

LINDSAY UNNO GIMENES

*Estudo da divergência folicular e da capacidade
ovulatória em bubalinos (*Bubalus bubalis*) e zebuínos
(*Bos indicus*)*

São Paulo
2006



LINDSAY UNNO GIMENES

**Estudo da divergência folicular e da capacidade ovulatória
em bubalinos (*Bubalus bubalis*) e zebuínos (*Bos indicus*)**

Dissertação 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 Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

São Paulo
2006

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1725
FMVZ

Gimenes, Lindsay Unno

Estudo da divergência folicular e da capacidade ovulatória em bubalinos (*Bubalus bubalis*) e zebuínos (*Bos indicus*) / Lindsay Unno Gimenes. – São Paulo: L. U. Gimenes, 2006.

113 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2006.

Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. Divergência folicular. 2. Capacidade ovulatória.
3. Bubalinos. 4. *Bos indicus*. I. Título.

ERRATA				
Folha	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
47		1	foram 7,7% e	foram <16,0%
47		2	51% , respectivamente.	13,4%, respectivamente.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da divergência folicular em fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*)", Protocolo nº433/2004, utilizando 15 búfalos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendun".

(We certify that the Research "Follicular deviation in buffaloes (*Bubalus bubalis*)" protocol number 433/2004, utilizing 15 buffaloes, under the responsibility of Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendun", meeting.

São Paulo, 30 de julho de 2004


Prof.^a Dr.^a Julia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GIMENES, Lindsay Unno

Título: Estudo da divergência folicular e da capacidade ovulatória em bubalinos (*Bubalus bubalis*) e zebuínos (*Bos indicus*)

Dissertação 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 Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Assinatura: _____

Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Assinatura: _____

Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Assinatura: _____

Instituição: _____
Julgamento: _____

*Aos meus queridos pais, Dayton e Emília,
por serem o meu porto-seguro. Por todo
amor, apoio, incentivo, dedicação e
alegrias que nunca me deixaram faltar*

*Ao melhor presente que meus pais puderam
me dar: meu “irmãozinho” Vinícius, pela
tranqüilidade, paciência, apoio e amizade*

*Aos meus estimados avô Seledônio e
batchan Yuki, pelo exemplo de sabedoria e
serenidade (in memoriam)*

*Aos meus falecidos ditchan Kyuji e avó
Júlia, dos quais infelizmente não tenho
lembranças, mas a quem também dedico
meu respeito e carinho*

AGRADEÇO

À Deus, por ter me proporcionado uma vida maravilhosa! Que diante das minhas dúvidas e descrença me mostrou que Ele realmente existe e que podemos contar com Ele SEMPRE.

À toda a minha família, pelo incentivo e por me mostrar o que é certo, na tentativa de me tornar uma pessoa melhor.

Ao Professor Titular Pietro Sampaio Baruselli, exemplo de dedicação ao trabalho e integridade científica, por ter me recebido e me dado a oportunidade de ser sua orientada, pelos conselhos, paciência e amizade.

À todos os professores do Departamento de Reprodução Animal, em especial ao Prof. Titular Renato Campanarut Barnabé pelo incrível amor ao ensino e à pesquisa, ao Prof. Titular José Antônio Visintin, pelo humanismo, profissionalismo e amizade, à Prof^ª. Dr^ª. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção e à Prof^ª. Dr^ª. Camila Infantosi Vannuchi, pela amizade e pelos conselhos, ao Prof. Dr. Mário Binelli e ao Prof. Dr. Ed Hoffman Madureira, pela colaboração nos experimentos e pelas mentes brilhantes, que tanto admiro.

Aos amigos Nélcio Antônio Tonizza de Carvalho e Manoel Francisco de Sá Filho, pela enorme colaboração no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada pelos conselhos profissionais e pessoais e por terem deixado de lado seus compromissos em meu favor.

Aos amigos "Pietrinhos": Nélcio Antonio Tonizza de Carvalho, Everton Luiz Reis, Manoel Francisco de Sá Filho, José Ribamar de Souza Torres Júnior, Henderson Ayres, Claudiney Melo Martins, Alexandre Henryly de Souza, Márcio Leão Ferraz, Ana Paula Mantovani, Sabrina Mogentale, pelo convívio, pelas conversas científicas... ou não, pelos fins de tarde "tomando uma", pela compreensão nos momentos de choro (que não foram poucos) e principalmente pelas inúmeras risadas! Por me ensinarem um pouco do que é saber e outro pouco do que é viver...

Aos estagiários Lucas (Sônia), Rafael (Vergalho), Layza e Marianne que me auxiliaram nos experimentos desta Dissertação, e ao Gustavo (Piraju), Miriam (Tonhão), Fernanda (Jeba), Cássia (Titika), Marina (Kuki) e Téo, pela ajuda nos outros projetos ao longo do meu Mestrado.

Aos Doutores e PqCIII da APTA João B. P. de Carvalho e Roberto H. Reichert, pelo apoio no presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Ciro Moraes Barros, à Prof^ª. Luzia Trinca e ao Doutorando Evandro Sartorelli e Sartorelli, pelo auxílio na análise estatística da divergência folicular.

Ao Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira por oferecer o Laboratório de Endocrinologia para as dosagens hormonais deste estudo.

À Doutoranda Maria Paula Beltran pela realização dos ensaios de gonadotrofinas, mas principalmente por sua amizade e pelos momentos divertidos em Araçatuba juntamente com Daniel, Zanon, Laércio (Juca), Cris, Paloma e Ilka. Também não poderia deixar de manifestar meus agradecimentos à Márcia, Ju, Jana e Carol.

À técnica de laboratório Dê, pelas dosagens hormonais e simpatia.

Aos Médicos Veterinários e amigos Fernando Vannucci (Tordilho) e Renato Amaral (Oreia) pela grande ajuda na parte experimental e na obtenção de animais para a condução deste projeto de pesquisa.

Aos bubalinocultores José Carlos Fernandes, Carlos Hermann Martins e Wilma Penteado pela concessão dos animais e/ou de suas propriedades, sem os quais o presente estudo não teria se concretizado.

Ao Presidente da Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB) pelas conversas e pela seriedade que empenha em sua função. Aos funcionários da ABCB, Marlene e Glaiisson, pela competência.

Aos funcionários Zé (Fazenda Várzea Grande), Bastião (APTA de Registro), Cocho, Mané, Zé, Zeca, Caio e Otávio (Fazenda Santo Antônio dos Três Rios), Ismael, Paulinho (Gado de Corte - Santa Maria - Pirassununga), Seu Valdomiro, Didi (APTA de Pindamonhangaba), José Eduardo (Dorico), Carlinhos e Laerte (Fazenda Santa Eliza), pelo auxílio na realização dos experimentos.

Aos amigos do departamento Aníbal, Camilla,, Cris, José Sérgio (Zeca), Karina, Liege, Lílian, Marcel (Febem), Marcella (Mazão), Marcílio, Mari, Marie, Nani, Paola, Paulo, Priscila, Tatiana, Viviane e Weber, pela agradável convivência.

Às amigas Alê Nicácio e Rê Simões por me proporcionarem diversão diária, além de serem minhas companheiras de garfo e copo e por serem minhas conselheiras aqui em São Paulo.

Aos amigos de Pirassununga durante o pequeno tempo que passei por aí: Alexandre (Alemão), André (Simprão), Andrezinho, Carlinha, Cláudio (Speto), Claudinha, Eduardo (Mineiro/ Carioca), Fernandinho, Francine, Ju, José Rodrigo, Pati, Sidney, Simone, Sylvinha, Vanis e Whipet.

À secretária de pós-graduação Harumi Shiraishi pela enorme eficiência, competência e por sempre responder às minhas incontáveis dúvidas.

Às secretárias Thais Soto pela dedicação e solicitude e Maria Alice Machado pelos favores prestados.

Aos demais funcionários do VRA, em especial à Dona Sílvia e Neide pela enorme simpatia e tranqüilidade que compartilham conosco todos os dias, e também ao Miguel, Isabel Barbosa e Cleusa.

À bibliotecária Elza Faquim, pelas orientações na redação deste trabalho dentro das instruções normativas.

Às secretárias de pós-graduação Deise, Joana, Claudia e Sandra pelos favores prestados.

À Tecnopec, em especial à Isabel, e à Bioniche, em especial a Reuben Mapletoft, pela doação de fármacos para a realização dos experimentos de capacidade ovulatória.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo indispensável suporte financeiro concedido através de bolsa de Mestrado (Processo: 03/10203-4).

Ao lugar onde tudo começou: Departamento de Reprodução Animal - FMVZ - UNESP - Botucatu. Não posso nunca deixar de agradecer aos professores Prof. Dr. Cezinande de Meira, Prof^{ta}. Dr^a. Eunice Oba, Prof^{ta}. Dr^a. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga, Prof. Dr. Frederico Ozanan Papa, Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira, Prof. Dr. Marco Antônio Alvarenga, Prof^{ta}. Dr^a. Maria Denise Lopez, Prof. Dr. Nereu Carlos Prestes e Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo, por toda a orientação, incentivo e apoio que sempre me dedicaram.

Ao Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira, meu orientador durante a graduação, que colaborou de maneira fundamental na minha formação científica e como pessoa .

Aos meus eternos amigos do período de Residência, Carlinha F. Moya, Karina Alberti, Camila de P. Freitas, Gustavo, Alexandre, Zé Del'Acqua, Leticia, Bigu, Lú Leal, Ian, Cely, Cris (Purg's), Brunna, Maria Júlia (Mutuka), Júlio, Eric, Zé, Marcela, Zé (Corvo), Youko (Arru), Hugo (Long), Raquel (Mety), Ju, Daniela (Xi), Paulo Vinicius (Pankeka), Andressa (Pepéia), Paula, Ricardo (Xicá), Fabiano (Lambi), Marúcio, Tháisa, Sílvia e Gi, por terem tornado aquele o melhor ano da minha vida!

À Madi, Carol e Gabi pelo companheirismo e amizade duradoura, apesar do tempo e da distância.

À XXXV, pelas saudades que tenho daquela época!

Às pessoas que colaboraram de alguma forma no decorrer deste projeto, e que porventura eu tenha esquecido devido ao tardar do horário...

À todos, muito obrigada!!!

“Se você pensa que pode ou sonha que pode, comece. A ousadia tem genialidade, poder e mágica. Ouse fazer, e o poder lhe será dado”

Goethe

“Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás. Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. Aprende que nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar se não fosse o medo de tentar. E que realmente a vida tem valor, e que você tem valor diante da vida!”

William Shakespeare

RESUMO

GIMENES, L. U. **Estudo da divergência folicular e da capacidade ovulatória em bubalinos (*Bubalus bubalis*) e zebuínos (*Bos indicus*)**. [Study of follicle deviation and ovulatory capacity in buffaloes (*Bubalus bubalis*) and zebu cattle (*Bos indicus*)]. 2006. 113 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

O presente estudo está apresentado em Capítulo 1 (Divergência folicular; DF) e 2 (Capacidade ovulatória), e em cada estão incluídos dois experimentos [1 – em bubalinos (*Bubalus bubalis*); 2 – em zebuínos (*Bos indicus*)]. Os objetivos do Capítulo 1 foram determinar o momento e diâmetro na DF e avaliar o perfil das concentrações plasmáticas de FSH e LH próximo à seleção folicular. No Experimento 1, a ovulação foi considerada o dia zero (D0), a partir do qual 10 novilhas Murrah foram examinadas por ultra-sonografia (US) a cada oito horas (h) até o D4 e, posteriormente, a cada 24h até o D6. A avaliação da DF foi realizada por análise visual do gráfico de cada novilha (Ginther et al., 1996) e regressão linear segmentada (Bergfelt et al. 2003). As amostras de sangue, para dosagem de FSH e LH, foram colhidas com intervalos de 8h nas primeiras 24h pós-ovulação. A partir deste momento foram feitas colheitas a cada 4h até o D4 e após, a cada 12h até o D6. No método visual, o intervalo ovulação-DF, e o diâmetro dos folículos dominante (FD) e subordinado (FS) foram de, respectivamente, 63,2±5,7h; 7,2±0,3mm e 6,4±0,3mm (média±EPM). No método matemático estes mesmos parâmetros foram de, respectivamente, 61,9±4,9h; 7,3±0,3mm e 6,3±0,3mm. Não houve diferença entre os dois métodos de avaliação da DF ($P>0,05$). As concentrações plasmáticas de FSH e LH não variaram ao longo do tempo ($P>0,05$). No Experimento 2, 12 novilhas Nelore foram submetidas à US a cada 12h até o D5 e estes mesmos intervalos foram adotados para as colheitas de sangue (dosagem de FSH e LH). No método visual, o intervalo ovulação-DF, e os diâmetros do FD e FS foram de, respectivamente, 61,0±5,8h; 6,2±0,2mm e 5,8±0,2mm. No método matemático estes mesmos parâmetros foram de, respectivamente, 57,2±6,0h; 6,2±0,3mm e 5,9±0,3mm. Não houve diferença entre os métodos ($P>0,05$). As concentrações plasmáticas de FSH e LH não variaram ao longo do tempo ($P>0,05$). No Capítulo 2, o objetivo foi avaliar o diâmetro no qual o FD adquire capacidade ovulatória após administração de 25mg de LH. Os grupos foram formados de acordo com o diâmetro

do FD no momento do tratamento com LH (7,0-8,4mm; 8,5-10,0mm e >10,0mm, em ambos os experimentos). No Experimento 1, foram utilizadas 29 novilhas bubalinas Murrah x Mediterrâneo. A partir do D3 (pós-ovulação), os exames US foram realizados a cada 12h até 48h do tratamento com LH. Nos grupos 7,0-8,4; 8,5-10,0 e >10,0mm, os diâmetros foliculares no momento da aplicação do LH foram de $7,8^c \pm 0,1$; $9,3^b \pm 0,2$ e $11,0^a \pm 0,3$ mm e as taxas de ovulação de $0,0\%^b$ (0/10); $50,0\%^a$ (5/10) e $55,6\%^a$ (5/9), respectivamente. No Experimento 2, 29 novilhas *Bos indicus* foram monitoradas por US a cada 24h a partir da ovulação até o tratamento com LH, e então a cada 12h durante 48h. Nos grupos 7,0-8,4; 8,5-10,0 e >10,0mm, os diâmetros foliculares no momento da aplicação do LH foram de $7,6^c \pm 0,1$; $9,6^b \pm 0,1$ e $10,9^a \pm 0,2$ mm e as taxas de ovulação de $33,3\%^b$ (3/9); $80,0\%^a$ (8/10) e $90,0\%^a$ (9/10), respectivamente.

Palavras-chave: Divergência folicular. Capacidade Ovulatória. Bubalinos. *Bos indicus*.

ABSTRACT

GIMENES, L. U. **Study of follicle deviation and ovulatory capacity in buffaloes (*Bubalus bubalis*) and zebu cattle (*Bos indicus*)**. [Estudo da divergência folicular e da capacidade ovulatória em bubalinos (*Bubalus bubalis*) e zebuínos (*Bos indicus*)]. 2006. 113 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Present study is presented in Chapter 1 (Follicle deviation; FD) and 2 (Ovulatory capacity). Each chapter includes two experiments [1 – in buffaloes (*Bubalus bubalis*); 2 – in zebu cattle (*Bos indicus*)]. In Chapter 1, aims were to determine moment and diameter deviation and to evaluate plasmatic FSH and LH profiles encompassing follicle selection. In Experiment 1, ovulation was considered day 0 (D0). From D0, 10 Murrah heifers were examined by ultrasound (US) each eight hours (h) until D4 and then, every 24h until D6. FD evaluation was performed by visual analysis (Ginther et al., 1996) and by segmented linear regression (Bergfelt et al. 2003). Blood samples were harvested each 8h in the first 24h post ovulation. From this moment, blood collections were performed every 4h until D4 and after that, each 12h until D6. In visual method, the interval ovulation-FD, dominant (DF) and subordinate follicle (SF) diameters were, respectively, $63.2 \pm 5.7h$, $7.2 \pm 0.3mm$ and $6.4 \pm 0.3mm$ (mean \pm SEM). These same end points, by mathematical method, were, respectively, $61.9 \pm 4.9h$, $7.3 \pm 0.3mm$ and $6.3 \pm 0.3mm$. No differences between both methods of FD evaluation ($P > 0.05$) were found. No changes in plasmatic FSH and LH levels along the time ($P > 0.05$) were found. In Experiment 2, 12 Nelore heifers were submitted to US each 12h until D5, and these same intervals were used to blood harvests (FSH and LH profiles). In visual method, interval ovulation-FD, dominant (DF) and subordinate follicle (SF) diameters were, respectively, $61.0 \pm 5.8h$, $6.2 \pm 0.2mm$ and $5.8 \pm 0.2mm$. These same end points, by mathematical method, were, respectively, $57.2 \pm 6.0h$, $6.2 \pm 0.3mm$ and $5.9 \pm 0.3mm$. No differences between both methods of FD evaluation ($P > 0.05$) were found. No changes in plasmatic FSH and LH levels along the time ($P > 0.05$) were found. In Chapter 2, aim was to evaluate diameter in which DF acquires ovulatory capacity after administration of 25mg of LH. The animals were assigned in groups according to DF diameter at LH treatment (7.0-8.4mm, 8.5-10.0mm and $>10.0mm$, in both experiments). In Experiment 1, 29 Murrah x Mediterrâneo heifers were used. From D3 (post ovulation), US examinations were

performed each 12h until 48h after LH treatment. Follicle diameters at LH challenge in groups 7.0-8.4mm, 8.5-10.0mm and >10.0mm, were $7.8^c \pm 0.1$, $9.3^b \pm 0.2$ and $11.0^a \pm 0.3$ mm, and ovulation rates were 0.0%^b (0/10), 50.0%^a (5/10) and 55.6%^a (5/9), respectively. In Experiment 2, 29 *Bos indicus* heifers were monitored by US every 24h from ovulation until LH challenge, and then each 12h during 48h. Follicle diameters at LH treatment in groups 7.0-8.4mm, 8.5-10.0mm and >10.0mm, were $7.6^c \pm 0.1$, $9.6^b \pm 0.1$ and $10.9^a \pm 0.2$ mm, and ovulation rates were 33.3%^b (3/9), 80.0%^a (8/10) and 90.0%^a (9/10), respectively.

Key words: Follicle deviation. Ovulatory capacity. Buffaloes. *Bos indicus*.

LISTA DE FIGURAS

Figuras do Capítulo 1

Figura 1 -	Representação esquemática do protocolo de sincronização da ovulação e dos intervalos das avaliações ultra-sonográficas em novilhas bubalinas	45
Figura 2 -	Intervalos entre colheitas de sangue em novilhas bubalinas	46
Figura 3 -	Diagrama esquemático do tratamento hormonal e da freqüência de exames ultra-sonográficos e de colheitas de sangue em novilhas zebuínas	49
Figura 4 -	Dinâmica folicular de novilhas bubalinas (n=10). As setas indicam o momento da divergência folicular detectado pelo método visual. O eixo das ordenadas representa os diâmetros foliculares (mm), e o das abscissas, o momento a partir da ovulação (horas). Registro – SP, 2004	52
Figura 5 -	Concentrações plasmáticas de FSH e LH normalizadas para a ovulação (0h) em novilhas bubalinas (n=10). O eixo das ordenadas representa a concentração plasmática (ng/ml) e o eixo das abscissas o momento (horas). As setas indicam o momento da divergência folicular. Registro – SP, 2004	55
Figura 6 -	Dinâmica folicular de novilhas zebuínas (n=12). As setas indicam o momento da divergência folicular detectado pelo método visual. O eixo das ordenadas representa os diâmetros foliculares (mm) e o das abscissas, o momento a partir da ovulação (horas). Pirassununga – SP, 2004	58
Figura 7 -	Concentrações plasmáticas de FSH e de LH normalizadas para a ovulação (0h) em novilhas zebuínas (n=12). O eixo das ordenadas representa a concentração plasmática (ng/ml) e o eixo das abscissas, o momento (horas). As setas indicam o momento da divergência folicular. Pirassununga – SP, 2004	61

Figuras do Capítulo 2

- Figura 1 - Diagrama esquemático do protocolo de sincronização da ovulação, dos intervalos de administração de LH conforme o diâmetro folicular e dos exames ultra-sonográficos para determinação da capacidade ovulatória em novilhas bubalinas 76
- Figura 2 - Diagrama esquemático do protocolo de sincronização da ovulação, dos intervalos de administração de LH conforme o diâmetro folicular e dos exames ultra-sonográficos para determinação da capacidade ovulatória em novilhas bubalinas 77
- Figura 3 - Diagrama esquemático do protocolo de sincronização da ovulação, dos intervalos de exames ultra-sonográficos e dos momentos de administração de LH conforme o diâmetro folicular para determinação da capacidade ovulatória em novilhas zebuínas 79
- Figura 4 - Dinâmica do folículo dominante de novilhas bubalinas submetidas ao tratamento com LH (0h) no Grupo 5,0-6,0mm (n=7). OBS.: Nenhum animal ovulou neste grupo. Caraguatatuba – SP, 2004 82
- Figura 5 - Dinâmica do folículo dominante de novilhas bubalinas submetidas ao tratamento com LH (0h) no Grupo 6,1-7,0mm (n=11). OBS.: Nenhum animal ovulou neste grupo. Caraguatatuba – SP, 2004 83
- Figura 6 - Dinâmica do folículo dominante de novilhas bubalinas submetidas ao tratamento com LH (0h) no Grupo 7,1-8,0mm (n=9). OBS.: Nenhum animal ovulou neste grupo. Caraguatatuba – SP, 2004 84
- Figura 7 - Dinâmica do folículo dominante de novilhas bubalinas submetidas ao tratamento com LH (0h) no Grupo 7,0-8,4mm (n=10). OBS.: Nenhum animal ovulou neste grupo. Dourado – SP, 2005 86
- Figura 8 - Dinâmica do folículo dominante de novilhas bubalinas submetidas ao tratamento com LH (0h) no Grupo 8,5-10,0mm (n=10). A coluna da esquerda representa os animais que não ovularam (n=5) ao indutor e a coluna do lado direito mostra aqueles que responderam (n=5) ao desafio com LH (OV). Dourado – SP, 2005 87
- Figura 9 - Dinâmica do folículo dominante de novilhas bubalinas submetidas ao tratamento com LH (0h) no Grupo >10,0mm (n=9). A coluna da esquerda representa os animais que não ovularam (n=4) ao indutor e a coluna do lado direito mostra aqueles que responderam (n=5) ao desafio com LH (OV). Dourado – SP, 2005 88

Figura 10 -	Dinâmica do folículo dominante de novilhas zebuínas submetidas ao tratamento com LH (0h) no Grupo 7,0-8,4mm (n=9). Os três primeiros animais responderam ao indutor de ovulação (OV). Pindamonhangaba – SP, 2005	91
Figura 11 -	Dinâmica do folículo dominante de novilhas zebuínas submetidas ao tratamento com LH (0h) no Grupo 8,5-10,0mm (n=10). Os oito primeiros animais responderam ao indutor de ovulação (OV). Pindamonhangaba – SP, 2005	92
Figura 12 -	Dinâmica do folículo dominante de novilhas zebuínas submetidas ao tratamento com LH (0h) no Grupo >10,0mm (n=10). Apenas o último animal não respondeu ao indutor de ovulação. Pindamonhangaba – SP, 2005	93

LISTA DE GRÁFICOS

Gráficos do Capítulo 1

Gráfico 1 -	Teste de paralelismo para validação do ensaio de FSH na espécie bubalina. Coeficiente de correlação = 1,0. Araçatuba - SP, 2005	47
Gráfico 2 -	Teste de paralelismo para validação do ensaio de LH na espécie bubalina. Coeficiente de correlação = 0,99. Araçatuba – SP, 2005..	47
Gráfico 3 -	Diâmetros dos folículos dominante e subordinado no momento da divergência folicular em bubalinos (n=10). Avaliação pelo método visual. Registro - SP, 2004	53
Gráfico 4 -	Concentrações plasmáticas de FSH e LH normalizadas para o momento do desvio folicular (0h) em novilhas bubalinas (n=10). Registro – SP, 2004	56
Gráfico 5 -	Diâmetros médios dos folículos dominante e subordinado e concentrações plasmáticas de FSH e LH normalizados para o momento da divergência folicular em novilhas bubalinas (n=10). Registro – SP, 2004	57
Gráfico 6 -	Diâmetros dos folículos dominante e subordinado no momento da divergência folicular em novilhas zebuínas (n=12). Avaliação pelo método visual. Pirassununga - SP, 2004	59
Gráfico 7 -	Concentrações plasmáticas de FSH e de LH normalizadas para o momento do desvio folicular (0h) em novilhas zebuínas (n=12). Pirassununga – SP, 2004	62
Gráfico 8 -	Diâmetros médios dos folículos dominante e subordinado e concentrações plasmáticas de FSH e LH normalizados para o momento da divergência folicular em novilhas zebuínas (n=12). Pirassununga – SP, 2004	63

