynamics in Nelore Breed (*Bos indicus*) Cattle. *Theriogenology*, v. 47, p. 1489-1505, 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X97001568>>  
. Acesso em: 17 nov. 2012.

FORDE, N.; BELTMAN, M. E.; LONERGAN, P.; DISKIN, M.; ROCHE, J. F.; CROWE, M. A. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 124, n. 3-4, p. 163-169, abr. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20875708>>. Acesso em: 6 mar. 2013.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; EVANS, A. C. O.; TURZILLO, A. M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biology of Reproduction*, v. 65, n. 3, p. 648-654, set. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11514324>>.

FORTUNE, J. E.; HANSEL, W. Concentrations of steroids and gonadotropins in follicular fluid from normal heifers and heifers primed for superovulation. *Biology of Reproduction*, v. 32, n. 5, p. 1069-1079, jun. 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3926013>>.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, p. 109-126, jul. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15271447>>. Acesso em: 27 jul. 2012.

FORTUNE, J. E. Ovarian Follicular Growth and Development in Mammals. *Biology of Reproduction*, v. 50, p. 225-232, 1994. Disponível em: <<http://www.biolreprod.org/content/50/2/225.short>>. Acesso em: 27 mar. 2013.

FORTUNE, J. E.; QUIRK, S. M. Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. *Journal of Animal Science*, v. 66, n. Suppl 2, p. 1-8, 1988. Disponível em: <[http://www.animal-science.org/content/66/Supplement\\_2/1.short](http://www.animal-science.org/content/66/Supplement_2/1.short)>. Acesso em: 13 dez. 2012.

FRISCH, J. E.; VERCOE, J. E. An analysis of growth of different cattle genotypes reared in different environments. *Journal Agriculture Science*, v. 103, n. 1, p. 137-153, 1984.

GARVERICK, H. A.; MOSER, M. T.; KEISLER, D. H.; HAMILTON, S. A.; ROBERTS, R. M. SMITH, M. F. Luteal function after intrauterine infusion of recombinant bovine interferon into postpartum beef cows expected to have short or normal luteal phases. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 94, p. 319-325, 1992. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/94/2/319.short>>. Acesso em: 28 mar. 2013.

GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; CARVALHO, N. A. T.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; SOUZA, A. H.; MADUREIRA, E. H.; TRINCA, L. A.; SARTORELLI, E. S.; BARROS, C. M.; CARVALHO, J. B. P.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, v. 69, n. 7, p. 852-858, 15 abr. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18316116>>. Acesso em: 23 jul. 2012.

GIMENES, L. U.; FANTINATO NETO, P.; ARANGO, J. S. P., AYRES, H.; BARUSELLI, P. S. Follicular dynamics of *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Bubalus bubalis* heifers treated with norgestomet ear implant associated or not to injectable progesterone. *Animal Reproduction*, v. 6, n. 1, p. 256, 2009.

GIMENES, L. U.; CARVALHO, N. A. T.; SÁ FILHO, M. F.; VANNUCCI, F. S.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; TRINCA, L. A.; SARTORELLI, E. S.; BARROS, C. M.; BELTRAN, M. P.; NOGUEIRA, G. P.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Ultrasonographic and endocrine aspects of follicle deviation, and acquisition of ovulatory capacity in buffalo (*Bubalus bubalis*) heifers. *Animal Reproduction Science*, v. 123, p. 175-

179, 2011. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.12.004>>. Acesso em: 21 set. 2012.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; KOT, K. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. *Biology of Reproduction*, v. 64, n. 1, p. 197-205, jan. 2001. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20962252>>.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULLICK, L. J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. *Biology of Reproduction*, v. 63, n. 2, p. 383-389, ago. 2000. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10906041>>. Acesso em: 22 jan. 2013.

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 87, n. 1, p. 223-230, set. 1989. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2621698>>.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; DONADEU, F. X.; BERGFELT, D. R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Animal Reproduction Science*, v. 78, n. 3-4, p. 239-257, out. 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432003000939>>. Acesso em: 1 mar. 2013.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the Dominant Follicle in Cattle. *Biology of Reproduction*, v. 55, p. 1187-1194, 1996. Disponível em:

<<http://www.biolreprod.org/content/55/6/1187.short>>. Acesso em: 21 set. 2012.

GUZELOGLU, A.; AMBROSE, J. D.; KASSA, T.; DIAZ, T.; THATCHER, M. J.; THATCHER, W. W. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to acute heat stress. *Animal Reproduction Science*, v. 66, n. 1-2, p. 15-34, 30 abr. 2001. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11343839>>.

HARRISON, R. O.; FORD, S. P.; YOUNG, J. W.; CONLEY, A. J.; FREEMAN, A. E. Increase milk production versus reproductive and energy status in high producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 73, p. 2749-2758, 1990.

HURK, VAN DEN, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles.

*Theriogenology*, v. 63, n. 6, p. 1717-1751, 1 abr. 2005. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15763114>>. Acesso em: 1 mar. 2013.

IRELAND, J. J.; WARD, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G. W.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Human Reproduction*, v. 22, n. 6, p. 1687-1695, jun. 2007. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17468258>>. Acesso em: 25 mar. 2013.

IRELAND, J. J.; ZIELAK-STECIWKO, A. E.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.; BETTEGOWDA, A.; SCHEETZ, D.; WALSH, S.; MOSSA, F.; KNIGHT, P.G.; SMITH, G. W.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. *Biology of Reproduction*, v. 80, n. 5, p. 954-964, maio 2009. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19164170>>. Acesso em: 25 mar. 2013.

IRELAND, J. L. H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMME, A. P. N.; WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; PEREZ, G. I.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biology of Reproduction*, v. 79, n. 6, p. 1219-1225, dez. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18768912>>. Acesso em: 3 dez. 2012.

JAISWAL, R. S.; SINGH, J.; MARSHALL, L.; ADAMS, G. P. Repeatability of 2-wave and 3-wave patterns of ovarian follicular development during the bovine estrous cycle. *Theriogenology*, v. 72, n. 1, p. 81-90, 1 jul. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19329173>>. Acesso em: 18 set. 2012.

JAISWAL, R. S.; SINGH, J.; ADAMS, G. P. Developmental pattern of small antral follicles in the bovine ovary. *Biology of Reproduction*, v. 71, n. 4, p. 1244-1251, out. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15189825>>. Acesso em: 25 mar. 2013.

KRYSKO, D. V.; DIEZ-FRAILE, A.; CRIEL, G.; SVISTUNOV, A. A.; VANDENABEELE, P.; D'HERDE, K. Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, v. 13, n. 9, p. 1065-1087, set. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18622770>>. Acesso em: 4 mar. 2013.

- KULICK, L. J.; KOT, K.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology*, v. 52, p. 913-921, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X9900182X>>. Acesso em: 27 mar. 2013.
- LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; DELANGHE, J. R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; BOLS, P. E. J.; DEWULF, J.; DE KRUIF, A. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology*, v. 62, n. 6, p. 1131-1143, 15 set. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15289052>>. Acesso em: 21 set. 2012.
- LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; MATEUSEN, B.; CHRISTOFE, A.; OPSOMER, G.; DE KRUIF, A.; GENICOT, G.; VAN SOOM, A. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction*, v. 130, n. 4, p. 485-495, out. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16183866>>. Acesso em: 21 set. 2012.
- LEROY, J. L. M. R.; VAN SOOM, A.; OPSOMER, G.; GOOVAERTS, I. G. F.; BOLS, P. E. J. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part II. Mechanisms linking nutrition and reduced oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, n. 5, p. 623-632, out. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18384498>>. Acesso em: 16 nov. 2012.
- LOPEZ, H.; CARAVIELLO, D. Z.; SATTER, L. D.; FRICKE, P. M.; WILTBANK, M. C. Relationship between level of milk production and multiple ovulations in lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, v. 88, n. 8, p. 2783-93, ago. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16027192>>. Acesso em: 17 jun. 2013.
- LOPEZ, H.; SATTER, L. D.; WILTBANK, M. C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v. 81, n. 3-4, p. 209-223, abr. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14998648>>. Acesso em: 27 mar. 2013.
- LUCY, M. C.; SAVIO, J. D.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *Journal of Animal Science*, v. 70, n. 11, p. 3615-3626, nov. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1459922>>.

LUCY, M. C. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for post-partum nutrition and reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43 Suppl 2, p. 31-39, jul. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18638098>>. Acesso em: 17 nov. 2012.

LUCY, M. C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *Journal of Dairy Science*, v. 84, n. 6, p. 1277-1293, jun. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11417685>>. Acesso em: 17 nov. 2012.

LUNDY, T.; SMITH, P.; O'CONNEL, A.; HUDSON, N. L.; MCNATTY, K. P. Populations of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 115, p. 251-262, 1999.

LYNCH, C. O.; KENNY, D. A.; CHILDS, S.; DISKIN, M. G. The relationship between periovulatory endocrine and follicular activity on corpus luteum size, function, and subsequent embryo survival. *Theriogenology*, v. 73, n. 2, p. 190-198, 15 jan. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19932503>>. Acesso em: 21 set. 2012.

MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M. A. C. M.; BARBOSA, R. T.; OLIVEIRA, C. A.; BINELLI, M. Ovarian function in Nelore (*Bos taurus indicus*) cows after post-ovulation hormonal treatments. *Theriogenology*, v. 69, n. 7, p. 798-804, 15 abr. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18336896>>. Acesso em: 18 nov. 2012.

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, n. 3-4, p. 171-180, 29 dez. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11121894>>.

MANN, G. E.; PAYNE, J. H.; LAMMING, G. E. Hormonal regulation of oxytocin-induced prostaglandin F(2 $\alpha$ ) secretion by the bovine and ovine uterus in vivo. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 21, n. 2, p. 127-141, ago. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11585702>>.

MAPLETOFT, R. J.; STEWARD, K.B.; ADAMS, G. P. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction, Nutrition, Development*, v. 42, p. 601-611, 2002. Disponível em: <[http://rnd.edpsciences.org/index.php?option=com\\_article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/rnd/pdf/2002/07/R2605Mapletoft.pdf](http://rnd.edpsciences.org/index.php?option=com_article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/rnd/pdf/2002/07/R2605Mapletoft.pdf)>. Acesso em: 16 nov. 2012.

MARTINS, A. C.; MOLLO, M. R.; BASTOS, M. R.; GUARDIEIRO, M. M.; SARTORI, R. Concentrações séricas hormonais em vacas azebuadas submetidas à baixa e alta ingestão alimentar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, n. 2, p. 243-247, fev. 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-204X2008000200013&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2008000200013&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>.

MAZERBOURG, S.; BONDY, C. A.; ZHOU, J.; MONGET, P. The Insulin-like Growth Factor System: a Key Determinant Role in the Growth and Selection of Ovarian Follicles? A Comparative Species Study. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 38, p. 247-258, 2003.

MAZERBOURG, S.; OVERGAARD, M. T.; OXVIG, C.; CHRISTIANSEN, M.; CONOVER, C. A.; LAURENDEAU, I.; VIDAUD, M. TOSSER-KLOPP, G.; ZAPF, J.; MONGET, P. Pregnancy-Associated Plasma Protein-A (PAPP-A) in Ovine, Bovine, Porcine, and Equine Ovarian Follicles: Involvement in IGF Binding Protein-4 Proteolytic Degradation and mRNA Expression During Follicular Development. *Endocrinology*, v. 142, n. 12, p. 5243-5253, 2001. Disponível em: <<http://endo.endojournals.org/content/142/12/5243.short>>. Acesso em: 27 mar. 2013.

MIHM, M.; AUSTIN, E. J.; GOOD, T. E. M.; IRELAND, J. L. H.; KNIGHT, P. G.; ROCHE, J. F.; IRELAND, J. J. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biology of Reproduction*, v. 63, n. 3, p. 811-819, set. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10952925>>.