Gráficos do Capítulo 2

- Gráfico 1 - Taxa de ovulação após o tratamento com LH em novilhas bubalinas agrupadas de acordo com a classe de diâmetro folicular (n=29; a≠b - P<0,05). Dourado - SP, 2005 90
- Gráfico 2 - Taxa de ovulação após o tratamento com LH em novilhas zebuínas agrupadas de acordo com a classe de diâmetro folicular (n=29; a≠b - P<0,05). Pindamonhangaba - SP, 2005 95

LISTA DE TABELAS

Tabelas do Capítulo 1

Tabela 1 -	Taxa de crescimento (mm/8h) do folículo dominante (FD) e do folículo subordinado (FS) antes e após a divergência folicular em novilhas bubalinas. Registro – SP, 2004	54
Tabela 2 -	Taxa de crescimento (mm/12h) do folículo dominante (FD) e do folículo subordinado (FS) antes e após a divergência folicular em novilhas zebuínas. Pirassununga – SP, 2004	60

Tabelas do Capítulo 2

Tabela 1 -	Parâmetros foliculares de novilhas bubalinas tratadas com LH conforme o diâmetro folicular (n=27). Caraguatatuba - SP, 2004	85
Tabela 2 -	Parâmetros foliculares de novilhas bubalinas tratadas com LH conforme o diâmetro folicular (n=29). Dourado - SP, 2005	89
Tabela 3 -	Parâmetros foliculares de novilhas zebuínas tratadas com LH para verificação de capacidade ovulatória (n=29). Pindamonhangaba - SP, 2005	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	análise de variância
APTA	agência paulista de tecnologia dos agronegócios
BE	benzoato de estradiol
D	dia
D0	dia da ovulação
EPM	erro padrão da média
FD	folículo dominante
FS	folículo subordinado
FSH	hormônio folículo estimulante
g	gravitacional
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas
h	hora
hCG	gonadotrofina coriônica humana
IGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IGFBP-1	proteína ligante do fator semelhante à insulina tipo 1
IM	intramuscular
Kg	kilograma
LH	hormônio luteinizante
LHr	receptor de LH
Log ₁₀ X	logaritmo na base 10
mg	miligrama
mm	milímetro
n	número de animais
ng/ml	nanograma por mililitro
°C	grau Celsius
OV	ovulação
P	nível de significância
PAPP-A	proteína plasmática associada à prenhez – A

PGF2 α	prostaglandina F dois alfa
pH	potencial hidroiônico
r ²	coeficiente de regressão
RNAm	ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa
SAS	statistical analysis system
SQRTX	raiz quadrada
TGF- β	fator de crescimento tumoral β
US	ultra-som/ ultra-sonografia
vs	versus

LISTA DE SÍMBOLOS

®	marca registrada
%	porcentagem
χ^2	qui-quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	DESENVOLVIMENTO FOLICULAR EM BOVINOS E BUBALINOS	27
2.2	DIVERGÊNCIA FOLICULAR	29
2.3	FATORES ENDÓCRINOS ENVOLVIDOS NO DESVIO FOLICULAR	31
2.3.1	FSH	31
2.3.2	LH	32
2.3.3	Estradiol	33
2.3.4	Inibina e Activina	35
2.3.5	Sistema IGF	36
2.4	CAPACIDADE OVULATÓRIA	38
	CAPÍTULO 1	41
1	HIPÓTESE	42
2	OBJETIVOS	43
3	MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1	EXPERIMENTO 1: DIVERGÊNCIA FOLICULAR EM NOVILHAS BUBALINAS (<i>Bubalus bubalis</i>)	44
3.1.1	Animais e Local do Experimento	44
3.1.2	Protocolo de Sincronização da Ovulação	44
3.1.3	Avaliações Ultra-sonográficas	45
3.1.4	Colheita de Sangue e Dosagem das Concentrações Plasmáticas de LH e FSH	46
3.2	EXPERIMENTO 2: DIVERGÊNCIA FOLICULAR EM NOVILHAS ZEBUÍNAS (<i>Bos indicus</i>)	48
3.2.1	Animais e Local do Experimento	48
3.2.2	Protocolo de Sincronização da Ovulação	48
3.2.3	Avaliações Ultra-sonográficas	48
3.2.4	Colheita de Sangue e Dosagem das Concentrações Plasmáticas de LH e FSH	49
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50

4	RESULTADOS	51
4.1	EXPERIMENTO 1: DIVERGÊNCIA FOLICULAR EM NOVILHAS BUBALINAS (<i>Bubalus bubalis</i>)	51
4.2	EXPERIMENTO 2: DIVERGÊNCIA FOLICULAR EM NOVILHAS ZEBUÍNAS (<i>Bos indicus</i>)	57
5	DISCUSSÃO	64
6	CONCLUSÕES	70
	CAPÍTULO 2	71
1	HIPÓTESE	72
2	OBJETIVOS	73
3	MATERIAIS E MÉTODOS	74
3.1	EXPERIMENTO 1: CAPACIDADE OVULATÓRIA EM NOVILHAS BUBALINAS (<i>Bubalus bubalis</i>)	74
3.1.1	Animais e Local do Experimento	74
3.1.2	Protocolo de Sincronização da Ovulação	74
3.1.3	Desafio com LH	75
3.1.4	Avaliações Ultra-sonográficas	75
3.2	EXPERIMENTO 2: CAPACIDADE OVULATÓRIA EM NOVILHAS ZEBUÍNAS (<i>Bos indicus</i>)	77
3.2.1	Animais e Local do Experimento	77
3.2.2	Protocolo de Sincronização da Ovulação	78
3.2.3	Desafio com LH	78
3.2.4	Avaliações Ultra-sonográficas	78
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	79
4	RESULTADOS	81
4.1	EXPERIMENTO 1: CAPACIDADE OVULATÓRIA EM NOVILHAS BUBALINAS (<i>Bubalus bubalis</i>)	81
4.2	EXPERIMENTO 2: CAPACIDADE OVULATÓRIA EM NOVILHAS ZEBUÍNAS (<i>Bos indicus</i>)	90
5	DISCUSSÃO	96
6	CONCLUSÕES	101
	REFERÊNCIAS	102

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, que apresenta seu desenvolvimento em franca expansão devido ao grande potencial agropecuário, vem demonstrando crescente demanda por fontes de proteína animal, tanto para suprir as necessidades do mercado nacional quanto do internacional. Dentro desta perspectiva, o país pode se tornar a 4^a economia mundial no ano de 2050 (CARDOSO, 2006).

Em nosso território, o rebanho de bovinos de corte é representado principalmente pela raça Nelore e seus cruzamentos, que perfazem cerca de 80% dos 136 milhões de cabeças pertencentes a esta categoria (CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL, 2005).

Adicionalmente, é possível tirar proveito do potencial de produção de carne de uma outra espécie, a qual apresenta tanta rusticidade e qualidade de carcaça quanto os zebuínos – a espécie bubalina.

Os produtos derivados da criação de búfalos constituem um mercado emergente e podem contribuir de forma significativa para o fortalecimento da economia de nosso país graças à tripla aptidão (corte, leite e tração) destes animais. Mundialmente os bubalinos contribuem com 1,2% da produção de carne e 12,4% da produção de leite (FAO, 2005). A produção de carne bubalina aumentou 12,4% em 10 anos e a de leite, 41,6% neste mesmo período (FAO, 2005).

Entretanto, para que se possa maximizar a produção, a eficiência reprodutiva deve alcançar índices satisfatórios. Para isto é necessário compreender as bases da fisiologia reprodutiva de modo a aplicá-la de maneira racional, respeitando as particularidades entre as diferentes espécies de interesse zootécnico.

Um importante tema dentro da esfera reprodutiva está relacionado ao desenvolvimento folicular, especialmente no que se refere aos mecanismos de divergência folicular e capacidade ovulatória. Estes assuntos vêm sendo pesquisados majoritariamente em fêmeas *Bos taurus*.

Em espécies monovulatórias há um mecanismo de seleção que faz com que, dos vários folículos recrutados durante a fase de emergência, apenas um atinja a dominância (FORTUNE et al., 2001). Este momento é denominado divergência ou desvio folicular. Embora este processo ainda não esteja claramente definido, parece estar relacionado a diversas alterações endócrinas e celulares (SARTORI et al.,

2001). Este tópico foi objeto de trabalhos previamente realizados em novilhas Holandesas (FORTUNE et al., 2001; FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004; GINTHER et al., 1996, 1997, 1999, 2000, 2001a, 2001b, 2001c, 2002a, 2002b, 2003a, 2003b; KULICK et al., 1999) e em novilhas Nelore (CASTILHO, 2003; SARTORELLI, 2003; SARTORELLI et al., 2005), embora com resultados discrepantes para o último grupo genético.

Contudo, mesmo após o folículo atingir o diâmetro do desvio, ele ainda não é capaz de responder a um indutor de ovulação. A capacidade ovulatória somente é obtida quando o folículo dominante alcança maior diâmetro, e este relato está descrito em apenas um estudo em vacas da raça Holandesa (SARTORI et al., 2001).

Portanto, a importância destes conhecimentos reside na possibilidade de otimizar o emprego de biotécnicas, como a inseminação artificial e a superovulação, principalmente durante a primeira onda de crescimento folicular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DESENVOLVIMENTO FOLICULAR EM BOVINOS E BUBALINOS

Estudos relativos à fisiologia ovariana bovina foram inicialmente abordados em 1960, quando ainda se desconhecia o padrão de desenvolvimento folicular. Neste período existiam duas vertentes: uma de que o crescimento folicular era contínuo e independente das fases do ciclo estral (DONALDSON; HANSEL, 1968; MARION; GIER, 1971) e outra de que os folículos ovarianos se desenvolviam de acordo com um padrão em ondas de crescimento folicular (RAJAKOSKI¹, 1960 apud SAVIO et al., 1988, p.663). Até então as pesquisas relacionadas à dinâmica folicular eram limitadas à observação de ovários provenientes de peças de matadouro, ovariectomias ou laparotomias (SAVIO et al., 1988).

A partir da década de 80, novos trabalhos foram realizados com o auxílio da ultra-sonografia, levando ao conhecimento da existência de predominantemente, duas (FIGUEIREDO et al., 1997; GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989; KNOPF et al., 1989; PIERSON; GINTHER, 1984; SANTOS FILHO et al., 2001; WOLFENSON et al., 2004) ou três ondas de desenvolvimento folicular (FIGUEIREDO et al., 1997; NOSEIR, 2003; RHODES; DE'ATH; ENTWISTLE, 1995; SAVIO et al., 1988; SIROIS; FORTUNE, 1988). Mais raramente são observados animais com uma (SAVIO et al., 1988) ou quatro (MARTÍNEZ² et al., 2003 apud BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003, p. 311; RHODES; DE'ATH; ENTWISTLE, 1995; SIROIS; FORTUNE, 1988; VIANA et al., 1998; ZEITOUN; RODRIGUEZ; RANDEL, 1996) ondas foliculares.

Em bubalinos os estudos de dinâmica folicular demonstram que esta espécie apresenta desenvolvimento ovariano semelhante aos bovinos (BARUSELLI et al., 1997). Embora a ocorrência de duas ondas foliculares seja a mais relatada em

¹ RAJAKOSKI, E. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical and left-right variations. **Acta Endocrinologica**, v. 34, p. 7-68, 1960. Suplemento 52.

² MARTÍNEZ, M.F.; BO, G.A.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R.J. Ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* and *Bos taurus* beef cattle. **Theriogenology**, submitted for publication, 2003.

fêmeas bubalinas (ALI et al., 2003; BARUSELLI et al., 1997; MANIK; MADAN; SINGLA, 1994), também foi observado o padrão de uma (BARUSELLI et al., 1997) ou três ondas (BARUSELLI et al., 1997; MANIK; MADAN; SINGLA, 1994).

Mais recentemente, em um trabalho realizado em búfalas da raça Mediterrâneo (PRESICCE et al., 2004), foram comparados os padrões de dinâmica folicular e perfis hormonais entre nulíparas e multíparas após protocolo de sincronização de estro com progestágeno. Foram encontradas diferenças quanto ao número de ondas, que variaram de uma a três em novilhas, enquanto que em vacas detectou-se apenas o padrão de desenvolvimento de duas ondas foliculares. Comparando-se animais com duas ondas foliculares, detectaram-se menores taxas de crescimento e diâmetro folicular em novilhas do que em multíparas. Apesar destas disparidades entre animais de diferentes status reprodutivos, os autores reportam que as características de ondas foliculares encontradas neste estudo são semelhantes a outros realizados na espécie bubalina.

Em ambas as espécies o número de ondas de crescimento folicular pode ser influenciado por vários fatores como: duração da fase lútea (BARUSELLI et al., 1997; GINTHER; KNOFF; KASTELIC, 1989), baixa ingestão de nutrientes (MURPHY et al., 1991), concentrações plasmáticas de inibina-A e FSH (PARKER et al., 2003), entre outros.

Em animais que apresentam duas ondas de crescimento folicular, o intervalo interovulatório em *Bos taurus* (nulíparas da raça Holandesa), *Bos indicus* (nulíparas e multíparas da raça Nelore e nulíparas da raça Brahman) e bubalinos (multíparas da raça Murrah) é de, respectivamente, $20,4 \pm 0,3$ dias (GINTHER; KNOFF; KASTELIC, 1989); $20,2 \pm 0,4$ a $20,7 \pm 0,5$ dias (FIGUEIREDO et al., 1997; RHODES; DE'ATH; ENTWISTLE, 1995) e $21,6 \pm 1,2$ a $22,3 \pm 0,9$ dias (BARUSELLI et al., 1997; MANIK; MADAN; SINGLA, 1994). Nos casos de três ondas de crescimento folicular tem-se, respectivamente, $22,8 \pm 0,6$ (GINTHER; KNOFF; KASTELIC, 1989); $21,9 \pm 0,5$ a $22,0 \pm 0,4$ dias (FIGUEIREDO et al., 1997; MARTÍNEZ² et al., 2003 apud BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003, p. 311) e $24,5 \pm 1,9$ dias (BARUSELLI et al., 1997). A duração da fase lútea em *Bos indicus* com duas ondas é de $11,8 \pm 0,4$ dias e naqueles com três ondas é de $14,2 \pm 0,2$ dias (RHODES; DE'ATH; ENTWISTLE, 1995). Em bubalinos relatam-se os seguintes períodos, respectivamente, $10,4 \pm 2,1$ e $12,7 \pm 2,9$ dias (BARUSELLI et al., 1997).

Os diâmetros máximos alcançados em cada onda de crescimento folicular não são semelhantes em bovinos e bubalinos, e talvez isto seja atribuído às diferenças anatômicas existentes entre estas duas espécies, tendo-se em vista que nas búfalas os ovários apresentam menor tamanho e peso quando comparados à vaca bovina (VITTORIA, 1997). Os diâmetros máximos alcançados em *Bos taurus* com duas ondas de crescimento folicular, são de $17,1 \pm 0,5$ mm e $16,5 \pm 0,4$ mm (GINTHER; KNOFF; KASTELIC, 1989); em *Bos indicus*, são de $11,3 \pm 0,4$ mm e $12,1 \pm 0,3$ mm (FIGUEIREDO et al., 1997), e em bubalinos, de $12,4 \pm 0,8$ a $15,1 \pm 2,4$ mm e $13,8 \pm 0,4$ a $15,5 \pm 1,6$ mm para cada onda, respectivamente (BARUSELLI et al., 1997; MANIK; MADAN; SINGLA, 1994). Animais que apresentam três ondas de crescimento folicular demonstram diâmetros máximos de $16,0 \pm 0,4$ mm; $12,9 \pm 0,7$ mm e $13,9 \pm 0,4$ mm, em *Bos taurus* (GINTHER; KNOFF; KASTELIC, 1989); $10,4 \pm 0,3$ mm; $9,4 \pm 0,3$ mm e $11,6 \pm 0,3$ mm, em *Bos indicus* (FIGUEIREDO et al., 1997), e de $13,3 \pm 1,8$ mm; $11,1 \pm 2,1$ mm e $13,4 \pm 1,3$ mm, em bubalinos (BARUSELLI et al., 1997).

2.2 DIVERGÊNCIA FOLICULAR

Cada onda folicular é caracterizada por um grupo de pequenos folículos que são recrutados (emergência folicular) e iniciam uma fase de crescimento comum por cerca de três dias (GINTHER et al., 2003a). Destes, apenas um continua seu desenvolvimento (folículo dominante; FD), enquanto os outros sofrem decréscimo de tamanho (folículos subordinados; FS; LUCY et al., 1992), estabelecendo-se então, o fenômeno da divergência folicular. Na presença de altos níveis de progesterona o FD se torna anovulatório, devido à baixa frequência na pulsatilidade de LH (regressão e atresia), e uma nova onda se inicia (revisado em DRIANCOURT, 2001; GINTHER; KNOFF; KASTELIC, 1989; WEBB et al., 1999). Contrariamente, o folículo dominante presente no momento da regressão lútea culmina na ovulação (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004).

A divergência (ou desvio) folicular é definida como a diferença nas taxas de crescimento entre os dois maiores folículos, sendo marcado pela continuidade no

desenvolvimento do maior folículo e declínio ou parada no crescimento dos outros (GINTHER et al., 1996; 2001a).

Há indícios de que o futuro folículo dominante tenha um maior diâmetro que os outros no início da divergência folicular e seja o primeiro a se desenvolver. Entretanto, um futuro folículo subordinado pode ser inicialmente maior do que o futuro dominante, porém sua taxa de crescimento tende a ser inferior, não alcançando o estágio definitivo (GINTHER et al., 1996). Nesta revisão de 1996, Ginther et al. ao reanalisarem os dados obtidos em outro trabalho do mesmo grupo de pesquisa, observaram que o folículo dominante foi maior, do mesmo diâmetro ou menor no início do desvio em, respectivamente, 76%, 21% e 3% dos casos. Compactuando com esta informação, Kulick et al. (1999) também observaram uma vantagem significativa no diâmetro do futuro folículo dominante em relação ao futuro folículo subordinado já no momento da emergência folicular ($4,2 \pm 0,8\text{mm}$ vs. $3,6 \pm 0,1\text{mm}$).

A diferença nos diâmetros entre os dois maiores folículos é estabelecida em menos de oito horas, o que é equivalente a uma diferença de 0,5 mm. Quando o maior folículo atinge um estágio decisivo de desenvolvimento, o rápido estabelecimento do mecanismo de desvio bloqueia o segundo maior folículo antes dele alcançar diâmetro similar (GINTHER et al., 2003a).

Contudo, todos os folículos na fase de crescimento simultâneo têm potencial para uma futura dominância, fato demonstrado experimentalmente pela ablação do maior folículo, ocasionando no desenvolvimento do segundo maior folículo (anteriormente subordinado; GINTHER et al., 1996, 1997, 2001a, 2003a). Além disso, a administração de FSH no início da onda ou de soro anti-inibina promovem o atraso ou impedem a divergência folicular, como indicado pelo desenvolvimento de mais de um folículo dominante (GINTHER et al., 1996, 1997, 2001a, 2003a).

Em bovinos da raça Holandesa (*Bos taurus*), o desvio tem início por volta do dia 2,8 após a emergência, quando o folículo dominante atinge em média 8,5 mm e o folículo subordinado 7,2 mm (GINTHER et al., 1996).

Em novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*), existem dois trabalhos com resultados díspares. Castilho (2003) relata que a divergência folicular ocorre com 3,5 dias pós-ovulação, quando os folículos dominante e subordinado apresentam, respectivamente, 7,2 e 5,5 mm, ao passo que Sartorelli (2003) descreve que o momento do desvio ocorre 2,9 dias após a ovulação com os seguintes diâmetros:

5,7 mm para o dominante e 5,5 mm para o subordinado (resultados da análise pelo método gráfico ou visual em ambos os trabalhos).

Quando são comparados os dados obtidos entre os dois diferentes grupos genéticos acima, pode-se justificar a disparidade dos resultados devido ao menor tamanho corporal e folicular das Nelore em relação às Holandesas, além de fatores como clima, manejo e nutrição (SARTORELLI, 2003). Porém com relação aos estudos reportados em novilhas Nelore, Sartorelli (2003) cita como possíveis explicações a técnica ultra-sonográfica, a forma de determinação do momento do desvio e o grau de estresse dos animais.

O fenômeno da divergência folicular está associado a eventos endócrinos e celulares, como o decréscimo dos níveis de FSH, aumento das concentrações circulantes de 17β -estradiol, aumento de IGF-1 e aumento na expressão de receptores de LH (SARTORI et al., 2001).

2.3 FATORES ENDÓCRINOS ENVOLVIDOS NO DESVIO FOLICULAR

2.3.1 FSH

O Hormônio Folículo Estimulante (FSH) está associado à emergência da onda de crescimento folicular durante o ciclo estral e tem sido demonstrada sua ação em bezerras de seis/ oito meses, durante a prenhez e no período pós-parto (GINTHER et al., 1996).

Em bovinos, o requerimento por FSH ocorre em folículos entre 4 a 9mm e a partir deste diâmetro o folículo dominante continua a se desenvolver devido à mudança na dependência gonadotrófica primária de FSH para LH (WEBB et al., 1999). Entretanto, estudos têm demonstrado que o folículo dominante necessita de concentrações basais de FSH para continuar seu desenvolvimento, as quais são inadequadas para folículos menores (GINTHER, 2000).

A onda de FSH tem início alguns dias antes da emergência folicular, momento no qual atinge concentrações máximas (KULICK et al., 1999), quando os folículos recrutados apresentam diâmetro médio de 4mm (GINTHER, 2000). Deste momento

em diante, as concentrações decrescem até alcançarem o nadir próximo ao desvio, com relatos variando entre 32 horas antes (KULICK et al., 1999) até 10 horas após a seleção folicular (GINTHER et al., 1999).

A queda nos níveis de FSH é causada pela ação combinada da inibina e do estradiol, produzidos por folículos maiores que 5mm (GIBBONS; WILTBANK; GINTHER, 1997), através de retroalimentação negativa (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004) sobre a hipófise (WEBB et al., 1999). Porém esta ação conjunta dos folículos ocorre somente até a fase de crescimento comum. Após a divergência folicular, apenas o folículo dominante é o responsável pela inibição desta gonadotrofina (GINTHER et al., 2003a).

A estreita relação FSH-folículos pode ser considerada como um componente essencial do desvio folicular, não excluindo, todavia, o envolvimento concomitante de outros mecanismos, como a produção de algum fator pelo folículo dominante que iniba diretamente os outros folículos de ambos ovários. Através de estudos *in vitro*, verificou-se que o FSH estimula a produção de estradiol, IGF-1, activina-A e inibina-A (GINTHER et al., 2003a).

2.3.2 LH

Após a mudança na dependência gonadotrófica, o hormônio luteinizante (LH) passa a assumir papel fundamental na fase final de crescimento (DRIANCOURT, 2001) e maturação folicular, e embora uma elevação transitória nas concentrações deste hormônio tenha início 32 horas antes (GINTHER et al., 1998) até um período de 48 horas após a divergência folicular (GINTHER et al., 1999), seu envolvimento no processo de seleção ainda não está claramente definido. Sabe-se, entretanto, que o LH estimula a produção intrafolicular de esteróides e sistemas de fatores de crescimento que estão envolvidos nos mecanismos de desvio (GINTHER et al., 2003a).

Tem-se postulado que o mecanismo de desvio folicular em bovinos envolve a aquisição seletiva de responsividade ao LH pelo folículo dominante (KULICK et al., 1999). No momento esperado do desvio folicular, o número de receptores de FSH nas células da granulosa não se altera no folículo dominante, mas o número de

receptores de LH aumenta. Desta forma, o primeiro folículo a alcançar um estágio decisivo na expressão de receptores de LH nas células da granulosa pode ser aquele que se tornará o dominante (GINTHER et al., 1996).

Em *Bos taurus*, Bao et al. (1997) e Xu et al. (1995), utilizando hibridização *in situ*, detectaram a expressão de RNAm para receptores de LH (LHr) nas células da granulosa de folículos a partir de 8mm e 9mm, respectivamente. Beg et al. (2001) empregando RT-PCR, encontraram diferença significativa na expressão de RNAm LHr entre os dois maiores folículos, quando o dominante apresentou diâmetro entre 8 - 8,4mm, ou seja, oito horas antes do início da divergência folicular. Contudo, Robert et al. (2003) ao usarem a mesma técnica, observaram a expressão destes receptores em folículos acima de 4mm.