MIHM, M.; EVANS, A. C. O. Mechanisms for dominant follicle selection in monovulatory species: a comparison of morphological, endocrine and intraovarian events in cows, mares and women. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43 Suppl 2, p. 48-56, jul. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18638104>>. Acesso em: 21 set. 2012.

MOIOLI, B. M.; NAPOLITANO, F.; PUPPO, S.; BARILE, V. L.; TERZANO, G. M.; BORGHESE, A.; Malfatti, A.; CATALANO, A.; PILLA, A. M. Patterns of oestrus, time of LH release and ovulation and effects of time of artificial insemination in Mediterranean buffalo cows. *Animal Science*, v. 66, n. 01, p. 87-91, 2 set. 1998. Disponível em: <[http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S1357729800008869](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S1357729800008869)>. Acesso em: 27 out. 2012.

MOLLO, M. R.; RUMPF, R.; MARTINS, A. C.; MATTOS, M. C. C.; LOPES JR, G.; CARRIJO, L. H. D.; SARTORI, R. Função Ovariana em novilhas Nelore Submetidas a Baixa ou Alta Ingestão Alimentar. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 35, p. s958, 2007. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Função>>

o+Ovariana+em+novilhas+Nelore+Submetidas+a+Baixa+ou+Alta+Ingestão+Alimentar#0>. Acesso em: 17 nov. 2012.

MONTEIRO, F. M.; MELO, D. S.; FERREIRA, M. M. G.; CARVALHO, L. M.; SARTORELI, E. S.; EDERHARDT, B. G.; NOGUEIRA, G. P.; BARROS, C. M. LH surge in Nelore cows (*Bos indicus*), after induced estrus or after ovarian superstimulation. *Animal Reproduction Science*, v. 110, n. 1-2, p. 128-138, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18313240>>. Acesso em: 27 mar. 2013.

MOSSA, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J. K.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G. W.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J. Evidence that high variation in antral follicle count during follicular waves is linked to alterations in ovarian androgen production in cattle. *Reproduction*, v. 140, n. 5, p. 713-720, nov. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20699380>>. Acesso em: 21 set. 2012.

MURPHY, M. G.; ENRIGHT, W. J.; CROWE, M. A.; MCCONNELL, K.; SPICER, L. J.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 92, p. 333-338, 1991. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/92/2/333.short>>. Acesso em: 19 nov. 2012.

NASCIMENTO, V. A.; NUNES, S. C.; DINIZ, E. G.; GUIMARÃES, E. C.; DIAS, M. Avaliação morfofisiológica do corpo lúteo em novilhas mestiças receptoras de embriões. *46 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, n. Cl, p. 5-7, 2009.

NOGUEIRA, G. P. Puberty in South American *Bos indicus* (Zebu) cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, p. 361-372, jul. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15271466>>. Acesso em: 16 nov. 2012.

NOGUEIRA, M. F. G.; BURATINI JR, J.; PRICE, C. A.; CASTILHO, A. C. S.; PINTO, M. G. L.; BARROS, C. M. Expression of LH Receptor mRNA Splice Variants in Bovine Granulosa Cells: Changes With Follicle Size and Regulation by FSH In Vitro. *Molecular Reproduction and Development*, v. 74, p. 680-686, 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.20656/abstract>>. Acesso em: 21 set. 2012.

OKUMU, L. A.; FORDE, N.; FAHEY, A. G.; FITZPATRICK, E.; ROCHE, J. F.; CROWE, M. A.; LONERGAN, P. The effect of elevated progesterone and pregnancy status on mRNA expression and localisation of progesterone and oestrogen receptors in the bovine uterus. *Reproduction*, v. 140, n. 1,

p. 143-153, jul. 2010. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20403910>>. Acesso em: 27 mar. 2013.

PARR, R. A.; DAVIS, I. F.; MILES, M. A.; SQUIRES, T. J. Liver blood flow and metabolic clearance rate of progesterone in sheep. *Research Veterinary Science*, v. 55; p. 311-316, 1993.

PERERA, B. M. A. O. Reproduction in domestic buffalo. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43 Suppl 2, p. 200-206, jul. 2008. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18638124>>. Acesso em: 21 set. 2012.

PERERA, B. M. A. O. Reproductive cycles of buffalo. *Animal Reproduction Science*, v. 124, n. 3-4, p. 194-199, abr. 2011. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20869822>>. Acesso em: 6 nov. 2012.

PERERA, B. M. A. O.; DE SILVA, L. N. A.; KURUWITA, V. Y.; KARUNARATNE, A. M. Postpartum ovarian activity, uterine involution and fertility in indigenous buffaloes at a selected village location in Sri Lanka. *Animal Reproduction Science*, v. 14, n. 2, p. 115-127, ago. 1987. Disponível em:  
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0378432087900911>>.

PINHEIRO, O. L.; BARROS, C. M.; FIGUEIREDO, R. A.; VALLE, E. R.; ENCARNAÇÃO, R. O.; PADOVANI, C. R. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus of estrus induced with prostaglandin F<sub>2α</sub> or norgestomet and estradiol valerate. *Theriogenology*, v. 49, p. 667-681, 1998.

PRESICCE, G. A. Reproduction in the water buffalo. *Reproduction in domestic animals*, v. 42 Suppl 2, p. 24-32, set. 2007. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17688599>>.

PRESICCE, G. A.; SENATORE, E. M.; BELLA, A.; DE SANTIS, G.; BARILE, V. L.; DE MAURO, G. J.; TERZANO, G. M.; STECCO, R.; PARMEGGIANI, A. Ovarian follicular dynamics and hormonal profiles in heifer and mixed-parity Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*) following an estrus synchronization protocol. *Theriogenology*, v. 61, n. 7-8, p. 1343-1355, maio 2004. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15036967>>. Acesso em: 17 nov. 2012.

PRICE, C. A.; CARRIÈRE, P. D. Alternate two-and three-follicle wave interovulatory intervals in Holstein heifers monitored for two consecutive estrous cycles. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 84, p. 145-147,

2004. Disponível em: <<http://pubs.aic.ca/doi/abs/10.4141/A03-094>>. Acesso em: 16 nov. 2012.

PRIME, G. R.; SYMONDS, H. W. Influence of plane of nutrition on portal blood flow and the metabolic clearance rate of progesterone in ovariectomized gilts. *Journal of Agriculture Science*, v. 121, p. 389-397, 1993.

RHODES, F. M.; DE'ATH, G.; ENTWISTLE, K. W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. *Animal Reproduction Science*, v. 38, n. 4, p. 265-277, maio 1995. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/037843209401375V>>.

RIVERA, G. M.; FORTUNE, J. E. Proteolysis of Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins -4 and -5 in Bovine Follicular Fluid: Implications for Ovarian Follicular Selection and Dominance. *Endocrinology*, v. 144, n. 7, p. 2977-2987, 19 mar. 2003. Disponível em: <<http://endo.endojournals.org/cgi/doi/10.1210/en.2002-0077>>. Acesso em: 21 set. 2012.

RODRIGUES, H. D.; KINDER, J. E.; FITZPATRICK, L. A. Estradiol regulation of luteinizing hormone secretion in heifers of two breed types that reach puberty at different ages. *Biology of Reproduction*, v. 66, n. 3, p. 603-609, mar. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11870064>>.

SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D. K.; SARTORI, R.; ARMENTANO, L. E.; WILTBANK, M. C. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 beta in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p. 2831-2842, 2002.

SARTORELLI, E. S.; LUCIANO, M. C.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J.; BARROS, C. M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology*, v. 63, n. 9, p. 2382-2394, jun. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15910921>>. Acesso em: 16 nov. 2012.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J. M.; SHAVER, R. D.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M. C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *Journal of Dairy Science*, v. 87, n. 4, p. 905-920, abr. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15259225>>.

SARTORI, R.; FRICKE, P. M.; FERREIRA, J. C. P.; GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biology of Reproduction*, v. 65, n. 5, p. 1403-1409,

nov. 2001. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11673256>>.

SARTORI, R.; BASTOS, M. R.; BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; ERENO, R. L.; BARROS, C. M. Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. *Society of Reproduction and Fertility supplement*, v. 67, p. 357-375, jan. 2010. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21755684>>.

SARTORI, R.; BARROS, C. M. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 124, n. 3-4, p. 244-250, abr. 2011.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21388755>>.

Acesso em: 10 out. 2012.

SARTORI, R.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M. C. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science*, v. 85, n. 11, p. 2813-2822, nov. 2002. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12487448>>. Acesso em: 27 jan. 2013.

SCARAMUZZI, R. J.; BAIRD, D. T.; CAMPBELL, B. K.; DRIANCOURT, M. - A.; DUPONT, J.; FORTUNE, J. E.; GILCHRIST, R. B.; MARTIN, G. B.; MCNATTY, K. P.; MCNEILLY, A. S.; MONGET, P.; MONNIAUX, D.; VIÑOLES, C.; WEBB, R. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reproduction, Fertility, and Development*, v. 23, n. 3, p. 444-467, jan. 2011. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21426863>>.

SICHTAR, J.; TOLMAN, R.; RAJMON, R.; KLABANOVÁ, P.; BERKA, P.; VOLEK, J. A comparison of the follicular dynamics in heifers of the Czech Fleckvieh and Holstein breeds. *Czech J Anim Sci*, v. 55, n. 6, p. 234-242, 2010.

SILVA-SANTOS, K. C.; SANTOS, G. M. G.; SILOTO, L. S.; HERTEL, M. F.; ANDRADE, E. R.; RUBIN, M. I. B.; STURION, L.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle.

*Theriogenology*, v. 76, n. 6, p. 1051-7, 1 out. 2011. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21722949>>. Acesso em: 17 nov. 2012.

SIMÕES, R. A. L. A.; SATRAPA, R. A.; ROSA, F. S.; PIAGENTINI, M.; CASTILHO, A. C. S.; ERENO, R. L.; NOGUEIRA, M. F. G.; BURATINI JR, J.; BARROS, C. M. Follicular diameter, ovulation rate, and LH receptor gene expression in nellore cows. *Reproduction, fertility, and development*, v. 22, p. 270-271, 2010.

SIROIS, J.; FORTUNE, E. Ovarian Follicular Dynamics during the Estrous Cycle in Heifers Monitored by Real-Time Ultrasonography. *Biology of Reproduction*, v. 39, p. 308-317, 1988.

SOTO-SUAZO, M.; ZORN, T. M. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. *Animal Reproduction*, v. 2, n. 3, p. 147-160, 2005.

SPICER, L. J. Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: a control mechanism for selection of dominant follicles. *Biology of reproduction*, v. 70, n. 5, p. 1223-30, maio 2004. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14668213>>. Acesso em: 2 dez. 2012.

STAHRRINGER, R. C.; NEUENDORFF, D. A.; RANDEL, R. D. Seasonal variations in characteristics of estrous cycles in pubertal Brahman heifers. *Theriogenology*, v. 34, n. 2, p. 407-415, 1990. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X9090532X>>. Acesso em: 27 mar. 2013.

TANAKA, Y.; NAKADA, K.; MORIYOSHI, M.; SAWAMUKAI, Y. Appearance and number of follicles and change in the concentration of serum FSH in female bovine fetuses. *Reproduction*, v. 121, n. 5, p. 777-82, maio 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11427166>>.

TOWNSON, D.H.; TSANG, P. C. W.; BUTLER, W. R.; FRAJBLAT, M.; GRIEL, L. C.; JOHNSON, C. J.; MILVAE, R. A.; NIKSIC, G. M.; PATE, J. L.

Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. *Journal of Animal Science*, v. 80, p. 1053-1058, 2002. Disponível em: <<http://www.journalofanimalscience.org/content/80/4/1053.short>>. Acesso em: 17 nov. 2012.