Embora a somatória destes experimentos conduza à hipótese de que o LH é fundamental para desencadear o desvio folicular, ainda permanece controverso se esta gonadotrofina é um componente chave neste processo. Evans e Fortune (1997) relatam que a seleção ocorre na ausência de níveis detectáveis de RNAm LHr nas células da granulosa e que esta fase é precedida pela produção diferencial de estradiol entre os dois maiores folículos. Ainda, Ginther et al. (2001b) verificaram que a redução nas concentrações de LH, através de tratamento com progesterona injetável, não afetou o momento esperado da divergência folicular, nem o diâmetro do segundo maior folículo, entretanto houve redução no tamanho do folículo dominante após o momento esperado do desvio. Estes achados indicam que o LH não é o responsável pelo início deste fenômeno, porém é necessário para o contínuo crescimento do folículo dominante após a divergência.

2.3.3 Estradiol

Segundo Webb et al. (1999), a seleção folicular e o desenvolvimento de dominância não podem ser completamente explicados pelo sistema clássico de retroalimentação hipotalâmico – hipofisário – ovariano. Os folículos apresentam diferentes destinos, mesmo quando expostos ao mesmo ambiente gonadotrófico, apoiando o conceito de regulação intra-ovariana (CAMPBELL; SCARAMUZZI; WEBB, 1995).

O estradiol é um fator intrafolicular, produzido pelas células da granulosa de folículos em crescimento (GINTHER et al., 2003a), e sua síntese depende do aumento na expressão e atividade dos receptores de gonadotrofinas, enzimas esteroidogênicas e fatores de crescimento (MIHM; AUSTIN, 2002). Crowe et al. (2001) observaram que, em novilhas imunizadas contra GnRH, o sinergismo entre LH e FSH estimulou o crescimento de folículos grandes, e que isto é necessário para induzir a secreção de estradiol por estas estruturas.

Folículos selecionados apresentam concentrações de estradiol no fluido folicular significativamente maiores do que os folículos em recrutamento ou regressão (FORTUNE et al., 2001). Pode-se distinguir entre folículos dominantes saudáveis e subordinados atrésicos, pela proporção estradiol: progesterona no fluido folicular. Em folículos estrógeno-ativos esta proporção é >1 (MIHM; AUSTIN, 2002), sendo, portanto, um bom indicador de dominância fisiológica (CROWE et al., 2001).

O estradiol circulante começa a aumentar no momento do desvio (GINTHER et al., 2001b; KULICK et al., 1999), estando associado à elevação transitória de LH que acompanha a seleção folicular (GINTHER et al., 2001b). No fluido folicular, detectou-se que a diferença nas concentrações de estradiol entre os dois maiores folículos é contemporânea à diferença no diâmetro entre eles (BEG et al., 2001; FORTUNE et al., 2001; GINTHER et al., 2001b).

As funções do estradiol parecem ser a de suprimir as concentrações de FSH circulantes, atuando sozinho ou sinergicamente com a inibina (GINTHER et al., 2003a) e, possivelmente, facilitando a mudança na dependência gonadotrófica do folículo dominante (GINTHER et al., 1996).

Por outro lado, reporta-se (DRIANCOURT, 2001) que a produção de estradiol não parece ser pré-requisito para a dominância folicular, sendo isto evidenciado pela ineficiência no bloqueio de dominância folicular através da administração de inibidores de aromatase ou de epostane, um inibidor da síntese de esteróides, além da produção variável de estradiol de acordo com o status fisiológico da fêmea, sem que deixe de existir o mecanismo de seleção folicular.

2.3.4 Inibina e Activina

O sistema activina/ inibina, o qual faz parte da superfamília TGF- β de proteínas (FINDLAY, 1994), tem sido reconhecido por apresentar importantes funções nos mecanismos regulatórios intra-ovarianos (KNIGHT, 1996), podendo estar envolvido na seleção do folículo dominante e diferenciação final ou atresia folicular (MIHM; AUSTIN, 2002).

As inibinas são glicoproteínas diméricas consistindo de uma unidade α e uma β , produzidas pelas células da granulosa de folículos em crescimento, e podem se apresentar no fluido folicular bovino sob diversas formas diméricas e monoméricas (quando ausente uma das subunidades) de variados pesos moleculares (MIHM; AUSTIN, 2002). Todas as formas diméricas suprimem a síntese e liberação de FSH na adenohipófise (GOOD et al., 1995), e também afetam diretamente o crescimento folicular e esteroidogênese (WRATHALL; KNIGHT, 1995).

A determinação destas proteínas no fluido folicular pode ser empregada como marcador de qualidade folicular (MIHM; AUSTIN, 2002), visto que em folículos estrógeno-ativos a maioria das inibinas diméricas é de alto peso molecular, ao passo que em folículos evidenciando atresia, estas formas se apresentam em quantidade reduzida, aumentando a proporção de inibinas de baixo peso molecular (IRELAND et al., 1994).

Embora se tenha reportado em novilhas que este fator intrafolicular apresenta maior bioatividade em folículos estrógeno-ativos do que em atrésicos (PADMANABHAN et al., 1984), a maioria dos trabalhos em bovinos aponta para a ausência de diferença nas concentrações de inibina-A, inibina-B e inibina total entre os dois maiores folículos em associação temporal ao desvio (BEG et al., 2001, 2002; GINTHER et al., 2001b, 2002a).

A activina, que é um homodímero da subunidade β da inibina, tem ações opostas à deste peptídeo tanto na hipófise quanto nos ovários. A activina aumenta a aquisição de receptores de FSH e a síntese de inibina pelas células da granulosa e promove a proliferação das células da granulosa e esteroidogênese durante o desenvolvimento folicular precoce. A interação activina-receptor é regulada pela folistatina, sua proteína ligante. A folistatina neutraliza a função da activina na

hipófise e nos ovários e possui atividade semelhante à inibina (MIHM; AUSTIN, 2002).

As concentrações de activina-A não se apresentam diferentes entre os dois maiores folículos próximo ao momento do desvio (BEG et al., 2002; GINTHER et al., 2002a). Entretanto, pesquisas com desvio experimental (GINTHER et al., 2002a) ou natural (GINTHER et al., 2003b) indicam que a activina-A parece estar envolvida no processo de divergência, pois a elevação transitória nas concentrações deste peptídeo foi temporalmente associada ao aumento no estradiol e IGF-1 em bovinos. Apesar destes resultados, estes autores relatam que estudos confirmatórios são necessários.

2.3.5 Sistema IGF

O sistema de fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) é composto por dois ligantes (IGF-1 e IGF-2), dois receptores (tipo 1 e tipo 2) e uma família de proteínas ligantes de IGF (IGFBP-1, 2, 3, 4, 5 e 6) e suas proteases (revisado em FORTUNE et al., 2001).

Os IGFs e suas proteínas ligantes apresentam expressão do RNAm regulada de acordo com o tecido e de maneira espécie-específica (WEBB et al., 1999). Deste modo, em bovinos o RNAm para IGF-1 é expresso nas células da granulosa e o IGF-2, na teca, predominantemente em folículos dominantes, mas também em folículos subordinados e pequenos antrais (YUAN et al., 1998).

O IGF-1 se liga às células da granulosa e da teca (STEWART et al., 1996), estimulando a mitose em ambas (granulosa - SPICER; ALPIZAR; ECHTERNKAMP, 1993; teca - SPICER; STEWART, 1996), e aumentando a síntese de estradiol (SPICER; ALPIZAR; ECHTERNKAMP, 1993), progesterona e andrógenos (SPICER; ECHTERNKAMP, 1995).

Há crescente evidência da participação do sistema IGF na seleção do folículo dominante. Ginther et al. (2001a) verificaram que as concentrações intrafoliculares de IGF-1 livre não diferiram entre os dois maiores folículos antes da divergência folicular, entretanto, após este período o folículo dominante apresentou níveis mais elevados do que o maior subordinado. Por outro lado, Beg et al. (2001, 2002)

observaram que próximo ao desvio, as concentrações de IGF-1 livre não se alteraram no folículo dominante, mas decresceram no segundo maior folículo. Adicionalmente, há indícios de que a indução dos receptores de LH pode ser, ao menos em parte, mediada pelo IGF-1, pois se demonstrou que a limitação na produção de IGF-1 impede a dominância folicular e o desenvolvimento folicular além de 8mm (CHASE et al., 1998).

Acredita-se que os IGFs exercem uma importante função no crescimento folicular através do estímulo à proliferação das células da granulosa, em sinergismo com as gonadotrofinas (GONG et al., 1993). Corroborando com esta idéia, estudos *in vivo* têm indicado que a injeção intrafolicular de IGF-1 aumenta o diâmetro folicular (SPICER et al., 2000) e a produção de estradiol (GINTHER et al., 2004), mostrando, portanto, estrita relação com o desenvolvimento dos folículos.

A biodisponibilidade dos IGFs é controlada por sua associação com as IGFBPs. Em sistemas de cultivo de células ovarianas, se tem demonstrado que todas as IGFBPs atenuam as ações das IGFs (MONGET et al., 1993; MONNIAUX et al., 1997). Seria esperado, portanto, que um decréscimo na produção folicular de IGFBP resultasse em um aumento na atividade biológica de IGF localmente produzido e deste modo, aumentasse a resposta folicular às gonadotrofinas.

Em bovinos, o fluido folicular contém IGFBP-2, 3, 4 e 5 (STEWART et al., 1996; de la SOTA et al., 1996), porém a expressão de RNAm para IGFBP-2 e IGFBP-4 é restrita à granulosa e à teca, respectivamente, em folículos antrais saudáveis de até 9mm de diâmetro. Em contraste, é difícil detectar a expressão de RNAm para IGFBP-2 em células da granulosa de folículos que já sofreram o processo de seleção (ARMSTRONG et al., 1998; YUAN et al., 1998), indicando atividade relacionada aos mecanismos de divergência folicular.

Beg et al. (2001) e Ginther et al. (2001a) observaram que os níveis de IGF-1 progressivamente decresceram enquanto os níveis de IGFBP-2 progressivamente aumentaram no segundo maior folículo, mas não até a divergência folicular ocorrer, e isto pode ter contribuído para a parada no crescimento do mesmo.

A protease da IGFBP-4, mais comumente conhecida como plasma-associated pregnancy protein-A (PAPP-A - proteína plasmática associada à prenhez - A), foi

originalmente identificada em soro de mulheres gestantes (LAWRENCE³ et al., 1999 apud MIHM; AUSTIN et al., 2002, p. 160).

A PAPP-A é considerada um marcador de dominância folicular e, em humanos, apresenta genes e proteínas expressos nas células da granulosa de folículos saudáveis com diâmetros superiores a 9mm (CONOVER et al., 2001). Em bovinos, é encontrada em maiores concentrações no fluido de folículos dominantes do que em subordinados a partir do dia 2 após a emergência da primeira onda folicular (RIVERA et al., 2001).

A manutenção de baixa atividade das IGFBPs totais no grupo de folículos é, pelo menos em parte, regulado pelo FSH e por dois outros mecanismos identificados até o momento: redução na expressão do gene de IGFBP-2 (ARMSTRONG et al., 1998) e indução de atividade proteolítica contra a IGFBP-4 (RIVERA; FORTUNE et al., 2001).

Apesar dos achados das pesquisas previamente reportadas, são necessários mais estudos para tornar clara a relação específica das várias proteínas ligantes e suas proteases no mecanismo de desvio folicular (GINTHER et al., 2003a).

2.4 CAPACIDADE OVULATÓRIA

Dentre os inúmeros folículos que são recrutados em cada ciclo estral, apenas um culmina na ovulação na maioria dos casos. Os mecanismos relativos a este evento ainda não foram plenamente elucidados, porém há diversas especulações descritas na literatura.

Diversos estudos apontam para a importância do estágio do desenvolvimento folicular nas taxas ovulatórias. Price e Webb (1989) verificaram que houve efeito da fase do ciclo estral na resposta ovulatória de novilhas *Bos taurus* submetidas a tratamento com 1500 UI de hCG. As maiores taxas de ovulação ocorreram na fase

³ LAWRENCE, JB; OXVIG, C; OVERGAARD, MT; SOTTRUOJENSEN, L; GLEICH, GJ; HAYS, LG; YATES, III JR; CONOVER, CA. The insulin-like growth factor (IGF)-dependent binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.96, p.3149–53, 1999.

lútea inicial (4° ao 7° dia do ciclo estral; 83% de ovulação) e na fase lútea tardia do ciclo estral (14° ao 16° dia; 66% de ovulação).

Em outro experimento, Silcox, Powell e Kiser (1993) obtiveram 100% de ovulação quando administraram 100µg de GnRH (cistorelina) na fase de crescimento folicular ($3,8 \pm 0,2$ dias após o estro) de novilhas Holandesas. Estes autores observaram ainda que a responsividade folicular decresceu para 33% na fase estática ($7,4 \pm 0,5$ dias) e que não houve ovulação durante a fase de regressão ($12,7 \pm 0,5$ dias).

Martínez et al. (1999) testaram a eficiência de dois indutores de ovulação (25 mg de LH ou 100µg de cistorelina) em três diferentes dias do ciclo estral (D3, D6 ou D9), que correspondiam às fases de crescimento, estática inicial e estática tardia do desenvolvimento folicular de novilhas *Bos taurus*. Neste trabalho as novilhas tratadas com LH responderam com 67%, 100% e 67% de ovulações, enquanto aquelas tratadas com GnRH tiveram 89%, 56% e 22% de ovulações, para os dias 3, 6 e 9, respectivamente. Outra importante observação é a de que os folículos que ovularam no D3 já haviam sofrido divergência e possuíam maior diâmetro (9-10mm) comparados àqueles que não haviam ovulado.

Conjuntamente, conclui-se com os resultados destas investigações que o aumento na responsividade folicular após indução de ovulação parece coincidir com o aumento no diâmetro dos folículos (MARTÍNEZ et al., 1999; PRICE; WEBB, 1989), e que esta é perdida pelo folículo dominante nas fases estática tardia ou de regressão (MARTÍNEZ et al., 1999). Price e Webb (1989) e Martinez et al. (1999) discutem em seus estudos sobre a possível participação dos receptores de LH no aumento das respostas ovulatórias aos indutores.

Corroborando com esta hipótese, Sartori et al. (2001) desenvolveram três experimentos em fêmeas Holandesas para correlacionar aquisição de capacidade ovulatória com o diâmetro do desvio em resposta ao LH, e concluíram que o folículo dominante adquire capacidade ovulatória após o diâmetro do desvio (10 mm), sendo necessária, no entanto, uma alta dose (40 mg) de LH para que a ovulação ocorra com este tamanho folicular. Verificaram ainda, que esse resultado é consistente com um aumento na responsividade folicular ao LH, um importante componente do contínuo crescimento e seleção do folículo dominante. Entretanto, como estes próprios pesquisadores abordam, se o diâmetro no desvio é causado pela responsividade ao LH, seria esperado que folículos de aproximadamente 8,5mm (em

Bos taurus) já tivessem adquirido receptores para LH e capacidade ovulatória, porém isto não foi observado, mesmo com uma dose dez vezes maior (40 mg) do que a requerida por grandes folículos. Neste caso, esta responsividade ao LH pode ter sido adequada para atingir o diâmetro do desvio, mas não para obter capacidade ovulatória.

Este tipo de questionamento leva, portanto, à busca de outras respostas para clarificar o fenômeno da ovulação, e outra possível explicação está relacionada ao aumento de enzimas proteolíticas atuando sobre a parede folicular do folículo dominante.

Desde 1975 sabe-se que um aspecto fundamental da maturação do folículo pré-ovulatório e pré-requisito para ruptura folicular, é o enfraquecimento progressivo da região do estigma, através do adelgaçamento e degeneração da parede folicular (PARR, 1975).

O gatilho que desencadeia a seqüência de eventos para a ovulação é o LH, cujos efeitos são mediados por duas vias, a da adenilciclase - AMPc, principalmente, e a da fosfolipase C - inositol fosfato (GILCHRIST et al., 1996). Richards et al. (1995) afirmam que baixas concentrações de LH estimulam a adenilciclase, a produção de AMPc e a ativação de proteína quinase A, ao passo que altas concentrações (pico) de LH também aumentam inositol trifosfato e ativam a proteína quinase C.

O AMPc influencia ao menos três passos distintos no processo ovulatório, que são a estimulação da esteroidogênese; a estimulação da ciclooxigenase/lipooxigenase, levando à síntese de prostaglandinas e leucotrienos; e a estimulação do plasminogênio ativador, o qual catalisa a conversão do plasminogênio a plasmina. Um quarto aspecto crucial são as collagenases, mas não se sabe ao certo se são mediadas via AMPc (LE MAIRE, 1989). Essas enzimas degradam a matriz perifolicular e a rede de colágeno da parede folicular (LE MAIRE, 1989; TSAFRIRI; REICH, 1999), resultando na formação do estigma e ruptura (LE MAIRE, 1989). Se for realizado o bloqueio farmacológico de qualquer dessas enzimas, a ruptura folicular é inibida (TSAFRIRI, 1995).

Por fim, há crescente evidência de que as ações envolvidas no desenvolvimento folicular e diferenciação das células da granulosa são promovidas pelo oócito, e que a elucidação da interação oócito – células somáticas pode ter importantes implicações na compreensão de fatores regulando a foliculogênese, a taxa de ovulação e a fertilidade (GILCHRIST; RITTER; ARMSTRONG, 2004).

CAPÍTULO I

Divergência Folicular

1 HIPÓTESE

A hipótese do presente experimento é de que, no momento da divergência folicular, fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) e zebuínas (*Bos indicus*) apresentam menores diâmetros dos folículos dominante e maior subordinado do que fêmeas taurinas (*Bos taurus*). Este estudo testa ainda a hipótese de que, assim como descrito em taurinos, há declínio nas concentrações plasmáticas de FSH e elevação transitória nas concentrações de LH próximo ao momento do desvio folicular em fêmeas bubalinas e zebuínas.

2 OBJETIVOS

- Determinar o momento e o diâmetro dos folículos dominante e maior subordinado na divergência folicular em novilhas bubalinas (*Bubalus bubalis*) e zebuínas (*Bos indicus*).
- Comparar o método visual e matemático para a análise do momento e diâmetro no desvio folicular de novilhas bubalinas (*Bubalus bubalis*) e zebuínas (*Bos indicus*).
- Verificar se há alterações significativas nas concentrações plasmáticas de FSH e/ou LH nas proximidades do desvio folicular em novilhas bubalinas (*Bubalus bubalis*) e zebuínas (*Bos indicus*).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 EXPERIMENTO 1: DIVERGÊNCIA FOLICULAR EM NOVILHAS BUBALINAS (*Bubalus bubalis*)

3.1.1 Animais e Local do Experimento

Foram utilizadas 19 novilhas Murrah (*Bubalus bubalis*) cíclicas, com idade variando entre 20 e 36 meses e peso entre 340 e 518 kg.

Durante o período experimental (maio e junho de 2004), os animais pertencentes a fazendas localizadas em Registro, no Vale do Ribeira - SP (Fazenda Várzea Grande, de propriedade de José Carlos Fernandes, e Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - APTA - de Registro), foram mantidos a pasto (*Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha*) na APTA de Registro, com suplementação fornecida na forma de silagem de milho e água *ad libitum*.

3.1.2 Protocolo de Sincronização da Ovulação

Os animais foram previamente submetidos ao protocolo “Ovsynch” para sincronização da ovulação, conforme ilustrado na figura 1. Em dia aleatório do ciclo estral todas as novilhas foram tratadas com 50 µg de Lecirelina IM (Gestran Plus®, Arsa). Sete dias após, foi administrado 0,5 mg de Cloprostenol IM (Ciosin®, Schering-Plough Coopers), e 48 horas depois as fêmeas receberam 25 µg de Lecirelina IM.

3.1.3 Avaliações Ultra-sonográficas

Todos os animais foram monitorados a cada 12 horas a partir do segundo GnRH, para a detecção do momento da ovulação. Por definição, estabeleceu-se este momento como o dia 0 (D0) para o estudo da divergência folicular.

A partir da ovulação os animais foram examinados a cada oito horas até o D4 e, posteriormente, a cada 24 horas até o D6, através de ultra-sonografia transretal (Pie Medical® – Scanner 100), para acompanhamento da dinâmica folicular, a fim de detectar o momento e o diâmetro folicular no desvio. Os intervalos empregados para as avaliações ultra-sonográficas estão representados na figura 1.

Os ovários foram mapeados, registrando-se o diâmetro dos três maiores folículos ovarianos. Retrospectivamente foram determinados os dois maiores folículos, sendo classificados como folículo dominante (FD) e maior folículo subordinado (FS).

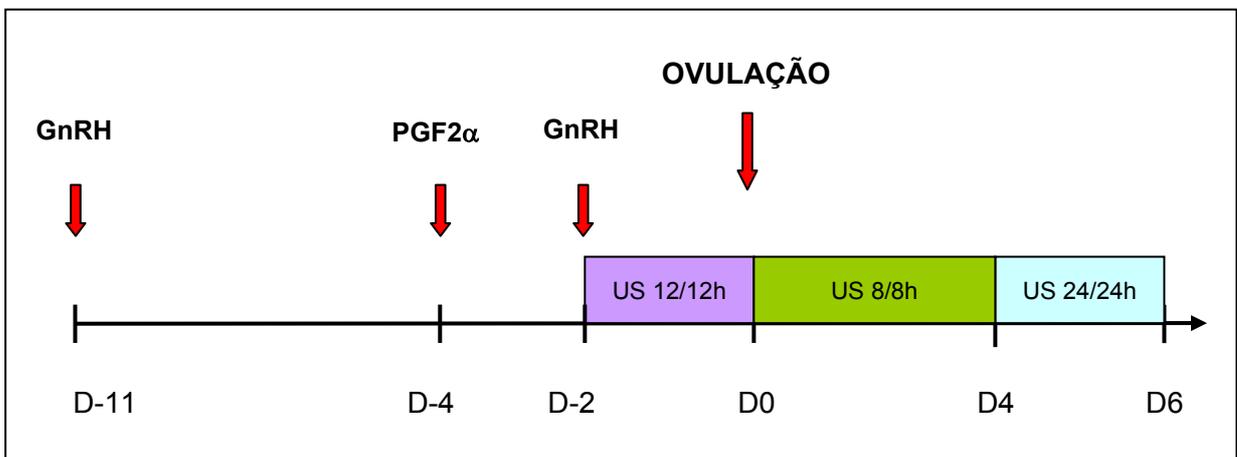


Figura 1 - Representação esquemática do protocolo de sincronização da ovulação e dos intervalos das avaliações ultra-sonográficas em novilhas bubalinas

3.1.4 Colheita de Sangue e Dosagem das Concentrações Plasmáticas de LH e FSH

Em todos os animais foram colhidas amostras de 10 ml de sangue da veia jugular, em tubos heparinizados (Vacutainer®, Becton-Dickinson & Company), para dosagem de FSH e LH. Os intervalos de colheita ocorreram da seguinte forma: nas primeiras 24 horas após a ovulação foram colhidas amostras a cada oito horas; a partir deste momento, foram realizadas colheitas a cada quatro horas até o D4 e após, a cada 12 horas até o D6. A figura 2 ilustra os intervalos adotados para as venopunções.

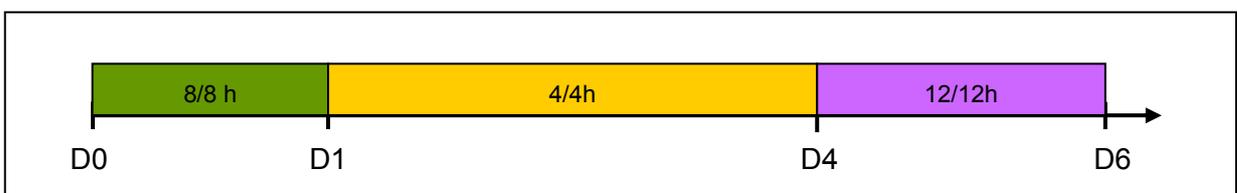


Figura 2 - Intervalos entre colheitas de sangue em novilhas bubalinas

As amostras foram centrifugadas a 3000g durante 15 minutos (Centrífuga Excelsa Baby, Fanem®) e o sobrenadante foi pipetado, dividido em duas alíquotas (uma para cada hormônio) e acondicionado em criotubos para posterior armazenamento em freezer a -20°C. As dosagens foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia Animal, Departamento de Apoio e Produção em Saúde Animal, da Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, UNESP – Araçatuba.