VASCONCELOS, J. L. M.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H. N.; GUENTHER, J. G.; WILTBANK, M. C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*, v. 56, n. 2, p. 307-14, 15 jul. 2001. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11480622>>.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A. FOLLICULAR DYNAMICS IN ZEBU CATTLE. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 35, n. 12, p. 2501-2509, 2000. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-204X2000001200021&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-204X2000001200021&script=sci_arttext)>. Acesso em: 19 nov. 2012.

VIANA, J. H. M.; PALHAO, M. P.; SIQUEIRA, L. G. B.; FONSECA, J. F.; CAMARGO, L. S. A. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum

pick-up. *Theriogenology*, v. 73, n. 7, p. 966-72, 15 abr. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20071017>>. Acesso em: 21 set. 2012.

VINOLES, C.; FORSBERG, M.; MARTIN, G. B.; CAJARVILLE, C.; REPETTO, J.; MEIKLE, A. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. *Theriogenology*, v. 51, p. 1351-1361, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X99000795>>. Acesso em: 27 mar. 2013.

WALKER, W. L.; NEBEL, R. L.; MCGILLIARD, M. L. Time of ovulation relative to mounting activity in dairy cattle. *Journal of dairy science*, v. 79, n. 9, p. 1555-61, set. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8899521>>.

WASHBURN, S. P.; SILVIA, W. J.; BROWN, C. H.; MCDANIEL, B. T.; MCALLISTER, A. J. Trends in reproductive performance in southeastern Holstein and Jersey DHI herds. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p. 244-251, 2002.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; GONG, J. -G.; ARMSTRONG, D. G. Control of follicular growth : Local interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science*, v. 82, n. E-Suppl, p. E63-E74, 2004. Disponível em: <[http://www.animal-science.org/content/82/13\\_suppl/E63.short](http://www.animal-science.org/content/82/13_suppl/E63.short)>. Acesso em: 28 out. 2012.

WEBB, R.; CAMPBELL, B. K.; GARVERICK, H. A.; GONG, J. G.; GUTIERREZ, C. G.; ARMSTRONG, D. G. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, v. 54, p. 33-48, jan. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10692843>>.

WILTBANK, M. C.; LOPEZ, H.; SARTORI, R.; SANGSRITAVONG, S.; GÜMEN, A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*, v. 65, p. 17-29, 2006.

WILTBANK, M. C.; SOUZA, A. H.; CARVALHO, P. D.; BENDER, R. W.; NASCIMENTO, A. B. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. *Reproductive Fertility and Development*, v. 24, n. 1, p. 238-243, 2011.

WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Animal reproduction science*, v. 60-61, p. 535-47, 2 jul. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10844222>>.

WOLFENSON, D.; INBAR, G.; ROTH, Z.; KAIM, M.; BLOCK, A.; BRAW-TAL, R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology*, v. 62, n. 6, p. 1042-55, 15 set. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15289046>>. Acesso em: 28 out. 2012.

YINDEE, M.; TECHAKUMPHU, M. T.; LOHACHIT, C.; SIRIVAIDYAPONG, S.; NA-CHIANGMAI, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; VAN DER WEYDEN, G. C.; COLENBRANDER, B. Follicular dynamics and oestrous detection in Thai postpartum swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Reproduction in domestic animals*, v. 46, n. 1, p. e91-6, fev. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20546176>>. Acesso em: 17 nov. 2012.

**APÊNDICES**

**Apêndice A** – Componentes da alimentação (volumoso + concentrado) fornecido para as novilhas Holandesas, Gir e Búfalas durante o período de adaptação e período experimental.

<b>Formulação do Concentrado</b>			
	<b>% Dieta Total</b>	<b>% Concentrado</b>	<b>Batida de 250kg</b>
<b>Milho Fubá</b>	14.77	45.58	113.95
<b>Farelo de Soja</b>	13.63	41.08	102.69
<b>Uréia</b>	1.50	4.11	10.28
<b>Sulfato de Amônio</b>	0.66	1.89	4.73
<b>Fosfato Bicalcico</b>	0.70	1.96	4.89
<b>Calcário</b>	0.70	2.38	5.95
<b>Sal Comum</b>	0.34	0.91	2.28
<b>Premix</b>	0.70	2.09	5.22
<b>TOTAL 1</b>	33.00	100.00	250.00
<b>Cana de açúcar</b>	67.00		
<b>TOTAL GERAL</b>	100.00		

**Apêndice A** – Quantidade de matéria seca (MS) e quantidade total de cada componente da ração (volumoso + concentrado) fornecida por kg/dia para novilhas Holandesas, Gir e Búfalas durante o período de adaptação e período experimental.

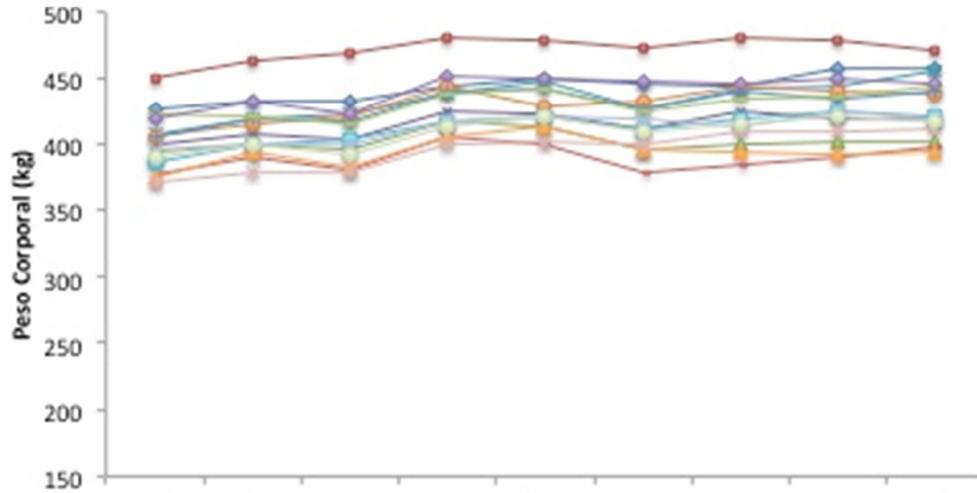
Alimento	MS (kg/dia)	Fornecido (kg/dia)
Cana de Açúcar	5,352	18
Fubá de Milho	1,179	1,341
Farelo de Soja	1,089	1,228
Ureia	0,121	0,122
Sulfato de Amônia	0,054	0,054
Fosfato Bicalcico	0,056	0,058
Calcário	0,056	0,056
Sal Comum	0,027	0,027
Premix	0,056	0,057

**Apêndice A** – Análise nutricional da ração fornecida (volumoso + concentrado), calculada sob a matéria seca total

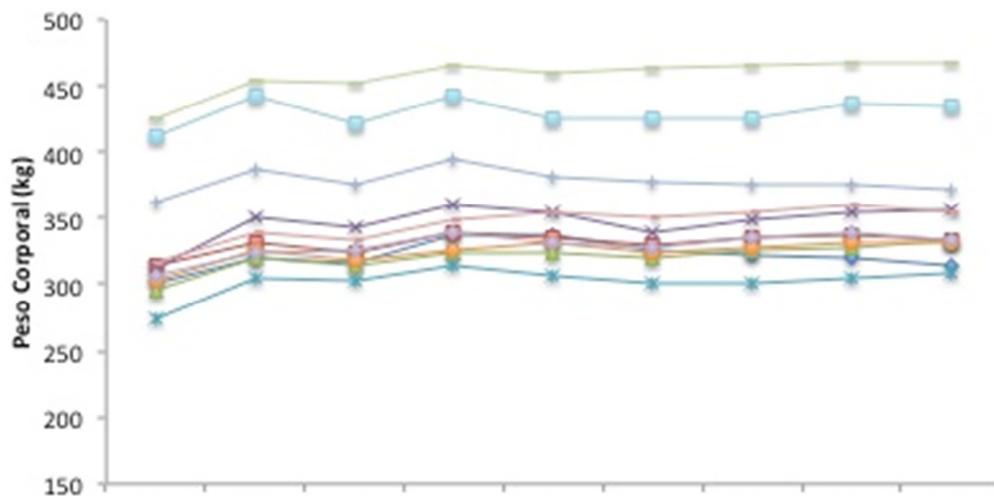
Ingredientes	Quantidade
Ração MS	38%
Proteína Bruta	14,2%
NDF	41,8%
Proteína Solúvel	60%
Ca	0,68%
P	0,44%
Energia Metabolizável	2,21 (Mcal/kg MS)

**Apêndice B** – Peso corporal de novilha (A) Holandesas, (B) Gir e (C) Bubalinas ao longo do período do experimento. Cada linha representa uma fêmea. Holandesa N=14; Gir N=10; Búfala N=15.

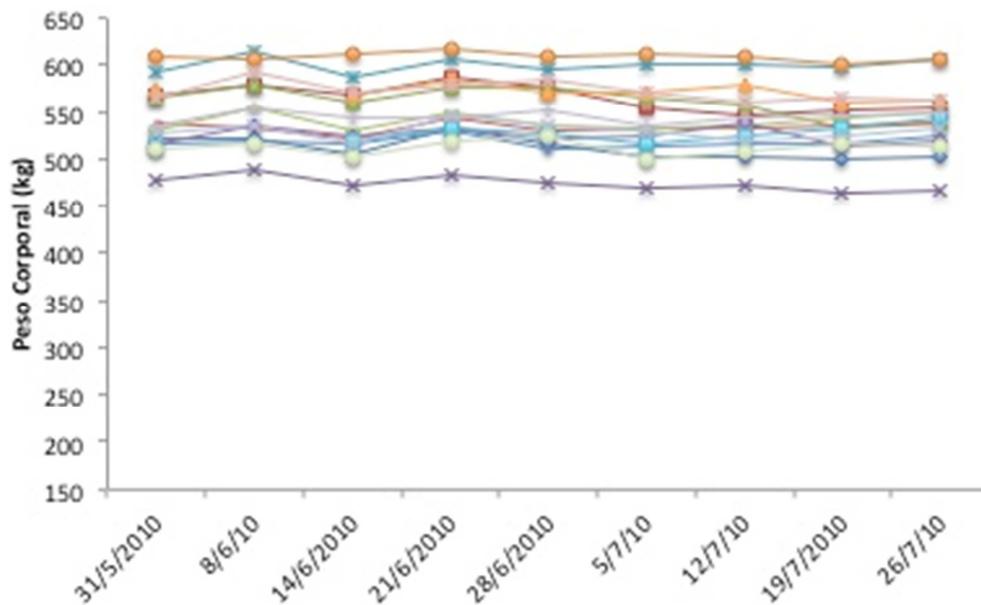
**A**



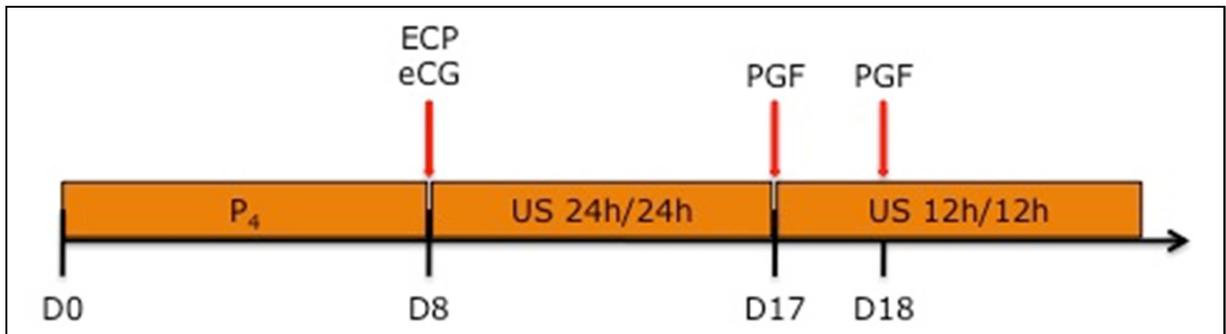
**B**



**C**



**Apêndice C** – Representação esquemática do protocolo hormonal e dos intervalos das avaliações ultrasonográficas realizado em 6 novilhas Gir