O método empregado foi o de radioimunoensaio de duplo anticorpo para dosagem de FSH e LH bovinos, conforme metodologia descrita por Bolt, Scott e Kiracofe (1990). Utilizou-se para o ensaio de FSH, o primeiro anticorpo NIDDK-anti-oFSH-1 a uma diluição de 1:30.000, e para o ensaio de LH, o primeiro anticorpo NIDDK-anti-o-LH-1 a uma diluição de 1:300.000. A validação do ensaio na espécie bubalina foi realizada pelo teste de paralelismo, cujas curvas estão ilustradas nos gráficos 1 e 2. A sensibilidade no ensaio de LH foi de 0,01 ng/ml. Os coeficientes de variação intra e inter-ensaio foram <19,3% e 9,7%, respectivamente. Para o FSH, a

sensibilidade foi de 0,1 ng/ml e os coeficientes intra e inter-ensaio foram <7,7% e 5,1%, respectivamente.

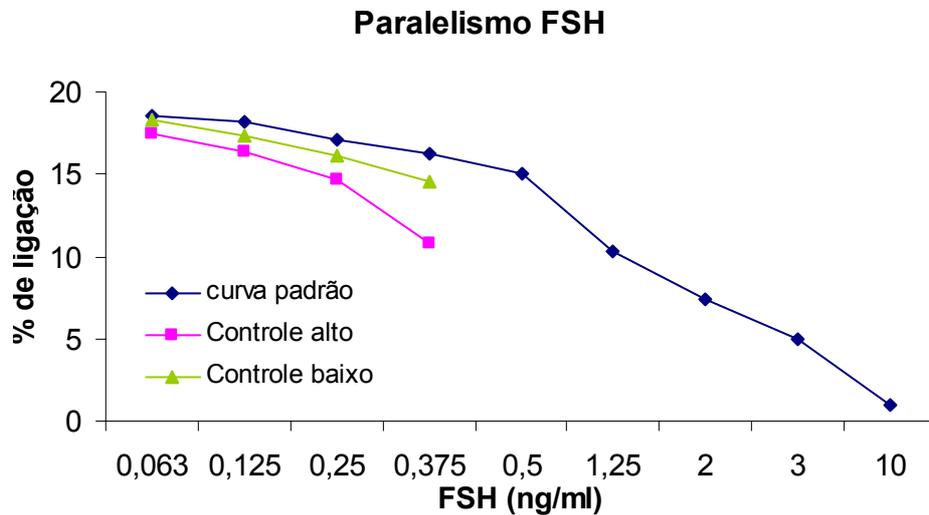


Gráfico 1 - Teste de paralelismo para validação do ensaio de FSH na espécie bubalina. Coeficiente de correlação = 1,0. Araçatuba - SP, 2005

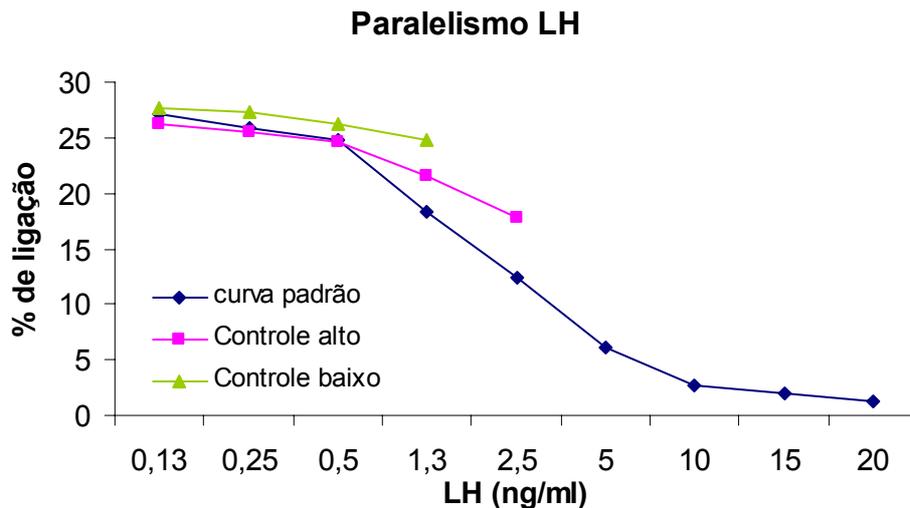


Gráfico 2 - Teste de paralelismo para validação do ensaio de LH na espécie bubalina. Coeficiente de correlação = 0,99. Araçatuba - SP, 2005

3.2 EXPERIMENTO 2: DIVERGÊNCIA FOLICULAR EM NOVILHAS ZEBUÍNAS (*Bos indicus*)

3.2.1 Animais e Local do Experimento

Foram utilizadas 18 novilhas Nelore (*Bos indicus*) cíclicas, com idade variando entre 20 e 24 meses e peso acima de 325 kg. Os animais pertencentes à Área de Produção de Bovinos de Corte (Santa Maria), da Faculdade de Zootecnia da Universidade de São Paulo, campus de Pirassununga – SP, foram mantidos em regime a pasto (*Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha*) com água *ad libitum*.

3.2.2 Protocolo de Sincronização da Ovulação

Em dia aleatório do ciclo estral, os animais foram tratados com 2mg de Benzoato de Estradiol (BE) IM (Index Farmacêutica, Brasil) e com um implante auricular de Norgestomet (Crestar[®], Intervet, Brasil). Oito dias após, os implantes foram removidos e administrou-se 0,15mg de d-Cloprostenol IM (Preloban[®], Intervet, Brasil). Vinte e quatro horas após a retirada dos implantes, as fêmeas receberam 1mg de BE IM. A figura 3 resume o tratamento previamente descrito.

3.2.3 Avaliações Ultra-sonográficas

A partir da retirada do implante, as novilhas foram avaliadas por ultrasonografia transretal (Aloka SSD-500, Japão) a cada 12h até o quinto dia do ciclo estral (Dia 0 - dia da ovulação) para verificar o momento da ovulação e também o momento e o diâmetro na divergência folicular, como demonstrado na figura 3.

3.2.4 Colheita de Sangue e Dosagem das Concentrações Plasmáticas de LH e FSH

Em todos os animais foram colhidas amostras de 10 ml de sangue da veia jugular, em tubos heparinizados, para dosagem de LH e FSH, em intervalos de 12 horas a partir da ovulação até o quinto dia, conforme figura 3.

A metodologia para obtenção e armazenamento do plasma, bem como para a realização das dosagens de ambas gonadotrofinas são as mesmas previamente descritas na seção Materiais e Métodos do Experimento 1 do presente Capítulo, exceto pelo fato das dosagens do presente experimento terem sido realizadas em um único ensaio. A sensibilidade do ensaio de LH foi de 0,02ng/ml e a de FSH de 0,005ng/ml. Os coeficientes de variação intra-ensaio foram 13,6% e 18,8%, respectivamente.

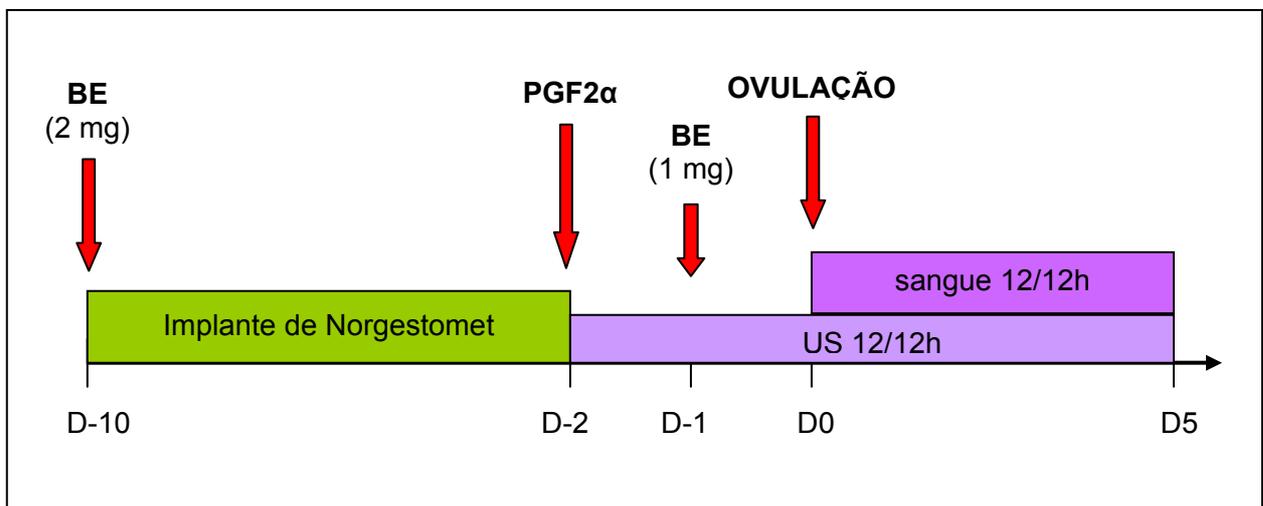


Figura 3 - Diagrama esquemático do tratamento hormonal e da frequência de exames ultra-sonográficos e de colheitas de sangue em novilhas zebuínas

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A divergência folicular foi analisada de duas formas: pelo método gráfico ou visual (GINTHER et al., 1996) e pelo método matemático de regressão linear simples e segmentada (BERGFELT et al., 2003). Para verificar se houve diferença estatística entre os resultados obtidos nos dois métodos utilizou-se o Teste-t de Student.

As taxas de crescimento antes e após o momento da divergência folicular foram calculados por meio de regressão linear simples e segmentada, e estão expressas pela média, como medida de tendência central e erro padrão da média (EPM), como medida de variabilidade. Também neste caso as comparações foram realizadas por Teste-t de Student.

As concentrações plasmáticas de FSH e LH foram testadas quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias pelo aplicativo Guided Analysis System, do programa estatístico SAS for Windows (versão 8.0, 2000), e foram avaliadas por ANOVA e análise de regressão (linear, quadrática e cúbica). Como os dados não seguiram às premissas, os mesmos foram transformados (logaritmo de base 10 – $\text{Log}_{10}X$ e raiz quadrada – $\text{SQRT } X$).

O nível de significância para rejeitar H_0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, ou seja, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis analisadas. Considerou-se tendência estatística quando os níveis de significância se encontraram entre 0,05 e 0,1.

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1: DIVERGÊNCIA FOLICULAR EM NOVILHAS BUBALINAS (*Bubalus bubalis*)

A ovulação, em resposta ao protocolo de sincronização, ocorreu $37,0 \pm 3,5$ horas após o último GnRH (média \pm EPM) em 63,2% dos animais (12/19), quando o folículo pré-ovulatório apresentou diâmetro de $11,9 \pm 0,6$ mm.

Embora inicialmente se tenha acompanhado 12 novilhas, duas foram excluídas das análises, pois apresentaram padrão anormal de desenvolvimento folicular, o que poderia levar ao comprometimento dos dados. A figura 4 ilustra a dinâmica dos dois maiores folículos na primeira onda de crescimento folicular, nas 10 novilhas bubalinas remanescentes.

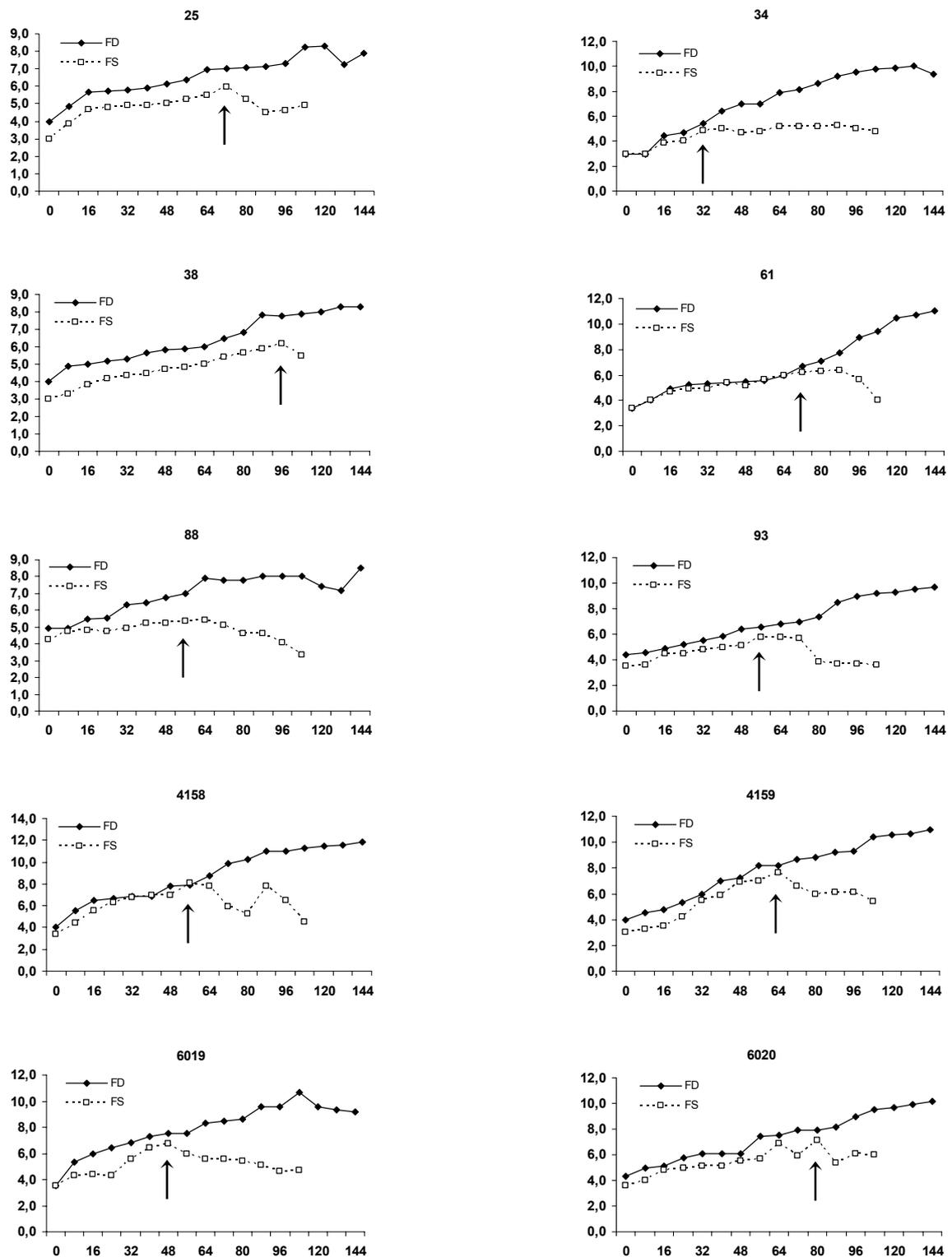


Figura 4 - Dinâmica folicular de novilhas bubalinas (n=10). As setas indicam o momento da divergência folicular detectado pelo método visual. O eixo das ordenadas representa os diâmetros foliculares (mm), e o das abscissas, o momento a partir da ovulação (horas). Registro – SP, 2004

Em média, já no D0 (ovulação), o futuro folículo dominante pôde ser visualizado com maior diâmetro ($4,0 \pm 0,2\text{mm}$; $P=0,007$) que o futuro folículo subordinado ($3,4 \pm 0,1\text{mm}$). Entretanto, do total de animais, 70% (7/10) apresentaram este padrão (FD: $4,2 \pm 0,1\text{mm}$ vs. FS: $3,4 \pm 0,1\text{mm}$; $P=0,001$), ao passo que em 30% (3/10) foi verificado o mesmo diâmetro para o FD e para o FS no início da onda de crescimento folicular ($3,3 \pm 0,2\text{mm}$; $P=0,5$).

O momento da divergência folicular avaliado pelos métodos visual e matemático foi de, respectivamente, $63,2 \pm 5,7$ horas (h; 2,6 dias) e $61,9 \pm 4,9$ h (2,6 dias) após a ovulação. Os diâmetros foliculares no momento do desvio foram de $7,2 \pm 0,3\text{mm}$ para o folículo dominante e de $6,4 \pm 0,3\text{mm}$ para o folículo subordinado no método visual, e de $7,3 \pm 0,3\text{mm}$ para o FD e $6,3 \pm 0,3\text{mm}$ para o FS no método matemático. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os dois métodos de avaliação da divergência folicular para todas as variáveis analisadas.

No gráfico 3 está sumariado o padrão de desenvolvimento folicular de todas as novilhas, normalizado para o momento desvio folicular (0h).

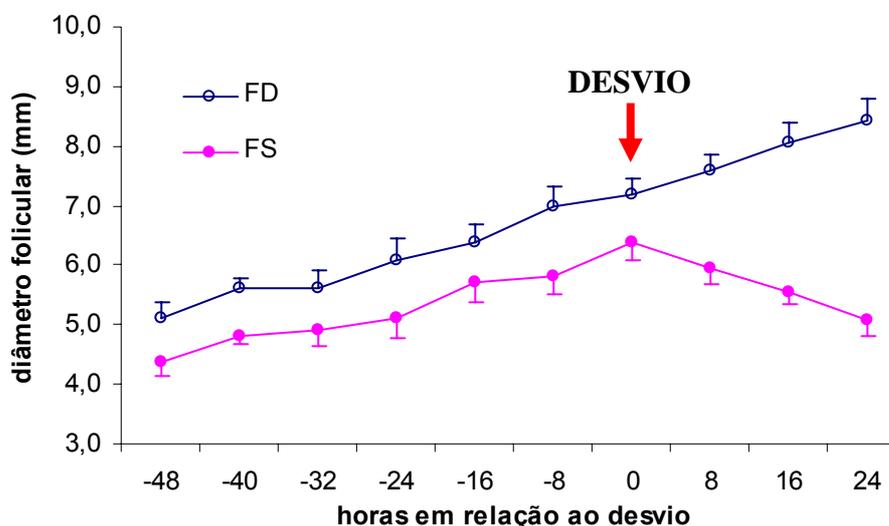


Gráfico 3 - Diâmetros dos folículos dominante e subordinado no momento da divergência folicular em bubalinos (n=10). Avaliação pelo método visual. Registro - SP, 2004

As taxas de crescimento (mm/ 8h) foram semelhantes ($P=0,68$) para o folículo dominante antes e após a divergência folicular ($0,42 \pm 0,04$ vs. $0,43 \pm 0,07$). No folículo subordinado, a taxa de crescimento foi maior ($P<0,0001$) antes do que após o desvio ($0,38 \pm 0,05$ vs. $-0,47 \pm 0,08$). Comparativamente, a taxa de crescimento do folículo dominante em relação ao subordinado diferiu após a divergência folicular ($P<0,0001$). A tabela 1 representa as taxas de crescimento do FD e FS antes e após o desvio folicular.

Tabela 1 - Taxa de crescimento (mm/8h) do folículo dominante (FD) e do folículo subordinado (FS) antes e após a divergência folicular em novilhas bubalinas. Registro – SP, 2004

Animal	FD		FS	
	Antes	Após	Antes	Após
25	0,28	0,10	0,25	-0,47
34	0,65	0,53	0,48	-0,03
38	0,23	0,00	0,24	-
61	0,30	0,73	0,26	-0,17
88	0,34	0,27	0,15	-0,27
93	0,33	0,27	0,31	-0,63
4158	0,52	0,77	0,61	-0,93
4159	0,60	0,33	0,65	-0,50
6019	0,60	0,33	0,54	-0,40
6020	0,37	0,53	0,31	-0,55
Média±EPM	0,42 ± 0,04^a	0,43 ± 0,07^a	0,38 ± 0,05^a	-0,47 ± 0,08^b

Taxas de crescimento com diferentes letras sobrescritas apresentam diferença estatística ($P<0,05$)

Os perfis de FSH e LH, normalizados a partir da ovulação, estão demonstrados individualmente na figura 5.

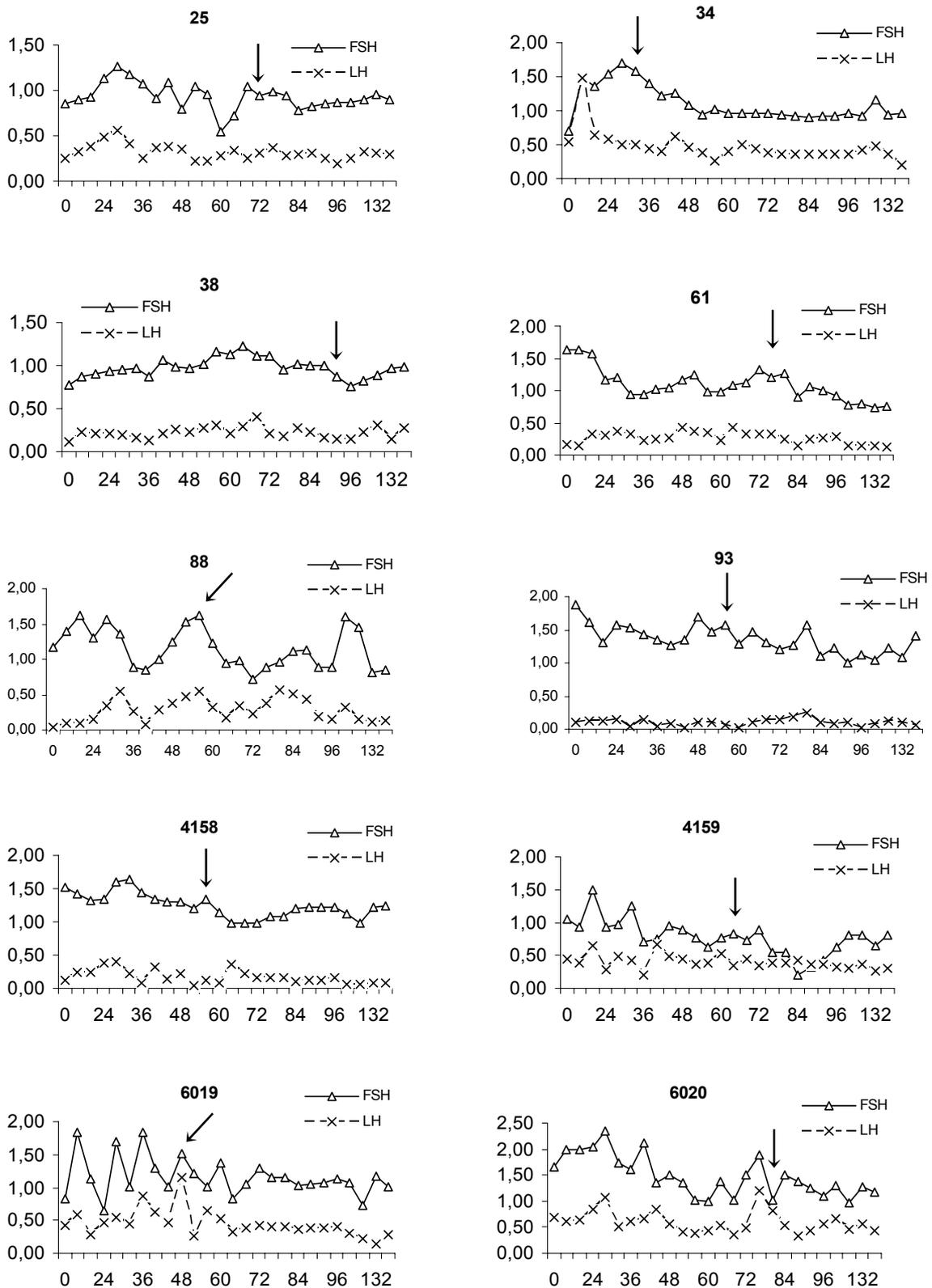


Figura 5 - Concentrações plasmáticas de FSH e LH normalizadas para a ovulação (0h) em novilhas bubalinas (n=10). O eixo das ordenadas representa a concentração plasmática (ng/ml) e o eixo das abscissas o momento (horas). As setas indicam o momento da divergência folicular. Registro – SP, 2004

Não houve efeito de momento sobre as concentrações plasmáticas de LH ($P=0,96$) e de FSH ($P=0,32$) pelo ANOVA, e tampouco para o LH quando analisado por regressão ($P>0,1$ nas análises de regressão linear, quadrática e cúbica). Quanto ao FSH, houve efeito apenas quando se empregou a regressão linear ($P=0,0001$), contudo, o coeficiente de regressão desta variável foi baixo ($r^2=0,10$), indicando que apenas pequena parte do efeito observado é atribuído à variável tempo.