Legenda:

D0: dia inicial do protocolo

D8: dia da retirada do implante e administração de ECP e eCG

D17 e D18: dias da administração de PGF

P<sub>4</sub>: implante vaginal de progesterona utilizado previamente 1 vez

ECP: Cipionato de Estradiol. Dose por animal: 0,5 mg

eCG: Gonadotrofina Coriônica Equina. Dose por animal: 400UI

PGF: Prostaglandina F2α. Dose por animal: 12,5 mg

US 24h/24h: exames de ultrassom realizados uma vez ao dia após D8

US 12h/12h: exames de ultrassom realizados duas vezes ao dia após D17

## ApêndiceC

Quadro 1 – Lista das variáveis resposta calculadas para todas as novilhas Holandesas, Gir e Búfalas no Experimento 1 e Experimento 2. Valores estão apresentados em média ± EPM. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para  $P < 0,05$

(Continua)

EXPERIMENTO 1						
Variáveis	Holandesa (N=14)	Gir (N=5)	Búfala (N=15)	P>F	unid.	
Diâmetro do primeiro folículo ovulatório	14,5±0,45	13,3±0,76	13,1±0,45	0,073	mm	b
Intervalo Inter-Ovulatório	22,3±0,65	22,1±0,95	23,8±0,63	0,208	dias	
Número de ondas	2,6±0,17	3,4±0,24	2,8±0,11	0,0242	ondas	a
Numero de folículos presentes no dia da primeira ovulação	26,1±1,7	66,2±15,9	22,7±1,91	0,0039	folículos (<5 mm)	a
Diâmetro do FD1	15,8±0,66	12,3±0,32	12,1±0,03	<0,0001	mm	b
Taxa de Crescimento do FD1	1,4±0,10	1,2±0,52	1,0±0,35	0,03	mm/dia	b
Dia da emergência da segunda onda (animais com 3 e 4 ondas)	7,6±0,44	6,2±0,20	7,9±0,55	0,04	dia	b
Diâmetro do FD2 (animais com 3 e 4 ondas)	11,8±0,73	9,4±0,52	10,6±0,31	0,0377	mm	ab
Taxa de crescimento do FD2	1,44±0,14	1,14±0,25	1,16±0,23	0,539	mm/dia	a
Dia da emergência da onda ovulatória	13,3±1,05	15,2±1,01	14,8±1,03	0,4696	dia	
Diâmetro do folículo ovulatório	15±0,33	13,7±0,74	13,5±0,46	0,039	mm	b
Taxa de crescimento do folículo ovulatório	1,34±0,06	1,23±0,38	1,25±0,37	0,2901	mm/dia	
Duração da dominância do FD1 (até emergência da onda 2)	8,0±0,49	5,2±1,07	8,1±0,44	0,013	dias	a
Duração da dominância do FD2 (3 a 4 ondas)	7,3±0,67	7,0±0,58	8,6±0,79	0,3625	dias	
Duração do crescimento do folículo ovulatório	8,5±0,54	6,1±0,83	8,4±0,67	0,1167	dias	ab
Diâmetro máximo do CL	26,8±0,54	22,3±0,98	19,5±0,32	<0,0001	mm	b
Taxa de crescimento do diâmetro do CL	2,3±0,18	1,6±0,32	0,9±0,10	<0,0001	mm/dia	b
Volume máximo do CL	8.081,3±716,56	5.972,1±833,33	3.919,2±185,72	<0,0001	mm <sup>3</sup>	c

Quadro 1 – Lista das variáveis resposta calculadas para todas as novilhas Holandesas, Gir e Búfalas no Experimento 1 e Experimento 2. Valores estão apresentados em média ± EPM. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para  $P < 0,05$

EXPERIMENTO 1						
Variáveis	Holandesa	Gir	Búfala	P > F	unid.	
Taxa de crescimento do volume do CL	1.379,5±150,95	a 721,1±193,76	b 298±33,55	c <0,0001	mm <sup>3</sup> /dia	
Concentração máxima de P4	7,7±0,33	a 8,0±0,85	a 5,3±0,28	b <0,0001	ng/ml	
Taxa de crescimento da P4	0,7±0,05	a 0,8±0,05	a 0,4±0,03	b <0,0001	ng/ml/dia	
Duração da fase luteínica	18,0±0,54	16,8±0,86	18,1±0,50	0,4106	dias	
Dia da concentração máxima de P4	14,1±0,50	13,8±16,52	14,7±0,77	0,7153	dia	
Dia da Luteólise	18,0±0,54	16,8±0,86	18,1±0,50	0,4106	dia	
Intervalo Luteólise - Emergência da onda ovulatória	4,7±0,67	a 1,6±0,93	b 3,4±0,77	ab 0,0417	dias	
Intervalo Luteólise - Ovulação	4,3±0,17	a 5,3±0,73	b 5,6±0,30	b 0,0012	dias	
Diâmetro do folículo ovulatório na luteólise	10,1±0,74	a 6,4±1,03	b 7,2±0,68	b 0,0077	mm	
Média da Concentração de Testosterona nos 13 primeiros dias	5,2±0,11	a 5,2±0,2	a 3,9±0,1	b <0,0001	pg/ml	
Numero de folículos presentes no dia da segunda ovulação	30,2±3,08	a 74,2±18,8	b 27,1±2,8	a 0,0005	folículos	
Média da Concentração de Insulina (luteínica +folicular)	4,1±0,67	a 9,0±2,15	b 6,0±0,52	b 0,0045	mUI/ml	
EXPERIMENTO 2						
Variáveis	Holandesa (N=14)	Gir (N=10)	Búfala (N=15)	P > F	unid.	
Momento do desvio	42,8±3,71	52,0±5,29	43,5±4,5	0,2995	horas	
Diâmetro do FD no desvio	7,9±0,33	a 7,0±0,32	b 6,8±0,19	b 0,0315	mm	
Taxa de crescimento do FD	0,9±0,10	a 0,7±0,10	a 0,7±0,15	a 0,1667	mm/dia	
Diâmetro do FS no desvio	7,0±0,27	a 6,2±0,28	a 6,3±0,29	a 0,1067	mm	
Taxa de crescimento do FS	0,8±0,10	a 0,6±0,09	ab 0,5±0,10	b 0,1261	mm/dia	
Média da concentração de IGF-I no FF	125,9±10,66	a 125,7±5,98	a 182,4±9,98	b <0,0001	ng/ml	

Quadro 2 - Lista das variáveis resposta calculadas para as novilhas Holandesas, Gir e Búfalas com padrão de 3 ondas folliculares no Experimento 1. Valores estão apresentados em média  $\pm$  EPM. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para  $P < 0,05$

(Continua)

Variáveis	Holandesa (N=6)	Gir (N=3)	Búfala (N=11)	P>F	unid.
Dia da emergência da segunda onda	7,7 $\pm$ 0,56	6,3 $\pm$ 0,33	7,9 $\pm$ 0,55	0,34	dia
Dia da emergência da onda ovulatória	16,2 $\pm$ 0,91	14,0 $\pm$ 0,58	16,5 $\pm$ 0,69	0,24	dia
Numero de folículos presentes no dia da primeira ovulação	30,2 $\pm$ 3,84	51,7 $\pm$ 22,98	24,9 $\pm$ 2,00	0,11	folículos
Numero de folículos presentes no dia da segunda ovulação	31,8 $\pm$ 4,23	62,3 $\pm$ 27,16	29,6 $\pm$ 3,02	0,13	folículos
Diâmetro do FD1	16,3 $\pm$ 0,51	12,6 $\pm$ 0,41	12,1 $\pm$ 0,34	<0,0001	mm
Diâmetro do FD2	13,0 $\pm$ 0,52	9,6 $\pm$ 0,77	10,6 $\pm$ 0,32	0,0006	mm
Diâmetro do folículo ovulatório	14,4 $\pm$ 0,61	13,5 $\pm$ 1,27	13,5 $\pm$ 0,55	0,6057	mm
Duração da dominância do FD1	7,7 $\pm$ 0,56	6,3 $\pm$ 0,33	7,9 $\pm$ 0,55	0,33	mm
Duração da dominância do FD2	8,5 $\pm$ 0,43	7,3 $\pm$ 0,67	8,5 $\pm$ 0,72	0,62	dias
Duração do crescimento do folículo ovulatório	7,0 $\pm$ 0,48	6,7 $\pm$ 1,17	7,5 $\pm$ 0,62	0,73	dias
Diâmetro máximo do CL	26,3 $\pm$ 0,34	22,8 $\pm$ 1,59	19,5 $\pm$ 0,37	<0,0001	mm
Volume máximo do CL	9.553,6 $\pm$ 376,20	6.388,0 $\pm$ 1.378,12	3.945,8 $\pm$ 208,89	<0,0001	mm <sup>3</sup>
Concentração máxima de P4	7,7 $\pm$ 0,34	9,8 $\pm$ 0,72	5,6 $\pm$ 0,24	<0,0001	ng/ml
Concentração máxima de P4	14,3 $\pm$ 0,88	13,0 $\pm$ 1,53	15,5 $\pm$ 0,72	0,24	dia
Duração da fase luteínica (até luteólise)	19,2 $\pm$ 0,31	16,3 $\pm$ 1,20	18,7 $\pm$ 0,49	0,04	dia
Intervalo Luteólise - Emergência da onda ovulatória	3,0 $\pm$ 0,77	2,3 $\pm$ 1,45	2,3 $\pm$ 0,63		dias
Intervalo Luteólise - Ovulação	4,4 $\pm$ 0,30	4,8 $\pm$ 0,44	5,9 $\pm$ 0,34	0,02	dias
Diâmetro do folículos ovulatório na luteólise	8,5 $\pm$ 1,26	7,2 $\pm$ 1,68	6,3 $\pm$ 0,59	0,26	mm
Taxa de Crescimento do FD1	1,9 $\pm$ 0,13	3,0 $\pm$ 0,70	4,4 $\pm$ 0,42	0,0002	mm/dia
Taxa de crescimento do FD2	1,2 $\pm$ 0,17	3,2 $\pm$ 0,21	3,5 $\pm$ 0,23	<0,0001	mm/dia

Quadro 2 - Lista das variáveis resposta calculadas para as novilhas Holandesas, Gir e Búfala com padrão de 3 ondas foliculares no Experimento 1. Valores estão apresentados em média  $\pm$  EPM. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para  $P < 0,05$

Variáveis	(Conclusão)					
	Holandesa	Gir	Búfala	P > F	unid.	
Taxa de crescimento do folículo ovulatório	1,5 $\pm$ 0,07	3,1 $\pm$ 0,36	3,0 $\pm$ 0,34	b	0,0003	mm/dia
Taxa de crescimento do diâmetro do CL	2,2 $\pm$ 0,07	1,5 $\pm$ 0,43	1,0 $\pm$ 0,11	b	<0,0001	mm/dia
Taxa de crescimento do volume do CL	1.239,5 $\pm$ 57,63	715,1 $\pm$ 319,88	301,2 $\pm$ 38,57	b	<0,0001	mm <sup>3</sup> /dia
Taxa de crescimento da P4	0,7 $\pm$ 0,04	0,8 $\pm$ 0,09	0,4 $\pm$ 0,03	a	<0,0001	ng/ml/dia
Intervalo Inter-Ovulatório	23,6 $\pm$ 0,47	21,2 $\pm$ 1,09	24,6 $\pm$ 0,57	ab	0,002	dias
Diâmetro do primeiro folículo ovulatório	14,4 $\pm$ 0,53	14,0 $\pm$ 0,32	13,2 $\pm$ 0,39	a	0,17	mm