Apesar de não se verificar efeito significativo de tempo sobre os níveis de FSH e LH em novilhas bubalinas, visualmente se pôde observar que o nadir das concentrações plasmáticas de FSH ocorreu 4 horas antes da divergência até 16 horas após (1,11ng/ml, em média), em relação aos níveis máximos observados 40 horas antes do desvio (1,53ng/ml).

O gráfico 4 ilustra os dados de LH e de FSH de todas as novilhas, normalizado para o momento do desvio folicular (0h).

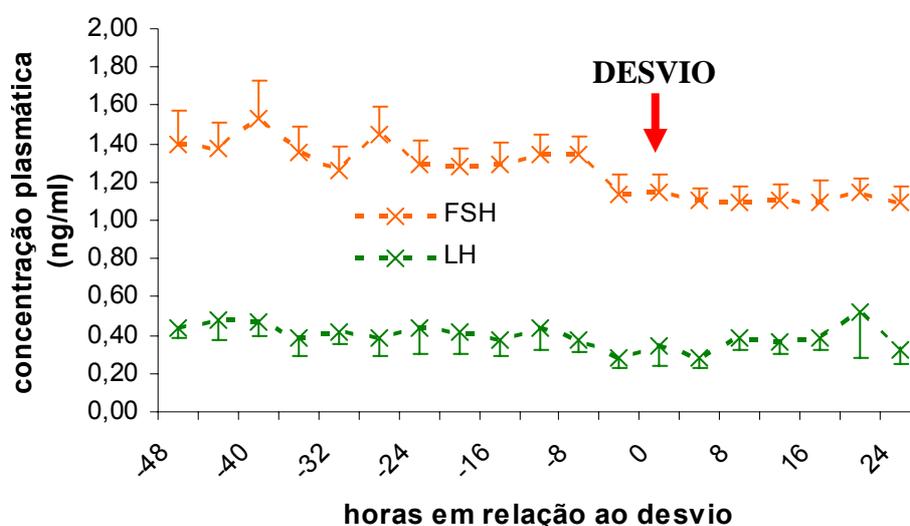


Gráfico 4 - Concentrações plasmáticas de FSH e LH normalizadas para o momento do desvio folicular (0h) em novilhas bubalinas (n=10). Registro – SP, 2004

A fim de ilustrar as relações entre o crescimento folicular e os padrões hormonais em novilhas bubalinas, todos estes parâmetros foram agrupados no gráfico 5. Neste caso, os dados referentes às concentrações plasmáticas de FSH e LH foram ajustados para intervalos de oito horas, para que se adequassem ao gráfico de dinâmica folicular.

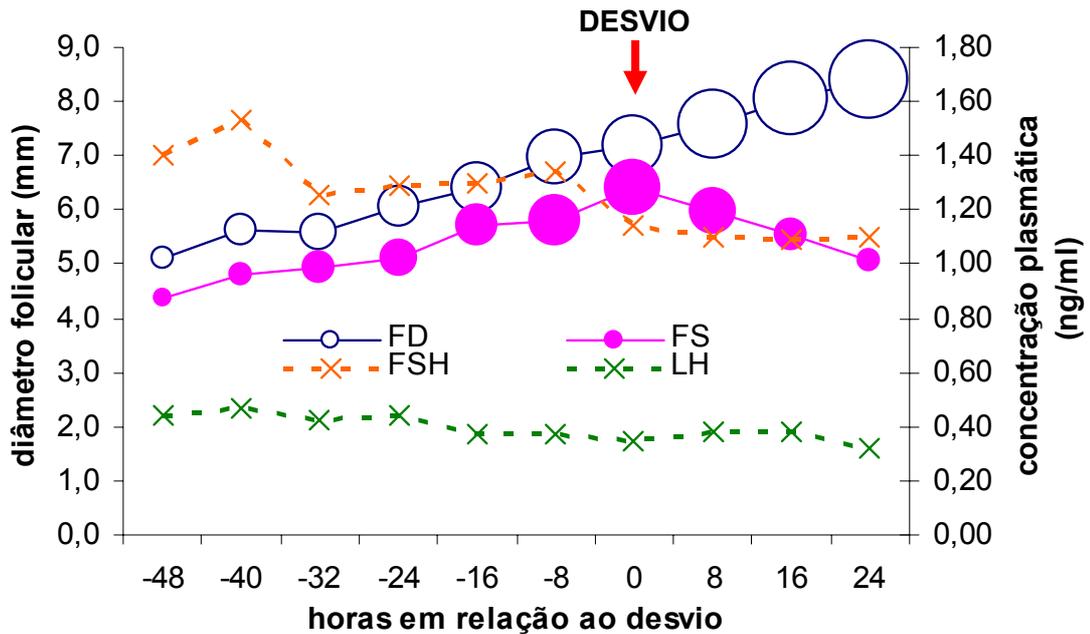


Gráfico 5 - Diâmetros médios dos folículos dominante e subordinado e concentrações plasmáticas de FSH e LH normalizados para o momento da divergência folicular em novilhas bubalinas (n=10). Registro – SP, 2004

4.2 EXPERIMENTO 2: DIVERGÊNCIA FOLICULAR EM NOVILHAS ZEBUÍNAS (*Bos indicus*)

Das 18 novilhas submetidas à sincronização da ovulação, 83,3% (15/18) ovularam após $70,4 \pm 1,6$ h da retirada do implante auricular. O diâmetro do folículo ovulatório foi de $11,9 \pm 0,4$ mm. Após as análises, três animais foram excluídos por se comportarem como outliers. Os padrões individuais de desenvolvimento dos dois maiores folículos em 12 novilhas zebuínas estão postados na figura 6.

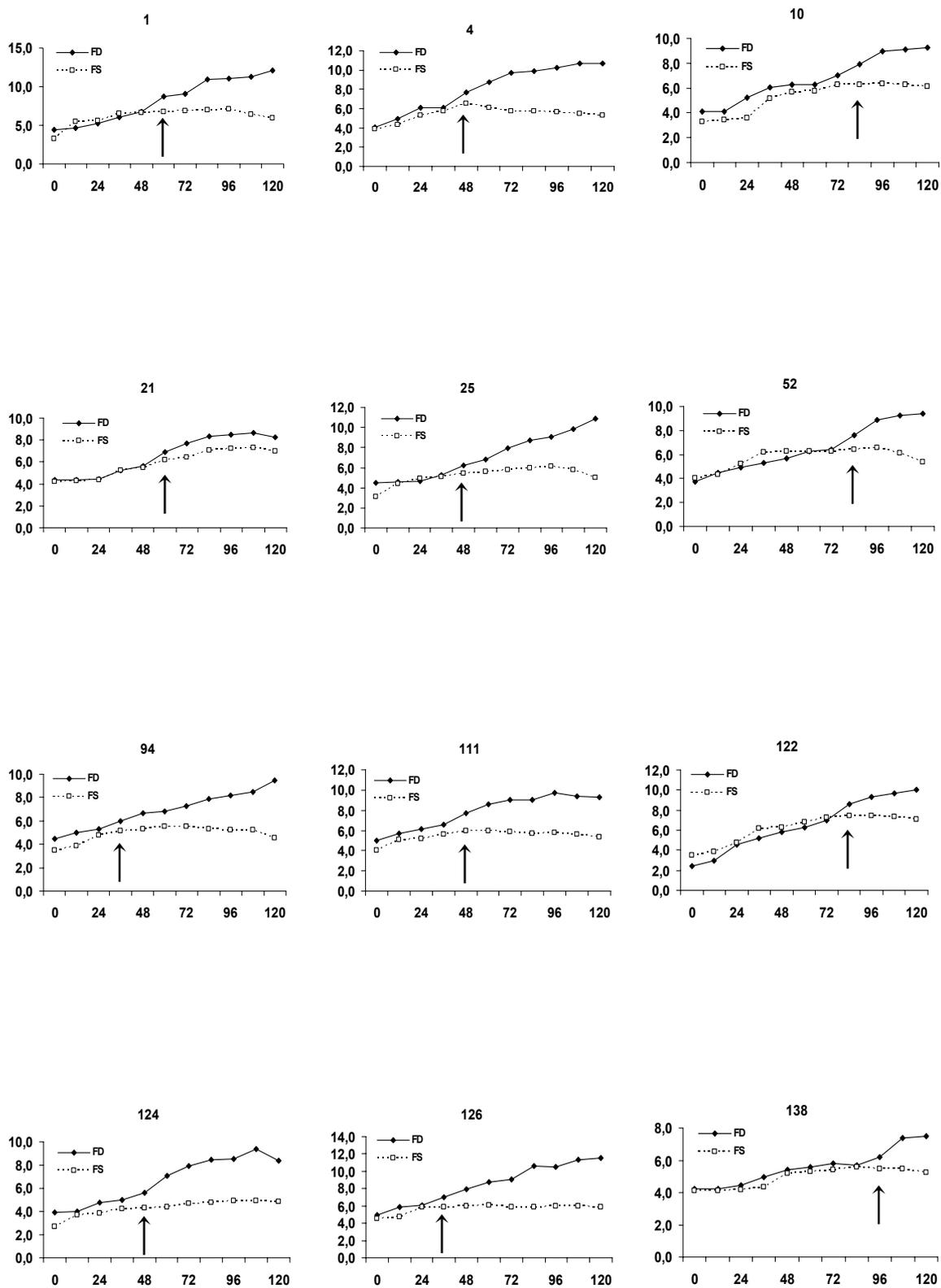


Figura 6 - Dinâmica folicular de novilhas zebuínas (n=12). As setas indicam o momento da divergência folicular detectado pelo método visual. O eixo das ordenadas representa os diâmetros foliculares (mm) e o das abscissas, o momento a partir da ovulação (horas). Pirassununga – SP, 2004

Em média, já no D0 (ovulação), o futuro folículo dominante pôde ser visualizado com maior diâmetro ($4,2 \pm 0,2\text{mm}$; $P=0,03$) que o futuro folículo subordinado ($3,7 \pm 0,2\text{mm}$). Do total de animais, 83,3% (10/12) manifestaram diferenças ($P=0,001$) entre o diâmetro do folículo dominante ($4,4 \pm 0,1\text{mm}$) e do folículo subordinado ($3,7 \pm 0,2\text{mm}$). Apenas 16,7% (2/12) das novilhas apresentaram folículos com diâmetros semelhantes no início da onda de crescimento folicular (FD: $3,1 \pm 0,7\text{mm}$; FS: $3,8 \pm 0,3\text{mm}$; $P=0,21$).

O momento da divergência folicular avaliado pelos métodos visual e matemático foi de, respectivamente, $61,0 \pm 6,0\text{h}$ (2,5 dias) e $57,2 \pm 6,3\text{h}$ (2,4 dias) após a ovulação (média \pm EPM). Os diâmetros foliculares no momento do desvio foram de $6,2 \pm 0,2\text{mm}$ para o folículo dominante (FD) e de $5,8 \pm 0,2\text{mm}$ para o folículo subordinado (FS) no método visual, e de $6,2 \pm 0,3\text{mm}$ para o FD e $5,9 \pm 0,3\text{mm}$ para o FS no método matemático. Não houve diferença significativa entre os dois métodos de avaliação da divergência folicular ($P>0,05$) para as variáveis analisadas.

O gráfico 6 representa os valores médios do desenvolvimento dos dois maiores folículos de todos os animais ($n=12$), normalizados para o momento da divergência folicular (0h), avaliados pelo método visual.

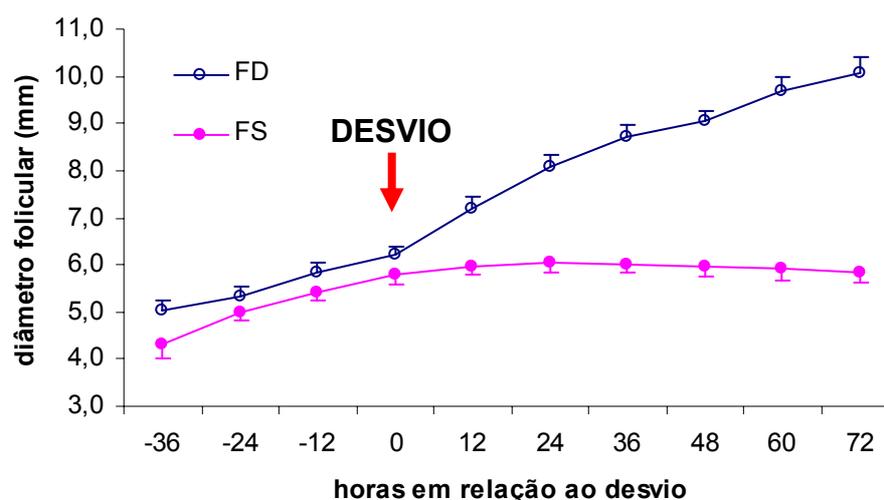


Gráfico 6 - Diâmetros dos folículos dominante e subordinado no momento da divergência folicular em novilhas zebuínas ($n=12$). Avaliação pelo método visual. Pirassununga - SP, 2004

As taxas de crescimento do folículo dominante (mm/12h) não se alteraram de forma significativa ($P=0,12$) antes e após a divergência folicular ($0,50 \pm 0,08$ vs. $0,60 \pm 0,05$). No folículo subordinado, a taxa de crescimento foi maior ($P<0,0001$) antes do que após o desvio folicular ($0,64 \pm 0,08$ vs. $-0,06 \pm 0,04$). Comparativamente, a taxa de crescimento do folículo dominante em relação ao subordinado diferiu após a divergência folicular ($P<0,0001$). A tabela 2 representa as taxas de crescimento do FD e FS antes e após o desvio folicular.

Tabela 2 - Taxa de crescimento (mm/12h) do folículo dominante (FD) e do folículo subordinado (FS) antes e após a divergência folicular em novilhas zebuínas. Pirassununga – SP, 2004

ANIMAL	FD		FS	
	Antes	Após	Antes	Após
1	0,55	0,81	0,98	-0,09
4	1,00	0,61	0,72	-0,12
10	0,53	0,56	0,58	-0,03
21	0,03	0,41	0,07	0,21
25	0,41	0,75	0,54	-0,08
52	0,48	0,76	0,53	-0,21
94	0,53	0,38	0,49	-0,22
111	0,65	0,42	1,10	0,00
122	0,90	0,78	0,79	0,05
124	0,10	0,58	1,00	0,13
126	0,55	0,67	0,65	0,00
138	0,26	0,42	0,25	-0,29
Média EPM	$0,50 \pm 0,08^a$	$0,60 \pm 0,05^a$	$0,64 \pm 0,08^a$	$-0,06 \pm 0,04^b$

Taxas de crescimento com diferentes letras sobrescritas apresentam diferença estatística ($P<0,05$)

A variação nas concentrações plasmáticas de FSH e de LH, a partir da ovulação, está representada em gráficos individuais na figura 7.

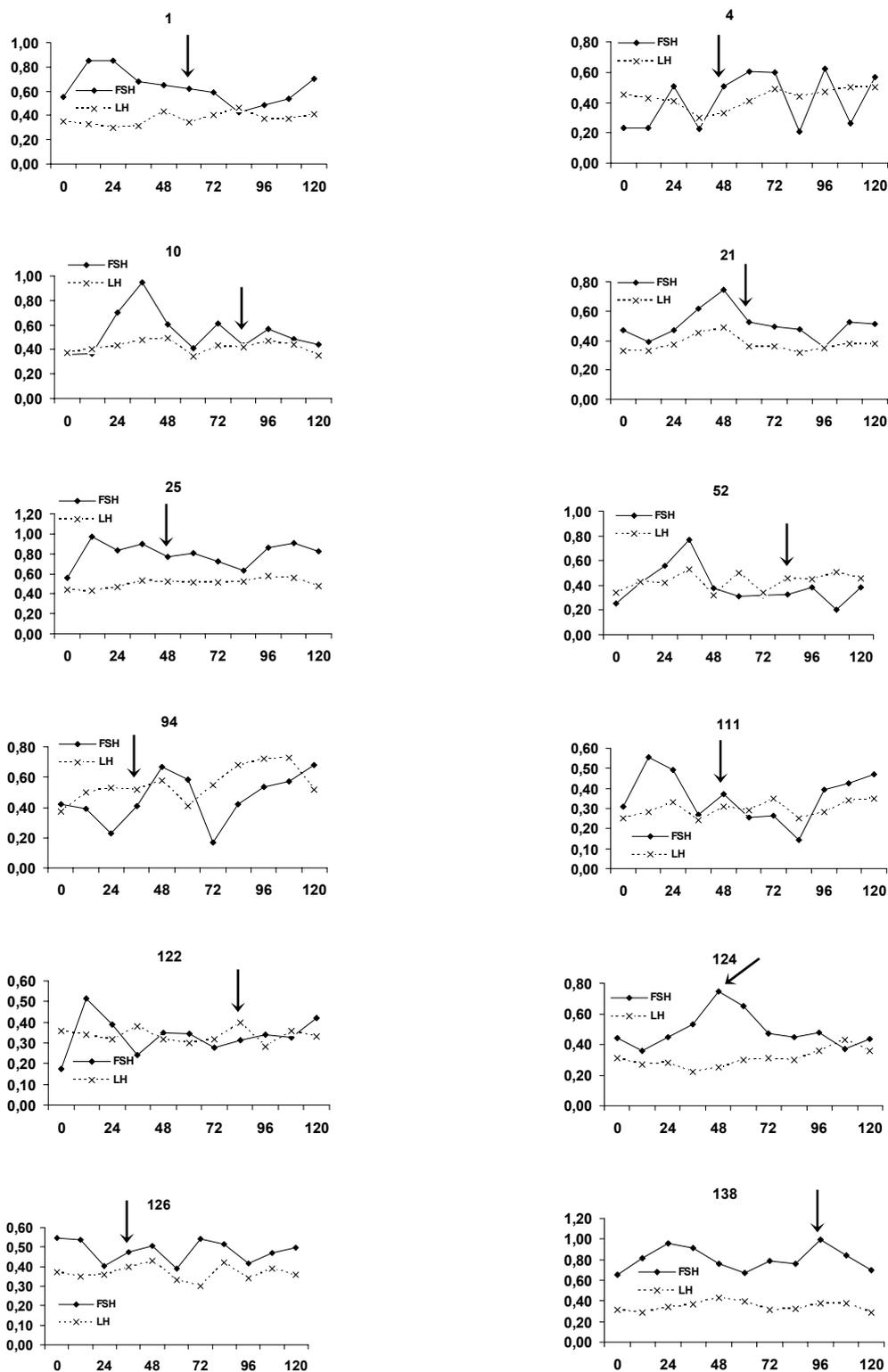


Figura 7 - Concentrações plasmáticas de FSH e de LH normalizadas para a ovulação (0h) em novilhas zebuínas (n=12). O eixo das ordenadas representa a concentração plasmática (ng/ml) e o eixo das abscissas, o momento (horas). As setas indicam o momento da divergência folicular. Pirassununga – SP, 2004

Não houve efeito de momento sobre as concentrações plasmáticas de FSH ($P=0,15$) e de LH ($P=0,80$), quando se procedeu com análise de variância. Entretanto, este efeito foi observado quando se empregou análise de regressão linear em ambas gonadotrofinas ($P=0,004$ e $P=0,005$, respectivamente). Apesar disto, os coeficientes de regressão foram baixos (FSH: $r^2=0,08$; LH: $r^2=0,03$), indicando que apenas pequena parte do efeito observado é atribuído à variável tempo.

Embora estatisticamente não se tenha verificado variação nas concentrações de gonadotrofinas ao longo do tempo em novilhas Nelore, os níveis de FSH atingiram os menores valores plasmáticos 36 (0,40ng/ml) e 60 horas (0,42ng/ml) após a divergência, comparativamente às 36 horas anteriores ao desvio, quando as concentrações foram máximas (0,63ng/ml).

No gráfico 7 estão representados os padrões de FSH e LH, normalizados para o momento da divergência folicular (0h) em novilhas Nelore.

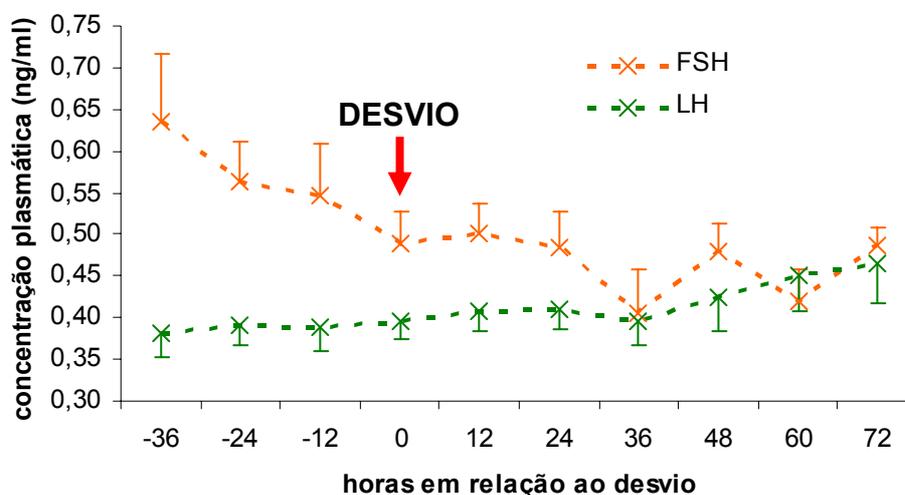


Gráfico 7 - Concentrações plasmáticas de FSH e de LH normalizadas para o momento do desvio folicular (0h) em novilhas zebuínas (n=12). Pirassununga – SP, 2004

No gráfico 8, os perfis hormonais das novilhas Nelore foram temporalmente associados à dinâmica folicular.

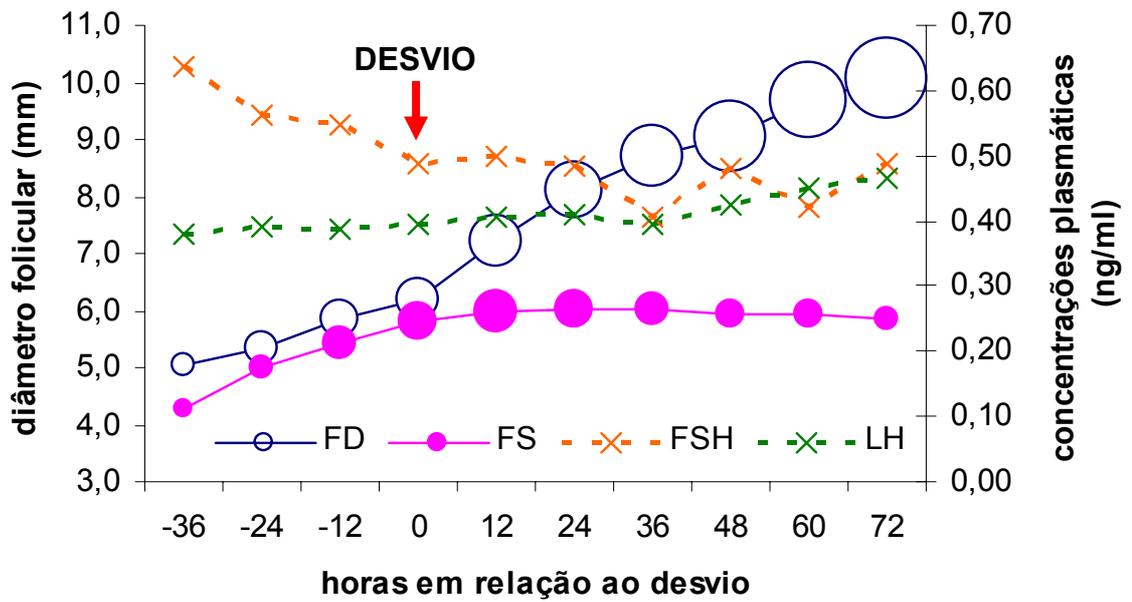


Gráfico 8 - Diâmetros médios dos folículos dominante e subordinado e concentrações plasmáticas de FSH e LH normalizados para o momento da divergência folicular em novilhas zebuínas (n=12). Pirassununga – SP, 2004

5 DISCUSSÃO

A dinâmica dos dois maiores folículos, tanto em novilhas *Bubalus bubalis* quanto em novilhas *Bos indicus*, foi marcada por uma fase de desenvolvimento comum e, após a divergência folicular, pelo decréscimo nas taxas de crescimento do maior folículo subordinado, assim como previamente descrito em novilhas *Bos taurus* (Holandesas; GINTHER et al., 2001a) e em novilhas *Bos indicus* (Nelore; CASTILHO, 2003; SARTORELLI, 2003).

Entretanto, logo após a ovulação foram observadas diferenças nos diâmetros entre o futuro folículo dominante e o futuro folículo subordinado em ambas as espécies, corroborando com relatos prévios em novilhas Holandesas de que o folículo selecionado para dominância já apresenta vantagem em tamanho no momento da emergência da onda de crescimento folicular (KULICK et al., 1999) e/ou da divergência folicular (GINTHER et al., 1996). Embora de difícil comprovação, esta informação sugere que a seleção tem início antes da detecção ultra-sonográfica do recrutamento folicular, possivelmente em fase antral inicial ou pré-antral.

No presente experimento, ambos os métodos de avaliação de momento e diâmetros foliculares relacionados à divergência folicular demonstraram efetividade, não diferindo estatisticamente, em concordância com Bergfelt et al. (2003), Sartorelli (2003) e Sartorelli et al. (2005).

Ginther et al. (1996, 1997) citam que o momento do desvio ocorre 2,8 dias após a emergência folicular. Entretanto, no trabalho que embasou estas publicações (BODENSTEINER et al., 1996), a emergência da primeira onda de crescimento folicular foi observada 10,7 horas antes da ovulação, em animais tratados com GnRH. Portanto, em relação à ovulação, o desvio em novilhas Holandesas ocorre com cerca de 2,4 dias. Já em novilhas e vacas Nelore (SARTORELLI, 2003; SARTORELLI et al., 2005) este período varia entre 2,9 a 2,4 dias após a ovulação. Sendo assim, na presente investigação, o momento obtido na divergência folicular em bubalinos e zebuínos foi semelhante aos descritos na literatura, à exceção do período reportado por Castilho (2003), que verificou a divergência folicular 3,5 dias após a ovulação. Apesar das pequenas diferenças constatadas em estudos realizados entre os grupos genéticos citados acima, o momento da divergência folicular parece ser semelhante entre bovinos (taurinos e zebuínos) e bubalinos.

Comparativamente a novilhas *Bos taurus*, as novilhas *Bubalus bubalis* e *Bos indicus* apresentaram menores diâmetros foliculares ao desvio, confirmando parte da hipótese proposta pelo presente estudo. Porém, em bubalinos os diâmetros atingidos pelos dois maiores folículos na divergência foram superiores aos verificados em zebuínos.

No presente trabalho, os diâmetros foliculares no momento do desvio em novilhas Nelore se assemelham àqueles descritos por Sartorelli (2003), tanto pelo método visual (FD: $5,7 \pm 0,2$ e FS: $5,5 \pm 0,1$), quanto pelo método matemático (FD: $5,8 \pm 0,3$), embora no presente estudo os valores tenham sido discretamente maiores. Por outro lado, houve discrepância com os resultados de Castilho (2003), que encontrou diâmetros de $7,2 \pm 0,4$ mm para o folículo dominante no início da divergência. Castilho (2005)⁴, revelou que a diferença entre estes estudos foi decorrente do momento no qual foi definido o início do desvio folicular, que coincidiu com o ponto em que o crescimento do maior subordinado se estabilizou completamente (informação verbal). Isto correspondeu ao período adicional de 12 horas e cerca de 1mm em relação ao presente estudo e ao de Sartorelli (2003).

Admitindo-se que existem diferenças no diâmetro máximo do folículo dominante em cada onda de crescimento folicular em fêmeas bubalinas (Murrah; BARUSELLI et al., 1997; MANIK; MADAN; SINGLA, 1994), taurinas (Holandês; GINTHER et al., 1989) e zebuínas (Nelore; FIGUEIREDO et al., 1997), seria justificável que estas diferenças também se manifestassem no diâmetro relacionado à divergência.

Outro fator que pode ter contribuído para os menores tamanhos foliculares no desvio, encontrados nas novilhas bubalinas e zebuínas em relação às novilhas taurinas, são as taxas de crescimento folicular. Visto que o momento da divergência sofre pouca variação, as diferenças de diâmetro verificadas em cada grupo genético poderiam ser atribuídas às diferenças nas taxas de crescimento.

Em *Bos taurus* as taxas de crescimento são semelhantes no folículo dominante antes e após o desvio folicular ($1,4$ mm/16h; GINTHER et al., 2001c), e entre o folículo dominante e o maior subordinado até a fase de desenvolvimento paralelo ($1,4$ mm/16h vs. $1,0$ mm/16h - GINTHER et al., 2001c; $0,5$ mm/8h - KULICK et al., 1999), passando a diferir apenas após a seleção ($0,1$ mm/16h - GINTHER et al.,

⁴ Informação fornecida por Castilho na XIX Reunião da SBTE, no dia 26 de agosto de 2005

2001c). Este mesmo padrão foi constatado no presente estudo, tanto em novilhas *Bubalus bubalis* (FD antes vs. após: 1,26mm/dia vs. 1,29mm/dia; FS antes vs. após: 1,14mm/dia vs. -1,41mm/dia) quanto em *Bos indicus* (FD antes vs. após: 0,96mm/dia vs. 1,10mm/dia; FS antes vs. após: 1,24mm/dia vs. -0,10mm/dia), demonstrando que nestes animais as taxas de crescimento são inferiores às de taurinos, reforçando a suposição acima.

Ainda, sobre as taxas de crescimento, os dados do presente experimento em bubalinos são semelhantes aos descritos por Presicce et al. (2004) em novilhas Mediterrâneo (1,2mm/dia), contudo são menores do que os relatados por Baruselli et al. (1997) em vacas Murrah (1,7 a 1,9mm/dia). É importante, porém, verificar que nestes trabalhos o objetivo não foi avaliar o fenômeno da divergência folicular, mas sim a dinâmica folicular durante o ciclo estral. É possível que estas discrepâncias sejam decorrentes das diferentes categorias animais, pois no presente trabalho e no de Presicce et al. (2004), nos quais foram encontradas menores taxas de crescimento, os animais empregados nos estudos eram novilhas. No trabalho de Presicce et al. (2004) foi constatado que as novilhas apresentaram taxas de crescimento de 1,2mm/dia, e as vacas Mediterrâneo apresentaram taxas de 1,6mm/dia, e esta diferença foi significativa. No experimento conduzido por Baruselli et al. (1997), foram utilizadas somente múltíparas e, portanto, maiores taxas de crescimento foram detectadas. Por sua vez é notório que as disparidades entre nulíparas e múltíparas não se limitam somente às taxas de crescimento, mas também aos diâmetros atingidos em cada onda folicular, como reportado por Presicce et al. (2004) que verificaram na primeira onda folicular, diâmetro máximo de 10,5mm em novilhas e de 13,3 mm em vacas (P=0,006).

Em novilhas Nelore, as taxas de crescimento do folículo dominante e do subordinado foram menores no presente estudo do que as enunciadas em outros trabalhos que analisaram o desvio folicular em novilhas desta mesma raça. As taxas de crescimento no folículo dominante antes e após o desvio variam de 1,27mm/dia (em média; CASTILHO, 2003) a 1,5mm/dia (em média; SARTORELLI, 2003). No maior subordinado, descreve-se crescimento de 1,0mm/dia (CASTILHO, 2003; SARTORELLI, 2003) até a fase em paralelo e após, de 0,1mm/dia (SARTORELLI, 2003). Esta discrepância observada no presente experimento pode ser derivada de diferentes condições de manejo e/ou climáticas aos quais os animais tenham sido submetidos.

Outro ponto a ser considerado é relativo ao modo como foram calculadas estas taxas de crescimento. No presente estudo, o desvio folicular foi considerado como o momento 0, em relação ao qual a seqüência de eventos a ele conectados só poderia ser anterior ou posterior, utilizando metodologia empregada por Ginther et al., 2001c. No caso dos trabalhos de Castilho (2003) e Sartorelli (2003), dividiram-se as taxas de crescimento em três períodos: antes, durante e após a divergência folicular, por influência de trabalhos da equipe de Ginther, conduzidos até 2000. Talvez as diferenças observadas nas taxas de crescimento do folículo subordinado após a divergência folicular sejam oriundas destas distintas metodologias.

Apesar do desacordo referido anteriormente, as taxas de crescimento folicular do presente trabalho são semelhantes às descritas por Figueiredo et al. (1997), que verificaram na primeira onda, média de 0,92mm/dia para folículos dominantes, e de 0,99mm/dia para o maior subordinado. Ainda, os valores obtidos no presente estudo estão de acordo com outro experimento (CARVALHO, 2004), no qual as taxas de crescimento do folículo dominante de novilhas Nelore, durante tratamento para sincronização de ovulação, foram de 0,9mm/dia. É interessante notar que quando os dados deste autor foram reunidos por grupo genético, ou seja, *Bos indicus*, *Bos taurus* e cruzados (*Bos indicus* x *Bos taurus*), as taxas de crescimento foram menores no primeiro grupo (0,9mm/dia) do que nos subseqüentes (1,2 e 1,1mm/dia, respectivamente). Conjuntamente estes resultados demonstram que, de fato, as taxas de crescimento em bovinos da raça Nelore são menores do que as de bovinos da raça Holandesa, e que pequenas diferenças podem ser detectadas entre os diversos experimentos.

Referente às concentrações plasmáticas de FSH e LH, há bastante variação nos valores descritos na literatura, decorrentes de diferenças entre espécies/ raças, metodologias e períodos do ciclo estral.

Em bovinos da raça Holandesa, os níveis de FSH variam entre 0,2 a 11,5ng/ml antes da divergência (GINTHER et al., 1996, 1997, 2001c, 2002b). Após o desvio relata-se queda nos níveis circulantes deste hormônio para aproximadamente 0,1 a 8,5ng/ml (GINTHER et al., 1997, 1999, 2000, 2001c, 2002b; KULICK et al., 1999). Quanto ao LH, os valores oscilam entre 0,5 a 1,5ng/ml (GINTHER et al., 1999, 2000, 2001a; KULICK et al., 1999).

Em novilhas Nelore somente dois estudos determinaram as concentrações plasmáticas de FSH ao longo da primeira onda de crescimento folicular (BURATINI

JR. et al., 2000; CASTILHO, 2003). Em ambos foram detectados níveis máximos que não ultrapassaram 0,3ng/ml. Esse valor foi verificado um dia e meio (CASTILHO, 2003) e sete dias após a ovulação (BURATINI JR. et al., 2000). Os níveis mínimos descritos (cerca de 0,04ng/ml) foram atingidos no terceiro dia do ciclo estral, no trabalho conduzido por Buratini Jr et al. (2000). Não foram encontrados dados relativos ao LH em novilhas Nelore cíclicas, contudo, em novilhas pré-púberes se observou aumento nos níveis de LH proporcionalmente ao crescimento destes animais, atingindo concentrações médias de 0,42ng/ml aos 16 meses (NOGUEIRA, 2003). As concentrações plasmáticas de FSH e LH encontradas no presente trabalho foram discretamente superiores às relatadas em animais da raça Nelore, e estão dentro dos padrões de bovinos Holandeses.

Em bubalinos, os níveis de FSH encontrados no presente trabalho são compatíveis com os detectados por Presicce et al. (2004), que verificaram valores aproximados entre 1,5ng/ml no dia da ovulação a 0,75ng/ml no sexto dia do ciclo estral. No entanto, estas concentrações mostram-se abaixo das referidas por Singh et al. (2001), que encontraram 15ng/ml, em média, durante o ciclo estral. Quanto aos níveis de LH, são apontadas concentrações basais que variam entre os autores consultados: abaixo de 0,5ng/ml (BERBER, 2003), 5ng/ml (AVENELL; SAEPUDIN; FLETCHER, 1985) e 10ng/ml (SINGH et al., 2001). Essas discrepâncias podem ser justificadas pelos diferentes ensaios utilizados pelos diversos grupos de pesquisa.

Não se observou redução significativa nas concentrações de FSH previamente ao desvio, tampouco elevação transitória nos níveis de LH em torno do período da divergência folicular, contrariamente ao descrito por Ginther et al. (1998, 1999) e Kulick et al. (1999), em novilhas Holandesas. A despeito da diferença estatística obtida através de análise de regressão linear, os baixos coeficientes de regressão em ambos experimentos demonstraram que apenas pequena parte do efeito observado é atribuído à variável tempo.

Talvez o número de animais tenha sido insuficiente para gerar significância estatística e, associado a este fator, a heterogeneidade observada nos perfis de ambas gonadotrofinas nos animais analisados pode ter conduzido a estes resultados.

Relativo aos perfis de gonadotrofinas obtidos em novilhas Nelore, é possível que não tenham sido encontradas diferenças significativas ao longo do tempo devido ao maior intervalo (12 horas) entre as venopunções no presente experimento em

comparação à metodologia empregada por Ginther et al. (1996; intervalos de 8 horas). A escolha desta frequência de colheitas de sangue foi proposital, visto que Sartorelli (2003) descreve em sua Dissertação que a tentativa de realizar exames ultra-sonográficos a cada oito horas poderia comprometer os resultados do experimento, devido ao estresse causado pelo intenso manejo promovido aos animais. Inversamente, em bubalinos o insucesso em detectar diferenças nas concentrações plasmáticas de FSH e LH não pôde ser justificado pela frequência das colheitas (a cada 4 horas até o D4), exceto pelo fator estresse que poderia ter influenciado no padrão de liberação de LH, devido aos efeitos exercidos sobre o hipotálamo ou centros superiores cerebrais (DOBSON; SMITH, 2000), não havendo porém tal informação científica relativa ao FSH.

6 CONCLUSÕES

A hipótese de que, no momento da divergência folicular, fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) e zebuínas (*Bos indicus*) apresentam menores diâmetros dos folículos dominante e maior subordinado do que fêmeas taurinas (*Bos taurus*) foi aceita. A segunda hipótese de que, assim como em taurinos, há declínio nas concentrações plasmáticas de FSH e elevação transitória nas concentrações de LH próximo ao momento do desvio folicular em fêmeas bubalinas e zebuínas não foi comprovada.

Dentre os objetivos propostos, é possível concluir:

- O momento da divergência folicular, em relação à ovulação, é de 63 horas (2,6 dias) para novilhas bubalinas e de 61 horas (2,5 dias) para novilhas zebuínas. Nesse momento, os diâmetros do folículo dominante e maior subordinado são 7,2mm e 6,4mm para bubalinos, e 6,2mm e 5,8mm para zebuínos, respectivamente.
- Os métodos visual e matemático empregados para avaliar a divergência folicular em novilhas bubalinas e zebuínas apresentam eficiência análoga.
- Não se observaram alterações significativas nas concentrações plasmáticas de FSH ou LH próximo ao período de divergência folicular em novilhas bubalinas e zebuínas.

CAPÍTULO II

Capacidade Ovulatória

1 HIPÓTESE

A hipótese deste experimento é a de que, fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) e zebuínas (*Bos indicus*) ovulam após o tratamento com LH exógeno com diâmetros inferiores àqueles relatados em taurinos (*Bos taurus*).

2 OBJETIVOS

- Determinar o diâmetro folicular a partir do qual é adquirida a capacidade ovulatória em novilhas bubalinas (*Bubalus bubalis*) e zebuínas (*Bos indicus*).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 EXPERIMENTO 1: CAPACIDADE OVULATÓRIA EM NOVILHAS BUBALINAS (*Bubalus bubalis*)

3.1.1 Animais e Local do Experimento

Para a determinação da capacidade ovulatória na espécie bubalina foram realizados dois experimentos.

No primeiro estudo, realizado em julho de 2004, foram utilizadas 38 novilhas bubalinas da raça Mediterrâneo, com idade variando entre 15 e 40 meses e peso entre 344 e 618 kg. O estudo foi conduzido na fazenda Santo Antônio dos Três Rios, de propriedade de Carlos Hermann Martins, localizada em Caraguatatuba, no Vale do Paraíba – SP, onde os animais foram mantidos em piquetes com *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha*, além de capineira de *Napier* e água *ad libitum*.

No segundo experimento, realizado em junho de 2005, foram utilizadas 59 novilhas bubalinas cruzadas Murrah x Mediterrâneo, com idade variando entre 16 e 45 meses e peso entre 359 e 610 kg. Este estudo foi conduzido na fazenda Santa Eliza, de propriedade de Wilma Penteado, localizada em Dourado – SP, onde os animais foram mantidos em piquetes com *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha* e água *ad libitum*.

3.1.2 Protocolo de Sincronização de Ovulação

Os animais de ambos os experimentos foram submetidos ao protocolo “Ovsynch” para sincronização da ovulação, ilustrado nas figuras 1 e 2.

Em dia aleatório do ciclo estral todas as novilhas foram tratadas com 25 µg de Lecirelina IM (Gestran Plus®, Arsa). Sete dias após, foi administrado 0,15 mg de d-Cloprostenol IM (Prolise®, Arsa), e 48 horas depois as fêmeas receberam 25 µg de Lecirelina IM.

3.1.3 Desafio com LH

A partir da ovulação (D0), os animais do primeiro experimento foram acompanhados de acordo com metodologia descrita no item 3.1.4, para divisão em três grupos experimentais de acordo com os diâmetros foliculares: primeiro grupo: 5,0-6,0mm (n=7); segundo grupo: 6,1-7,0mm (n=11) e terceiro grupo: 7,1-8,0mm (n=9). Foram administrados 25 mg de LH IM (Lutropin®, Bioniche) em todos os grupos, a fim de induzir a ovulação (Figura 1), para determinação de capacidade ovulatória.

No segundo experimento os animais foram divididos em três grupos, a saber: primeiro grupo: 7,0-8,4mm (n=10); segundo grupo: 8,5-10,0mm (n=10) e terceiro grupo: >10,0mm (n=10). O procedimento adotado para o desafio com LH foi o mesmo previamente descrito (Figura 2).

3.1.4 Avaliações Ultra-sonográficas

Para avaliar a capacidade ovulatória no primeiro experimento, os exames ultra-sonográficos foram realizados após a administração da segunda dose de GnRH, com intervalos de 12 horas, a fim de verificar o momento da ovulação. A partir de então, acompanhou-se o crescimento folicular, para a distribuição das novilhas em grupos de acordo com o diâmetro do folículo dominante. Todos os grupos foram acompanhados ultra-sonograficamente até 48 horas após a administração do LH, conforme figura 1.

No segundo experimento, os exames ultra-sonográficos foram realizados no momento do segundo GnRH e 48 horas após o tratamento hormonal a fim de identificar os animais que responderam ao protocolo de sincronização da ovulação, com base nos resultados prévios dos outros experimentos conduzidos nesta Dissertação.

A partir deste exame, e tendo-se em vista que o desvio folicular ocorre em torno de 2,5 dias após a ovulação (Capítulo 1), e que os novos diâmetros selecionados para a repetição deste estudo se apresentariam após este fenômeno, optou-se que o primeiro exame pós-ovulação fosse realizado somente no D2, pois desta forma haveria menor interferência no manejo da propriedade, além de reduzir o estresse proporcionado aos animais, sem, entretanto, haver comprometimento nas avaliações. Deste momento em diante, a ultra-sonografia passou a ser realizada com intervalos de 12 horas até a administração do LH. Após o tratamento com LH os folículos continuaram a ser monitorados a cada 12 horas por mais 48 horas, para verificar a resposta ovulatória. A figura 2 resume a metodologia empregada no experimento previamente descrito.

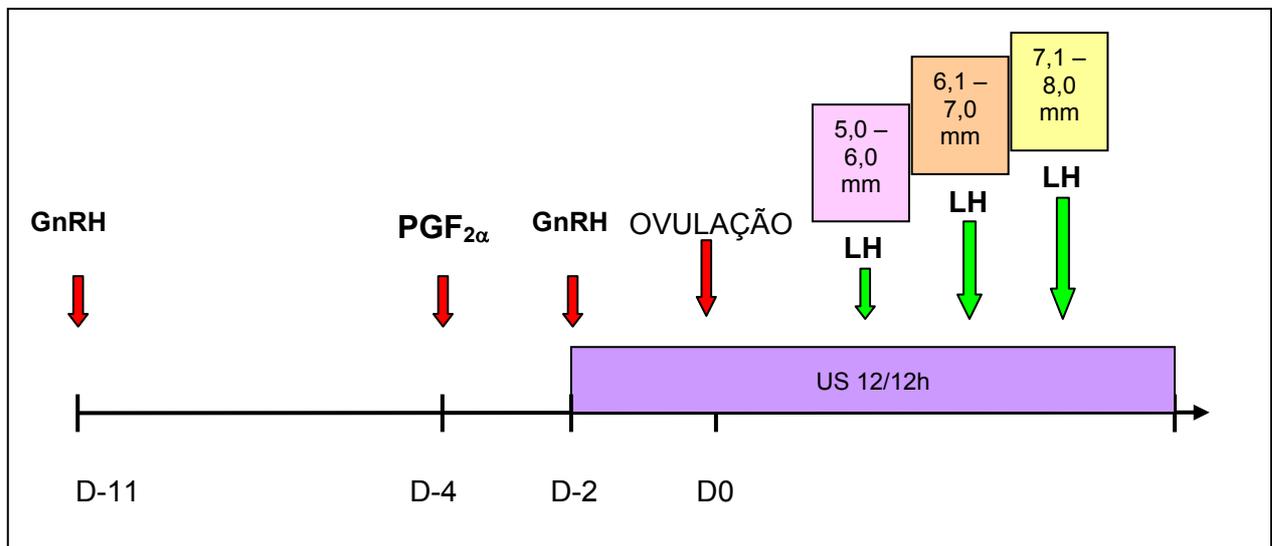


Figura 1 - Diagrama esquemático do protocolo de sincronização da ovulação, dos intervalos de administração de LH conforme o diâmetro folicular e dos exames ultra-sonográficos para determinação da capacidade ovulatória em novilhas bubalinas

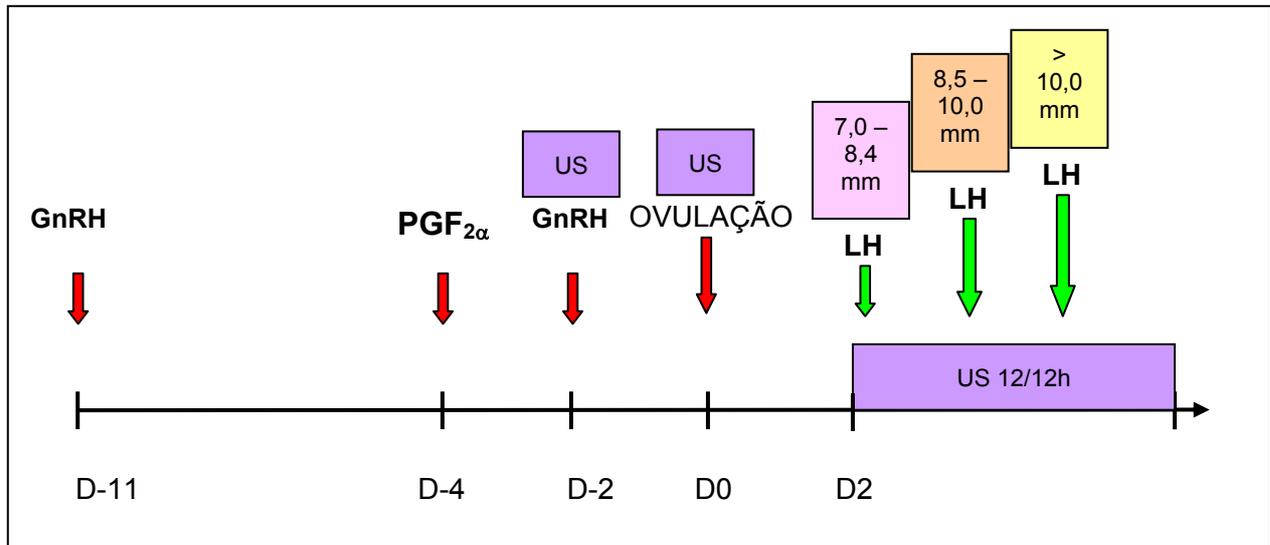


Figura 2 - Diagrama esquemático do protocolo de sincronização da ovulação, dos intervalos de administração de LH conforme o diâmetro folicular e dos exames ultra-sonográficos para determinação da capacidade ovulatória em novilhas bubalinas

3.2 EXPERIMENTO 2: CAPACIDADE OVULATÓRIA EM NOVILHAS ZEBUÍNAS (*Bos indicus*)

3.2.1 Animais e Local do Experimento

Foram utilizadas 34 novilhas (Nelore e cruzadas Nelore x Gir), pertencentes à Agência Paulista de Tecnologia e Agronegócios (APTA) de Pindamonhangaba, localizado no Vale do Paraíba – SP. Os animais, com peso e idade acima de 350kg e 24 meses, respectivamente, foram mantidos a pasto (*Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha*), com suplementação mineral e água *ad libitum*.

3.2.2 Protocolo de Sincronização de Ovulação

O protocolo empregado para sincronizar a ovulação dos animais foi o mesmo adotado no Experimento 2 descrito no Capítulo 1, e está esquematizado na figura 3.

3.2.3 Desafio com LH

Os animais foram agrupados da mesma forma previamente descrita no Experimento 1 do presente Capítulo e estão representados na figura 3.

3.2.4 Avaliações Ultra-sonográficas

Os exames ultra-sonográficos foram realizados com intervalos de 12 horas a partir da retirada do implante até as ovulações, e então a cada 24 horas até que fossem alcançados os diâmetros de 7,0-8,4mm (n=9); 8,5-10,0mm (n=10) e >10,0 mm (n=10). A partir do tratamento com LH, os animais foram novamente monitorados a cada 12h, durante um período de 48h, conforme figura 3.

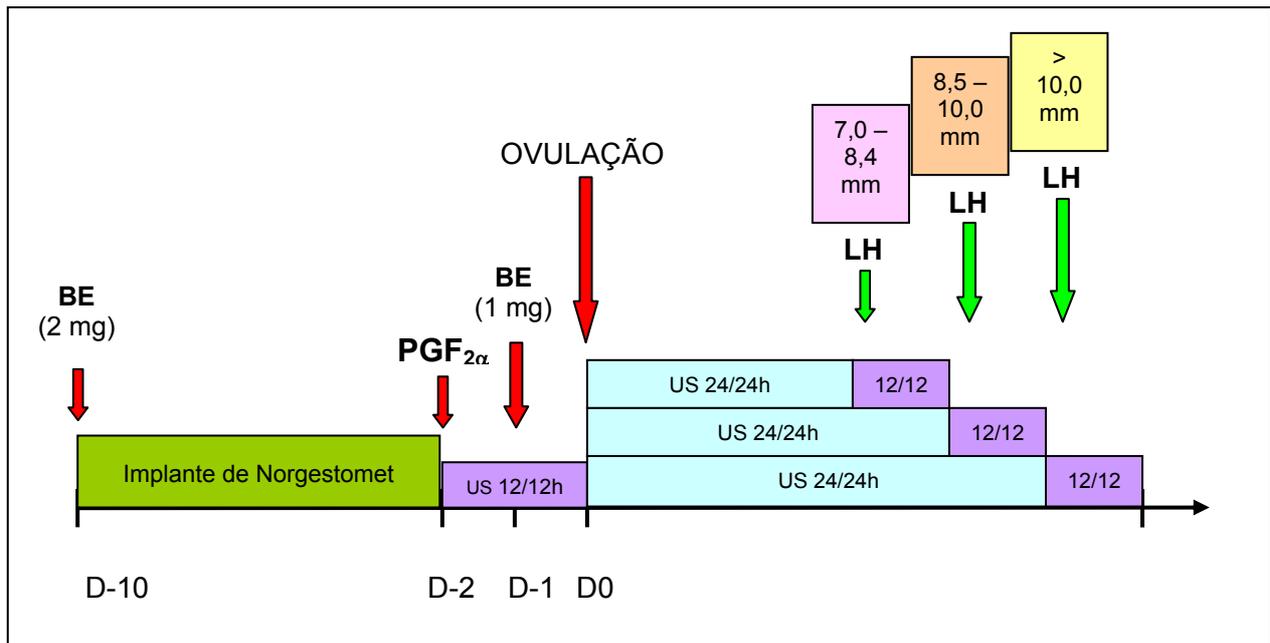


Figura 3 - Diagrama esquemático do protocolo de sincronização da ovulação, dos intervalos de exames ultra-sonográficos e dos momentos de administração de LH conforme o diâmetro folicular para determinação da capacidade ovulatória em novilhas zebuínas

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os dados relativos à resposta ao desafio de LH, as variáveis: diâmetro do folículo dominante no momento da administração de LH; diâmetro máximo do folículo dominante (maior diâmetro alcançado pelo folículo dominante após a administração de LH, independente deste folículo ter respondido ou não ao tratamento); diâmetro máximo do folículo ovulatório (maior diâmetro alcançado pelo folículo dominante após a administração de LH, somente nos animais que ovularam ao tratamento); diâmetro do folículo ovulatório (diâmetro do folículo de animais que responderam ao tratamento, porém no exame imediatamente anterior à ovulação) e intervalo entre o tratamento com LH e a ovulação, foram testadas quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias pelo aplicativo Guided Data Analysis, do programa estatístico SAS for Windows (versão 8.0, 2000). Para a

descrição dos resultados foram empregados a média, como medida de tendência central, e o erro padrão da média, como medida de variabilidade.

A proporção de animais que ovularam foi expressa em porcentagem, e a comparação das taxas de ovulação dos grupos tratados com LH foi realizada pelo teste χ^2 (qui-quadrado).

O nível de significância para rejeitar H0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis para uma determinada resposta. Níveis de significância entre 0,05 a 0,1 foram considerados como tendência estatística.

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1: CAPACIDADE OVULATÓRIA EM NOVILHAS BUBALINAS (*Bubalus bubalis*)

Das 38 novilhas submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação, 71,1% (27/38) responderam após $30,7 \pm 1,5$ horas da aplicação da segunda dose de GnRH. O diâmetro do folículo ovulatório foi de $11,9 \pm 0,3$ mm.

O desafio com LH no primeiro experimento não resultou em ovulações em nenhum dos grupos, como ilustrado nas figuras 4 a 6. Por esta razão, esta fase foi repetida em um segundo experimento, levando em consideração maiores diâmetros foliculares.

O efeito do tratamento com LH nos diferentes grupos sobre a taxa e o momento de ovulação, o diâmetro folicular no momento da administração do LH, o diâmetro máximo do folículo dominante, o diâmetro máximo do folículo ovulatório e o diâmetro do folículo ovulatório estão sumariados na tabela 1.

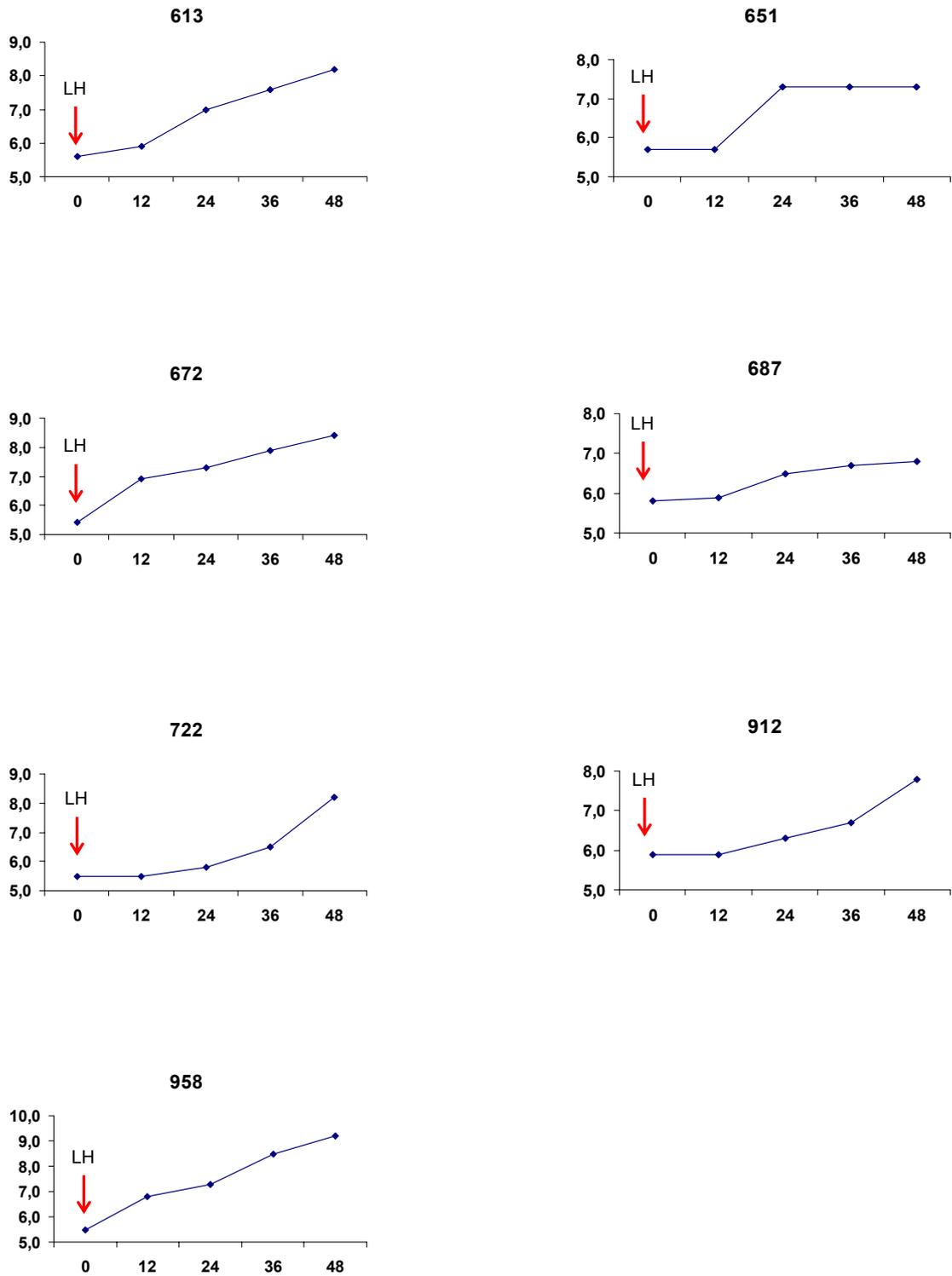


Figura 4 - Dinâmica do folículo dominante de novilhas bubalinas submetidas ao tratamento com LH (0h) no Grupo 5,0-6,0mm (n=7). OBS.: Nenhum animal ovulou neste grupo. Caraguatatuba – SP, 2004

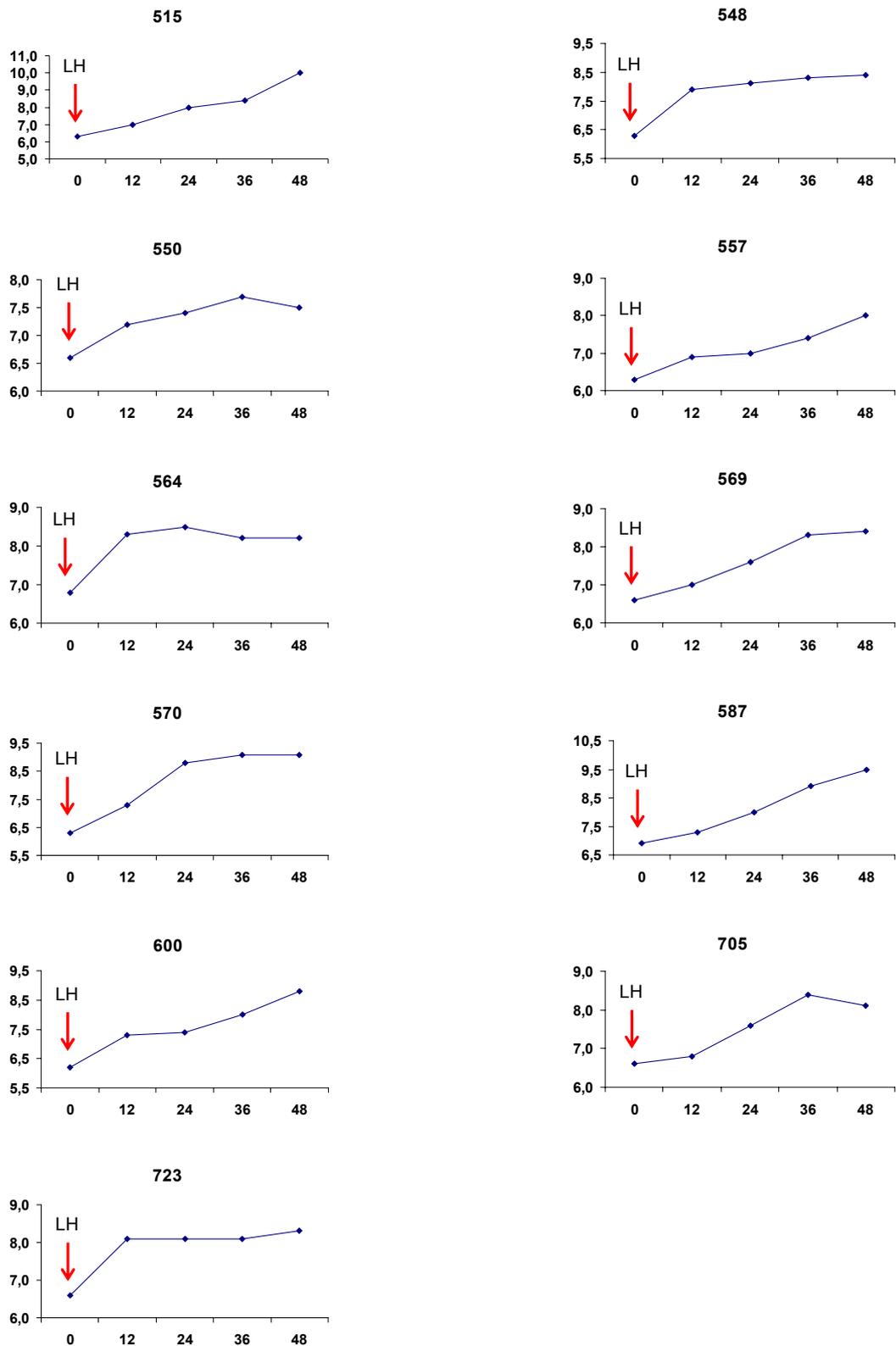


Figura 5 - Dinâmica do folículo dominante de novilhas bubalinas submetidas ao tratamento com LH (0h) no Grupo 6,1-7,0mm (n=11). OBS.: Nenhum animal ovulou neste grupo. Caraguatatuba – SP, 2004

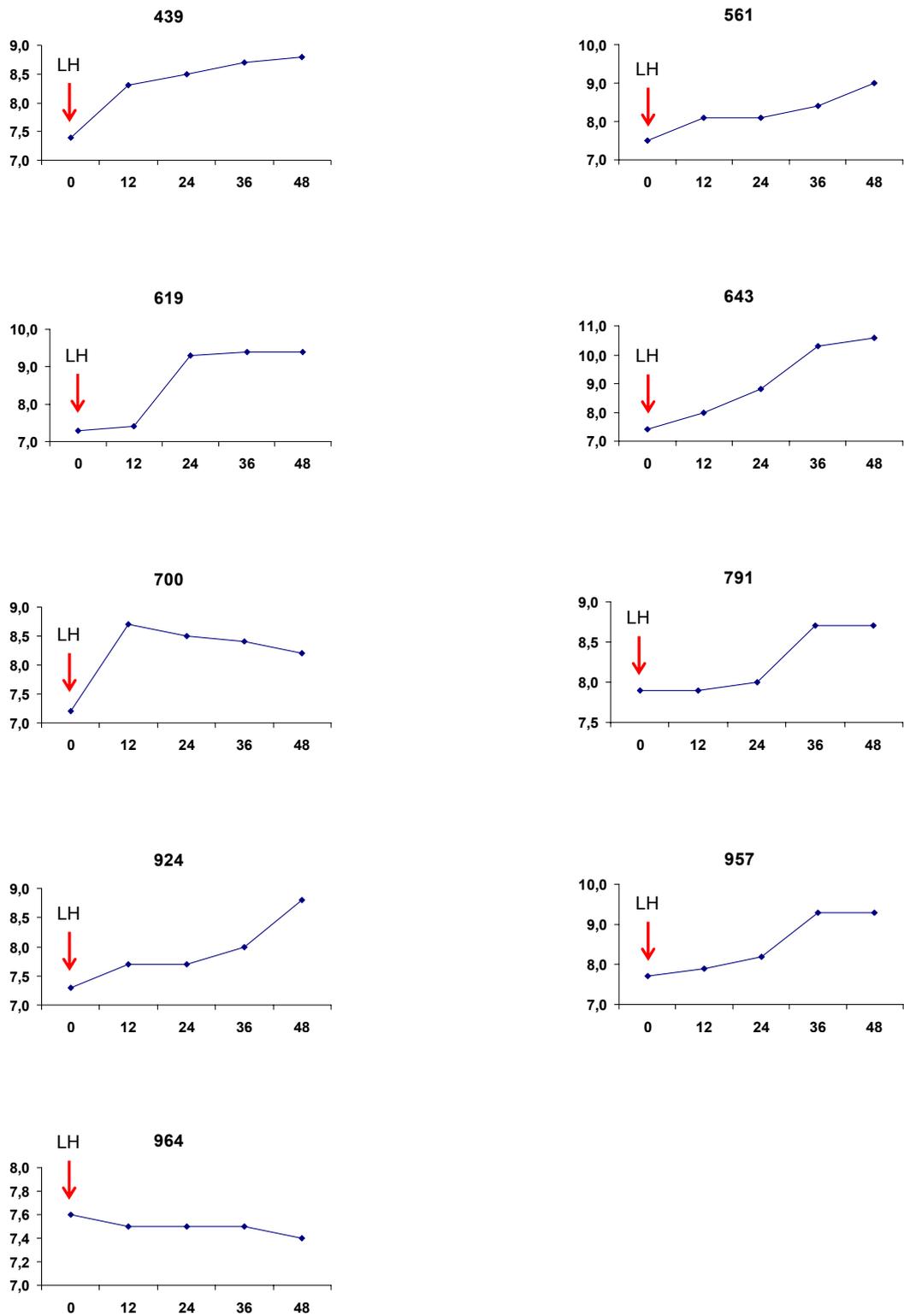


Figura 6 - Dinâmica do folículo dominante de novilhas bubalinas submetidas ao tratamento com LH (0h) no Grupo 7,1-8,0mm (n=9). OBS.: Nenhum animal ovulou neste grupo. Caraguatatuba – SP, 2004

Tabela 1 - Parâmetros foliculares de novilhas bubalinas tratadas com LH conforme o diâmetro folicular (n=27). Caraguatatuba - SP, 2004

GRUPO	5,0-6,0 mm	6,1-7,0 mm	7,1-8,0 mm	Valor de P
Número de animais	7	11	9	-
Diâmetro do folículo dominante no momento da administração de LH (mm)	5,6 ^c ± 0,1	6,5 ^b ± 0,1	7,5 ^a ± 0,1	<0,0001
Taxa de ovulação (%)	0,0 (0/7)	0,0 (0/11)	0,0 (0/9)	-
Intervalo entre o tratamento com LH e a ovulação (h)	-	-	-	-
Diâmetro máximo do folículo dominante (mm)	8,0 ^c ± 0,3	8,7 ^b ± 0,2	9,0 ^a ± 0,3	0,04
Diâmetro máximo do folículo ovulatório (mm)	-	-	-	-
Diâmetro do folículo ovulatório (mm)	-	-	-	-

No segundo experimento, das 59 novilhas tratadas para sincronização da ovulação, 50,85% (30/59) responderam dentro do período de 48 horas após a administração da segunda dose de GnRH. O diâmetro do folículo dominante neste momento foi de $11,5 \pm 0,3$ mm. Um dos animais do grupo >10,0mm foi excluído durante o experimento por apresentar cisto folicular.

Após o desafio com LH os animais apresentaram padrões de desenvolvimento folicular diversos em cada classe de diâmetros. As figuras 7 a 9 sumariam a dinâmica folicular de cada novilha após o tratamento.

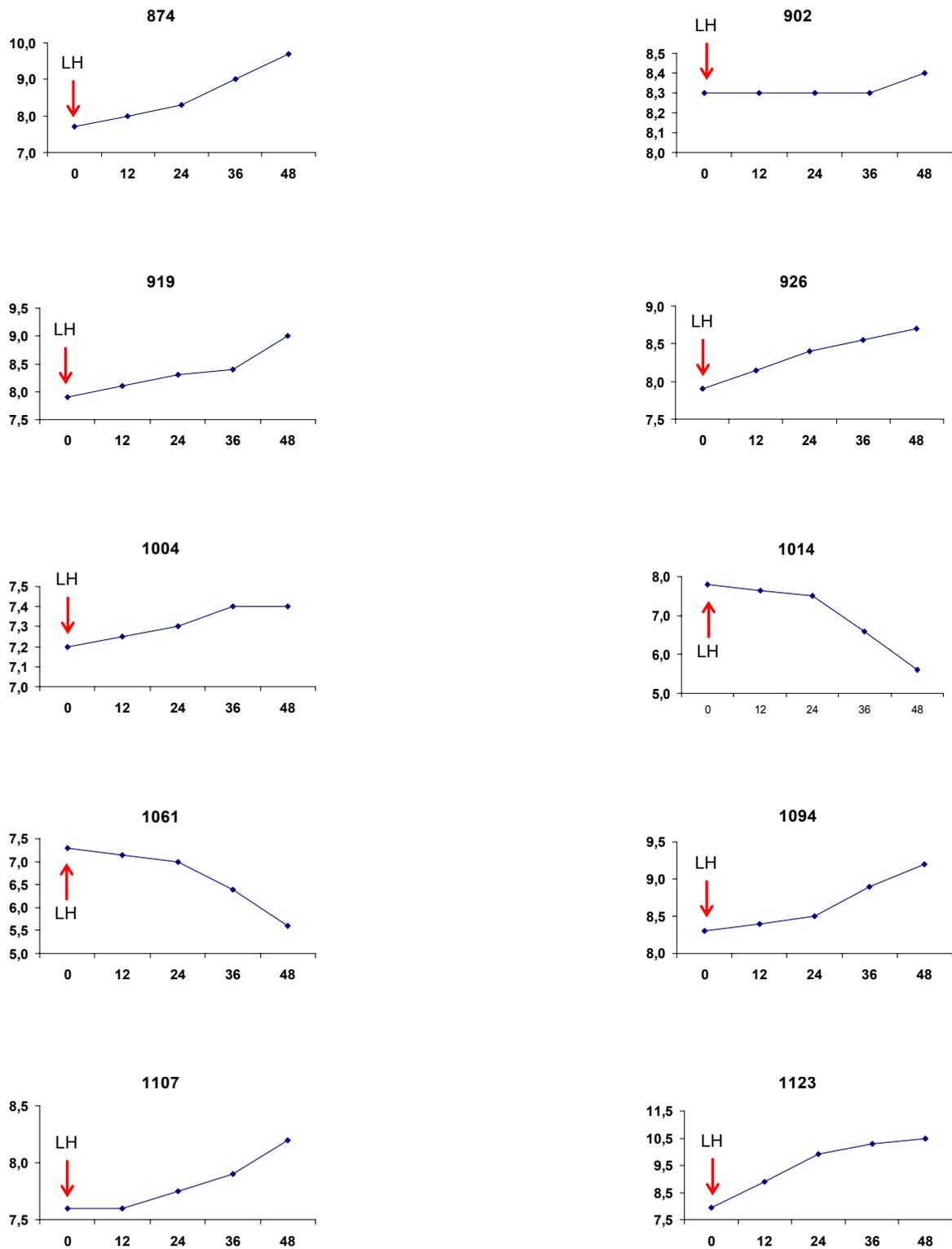


Figura 7 - Dinâmica do folículo dominante de novilhas bubalinas submetidas ao tratamento com LH (0h) no Grupo 7,0-8,4mm (n=10). OBS.: Nenhum animal ovulou neste grupo. Dourado – SP, 2005

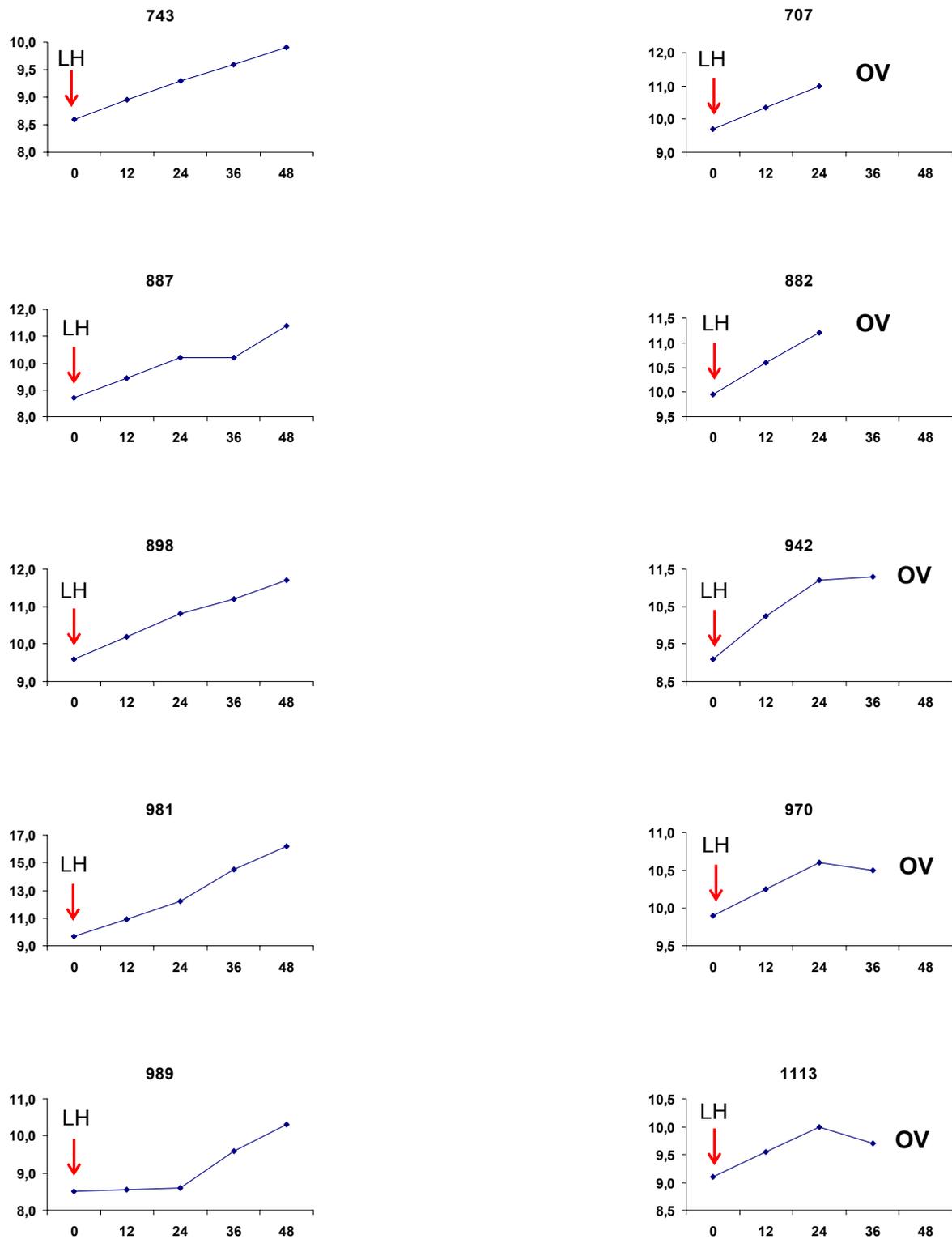


Figura 8 - Dinâmica do folículo dominante de novilhas bubalinas submetidas ao tratamento com LH (0h) no Grupo 8,5-10,0mm (n=10). A coluna da esquerda representa os animais que não ovularam (n=5) ao indutor e a coluna do lado direito mostra aqueles que responderam (n=5) ao desafio com LH (OV). Dourado – SP, 2005

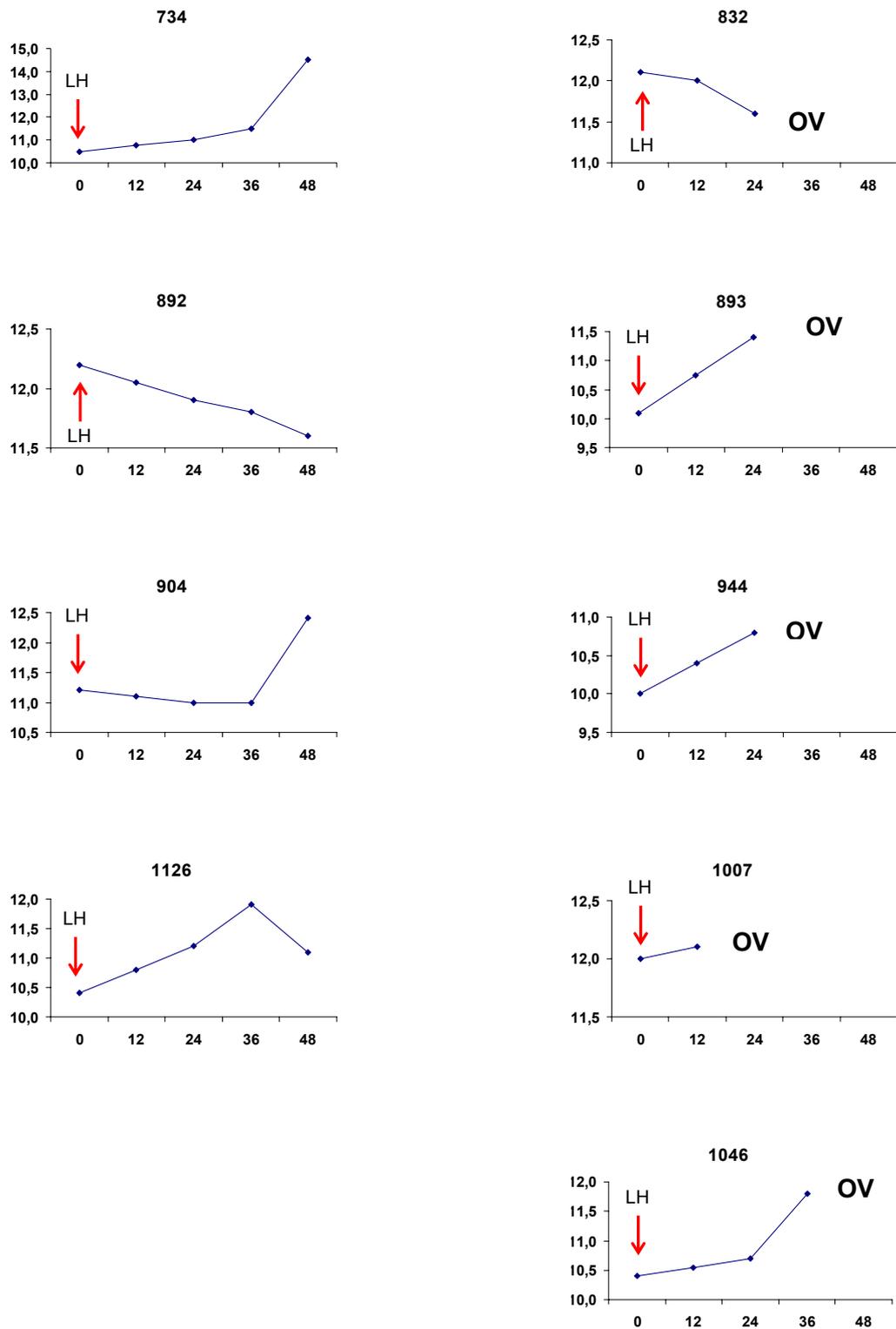


Figura 9 - Dinâmica do folículo dominante de novilhas bubalinas submetidas ao tratamento com LH (0h) no Grupo >10,0mm (n=9). A coluna da esquerda representa os animais que não ovularam (n=4) ao indutor e a coluna do lado direito mostra aqueles que responderam (n=5) ao desafio com LH (OV). Dourado – SP, 2005

O efeito do tratamento com LH nos diferentes grupos sobre a taxa e o momento de ovulação, o diâmetro folicular no momento da administração do LH, o diâmetro máximo do folículo dominante, o diâmetro máximo do folículo ovulatório e o diâmetro do folículo ovulatório estão sumariados na tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros foliculares de novilhas bubalinas tratadas com LH conforme o diâmetro folicular (n=29). Dourado - SP, 2005

GRUPO	7,0-8,4 mm	8,5-10,0 mm	>10,0 mm	Valor de P
Número de animais	10	10	9	-
Diâmetro do folículo dominante no momento da administração de LH (mm)	7,8 ^c ± 0,1	9,3 ^b ± 0,2	11,0 ^a ± 0,3	<0,001
Taxa de ovulação (%)	0,0 ^b (0/10)	50,0 ^a (5/10)	55,6 ^a (5/9)	0,02
Intervalo entre o tratamento com LH e a ovulação (h)	-	37,2 ± 2,9	30,0 ± 3,8	0,17
Diâmetro máximo do folículo dominante (mm)	8,6 ^b ± 0,3	11,4 ^a ± 0,6	12,1 ^a ± 0,3	<0,001
Diâmetro máximo do folículo ovulatório (mm)	-	10,8 ^b ± 0,2	11,6 ^a ± 0,2	0,04
Diâmetro do folículo ovulatório (mm)	-	10,7 ^b ± 0,3	11,5 ^a ± 0,2	0,06

O gráfico 1 ilustra as taxas de ovulação das novilhas bubalinas submetidas ao tratamento com LH de acordo com as classes de diâmetro folicular.

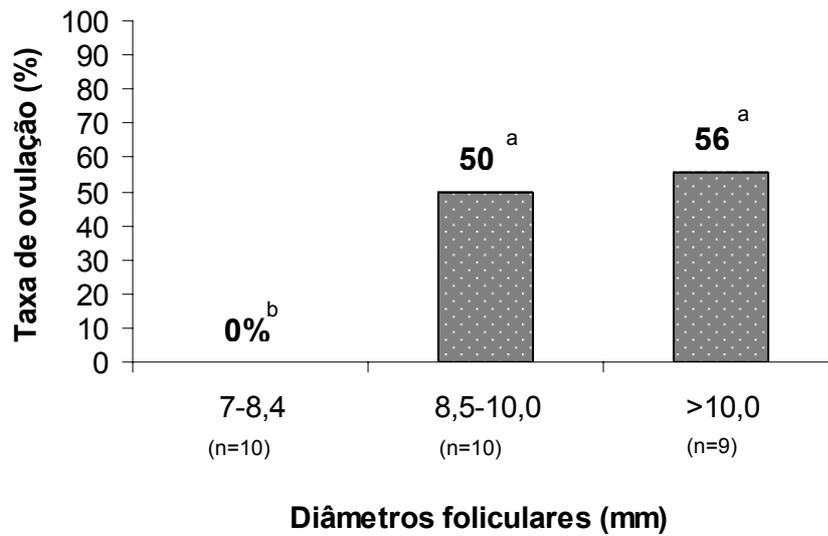


Gráfico 1 - Taxa de ovulação após o tratamento com LH em novilhas bubalinas agrupadas de acordo com a classe de diâmetro folicular (n=29; a≠b - P<0,05). Dourado - SP, 2005

4.2 EXPERIMENTO 2: CAPACIDADE OVULATÓRIA EM NOVILHAS ZEBUÍNAS (*Bos indicus*)

Das 35 novilhas submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação, 29 (82,9%) ovularam um folículo com $12,2 \pm 0,4$ mm de diâmetro, $73,2 \pm 0,8$ h após a retirada do implante auricular.

A dinâmica do folículo dominante de acordo com as classes de diâmetro em que se administrou LH, está ilustrada nas figuras 10 a 12.

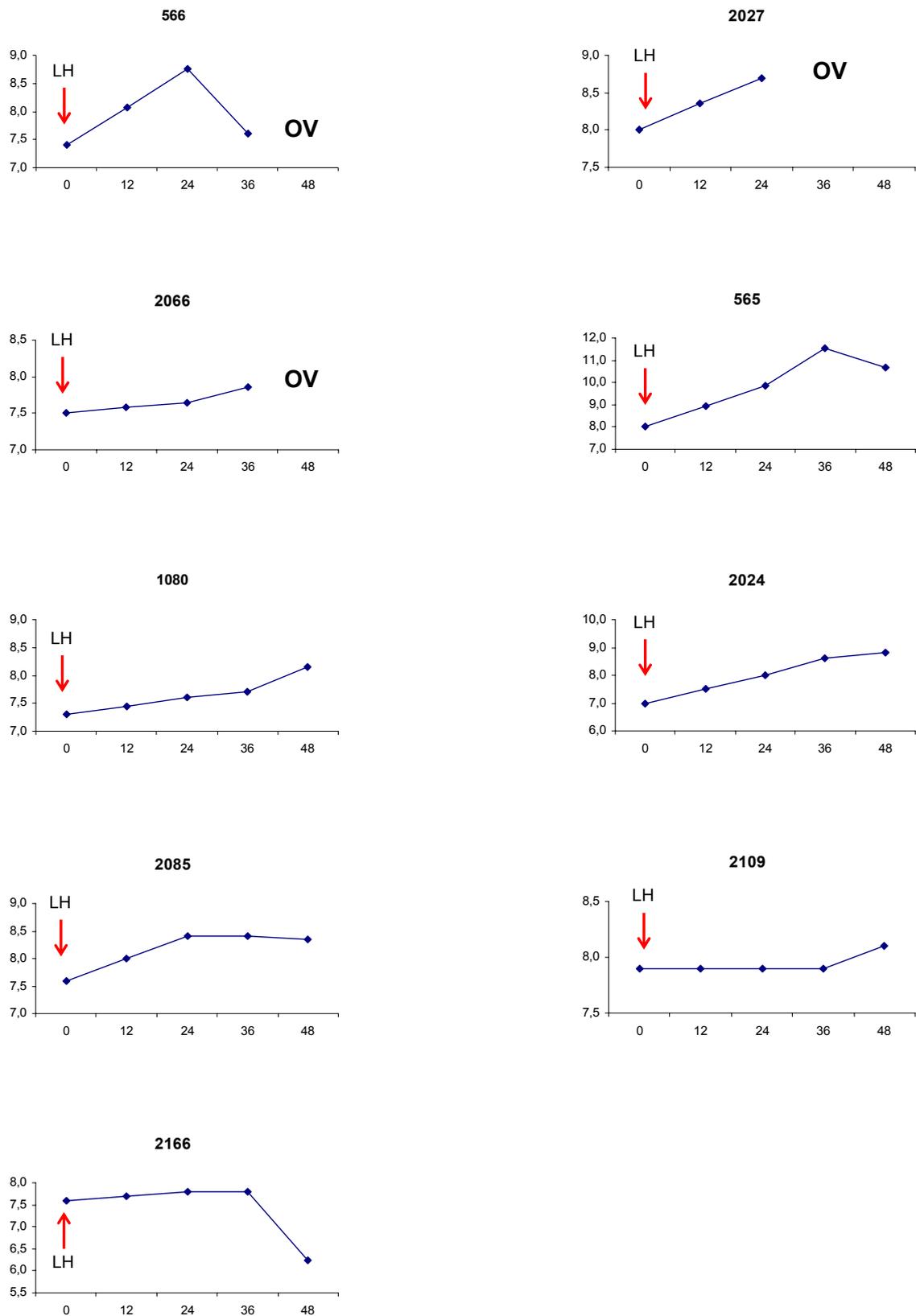


Figura 10 - Dinâmica do folículo dominante de novilhas zebuínas submetidas ao tratamento com LH (0h) no Grupo 7,0-8,4mm (n=9). Os três primeiros animais responderam ao indutor de ovulação (OV). Pindamonhangaba – SP, 2005

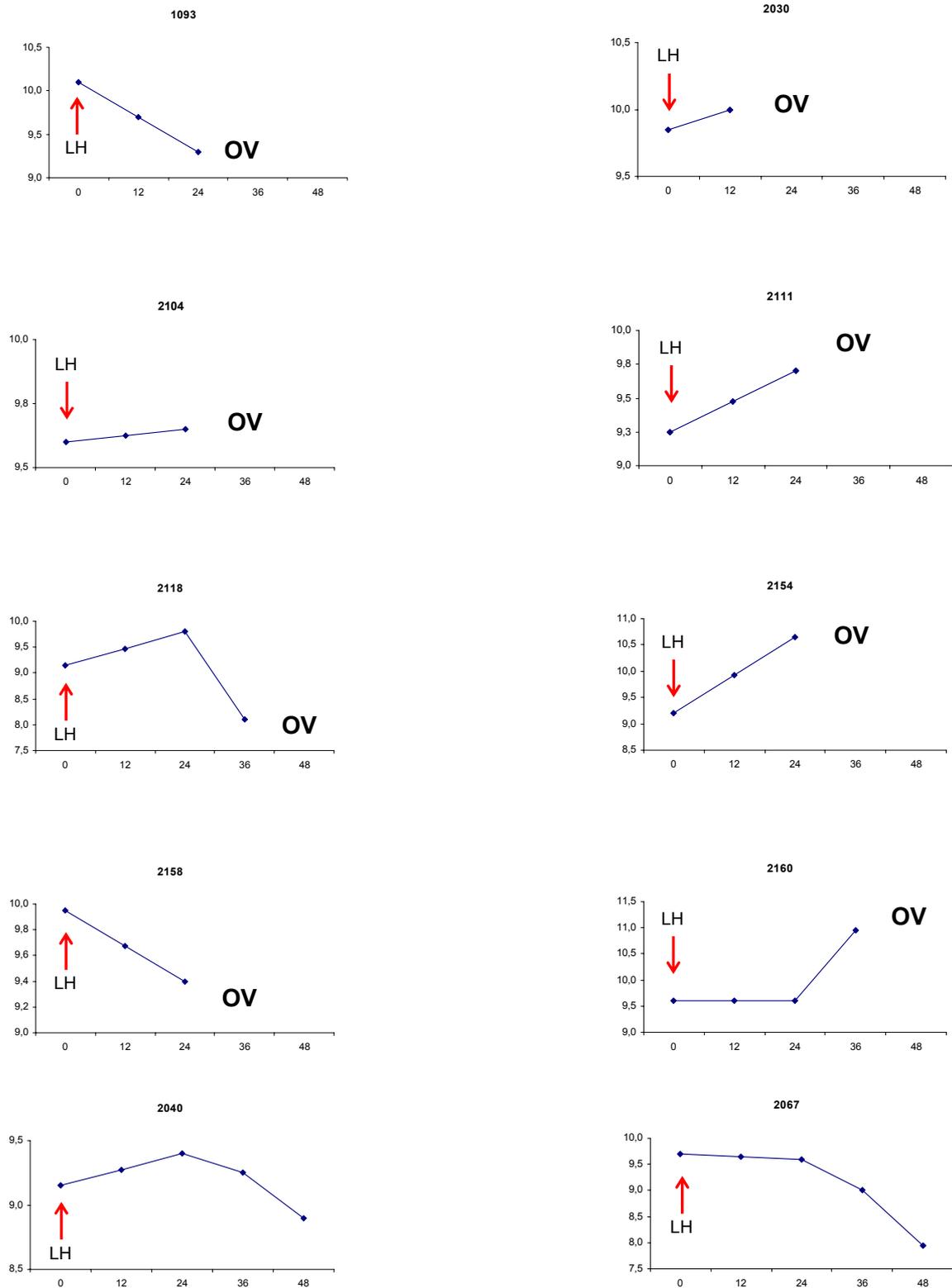


Figura 11 - Dinâmica do folículo dominante de novilhas zebuínas submetidas ao tratamento com LH (0h) no Grupo 8,5-10,0mm (n=10). Os oito primeiros animais responderam ao indutor de ovulação (OV). Pindamonhangaba – SP, 2005

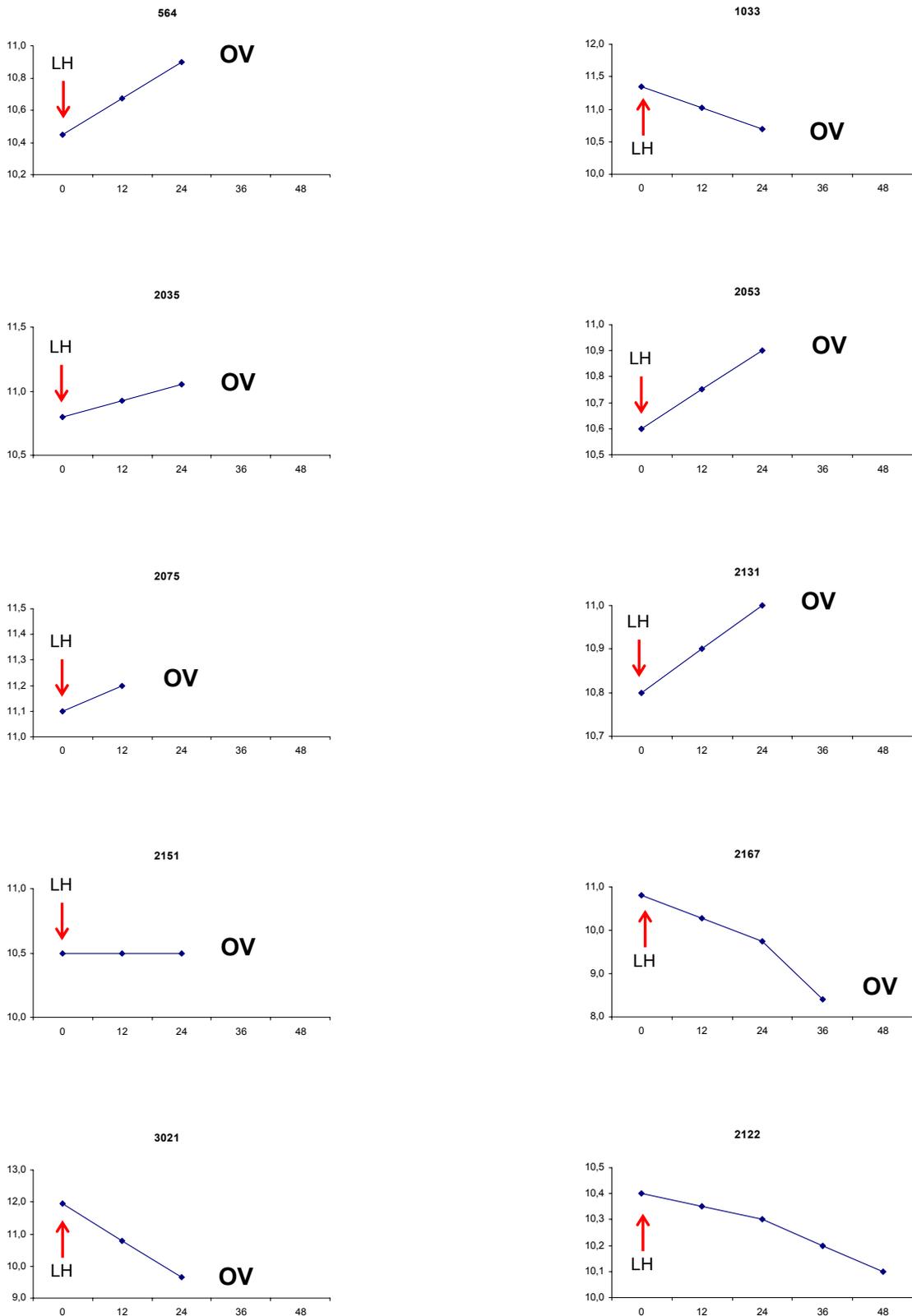


Figura 12 - Dinâmica do folículo dominante de novilhas zebuínas submetidas ao tratamento com LH (0h) no Grupo >10,0mm (n=10). Apenas o último animal não respondeu ao indutor de ovulação. Pindamonhangaba – SP, 2005

O efeito do tratamento com LH nos diferentes grupos sobre a taxa e o momento de ovulação, o diâmetro folicular no momento da administração do LH, o diâmetro máximo do folículo dominante, o diâmetro máximo do folículo ovulatório e o diâmetro do folículo ovulatório estão sumariados na tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros foliculares de novilhas zebuínas tratadas com LH para verificação de capacidade ovulatória (n=29). Pindamonhangaba - SP, 2005

GRUPO	7,0-8,4 mm	8,5-10,0 mm	>10,0 mm	Valor de P
Número de animais	9	10	10	-
Diâmetro do folículo dominante no momento da administração de LH (mm)	7,6 ^c ± 0,1	9,6 ^b ± 0,1	10,9 ^a ± 0,2	<0,001
Taxa de ovulação (%)	33,3% ^b (3/9)	80,0% ^a (8/10)	90,0% ^a (9/10)	0,02
Intervalo entre o tratamento com LH e a ovulação (h)	38,0 ± 4,0	31,5 ± 2,7	30,0 ± 2,0	0,24
Diâmetro máximo do folículo dominante (mm)	8,3 ^c ± 0,1	10,0 ^b ± 0,2	11,0 ^a ± 0,1	<0,001
Diâmetro máximo do folículo ovulatório (mm)	8,5 ^c ± 0,3	10,1 ^b ± 0,2	11,1 ^a ± 0,1	<0,001
Diâmetro do folículo ovulatório (mm)	8,1 ^b ± 0,3	9,7 ^a ± 0,3	10,5 ^a ± 0,3	0,002

O gráfico 2 ilustra as taxas de ovulação em novilhas submetidas ao tratamento com LH de acordo com as classes de diâmetro folicular.

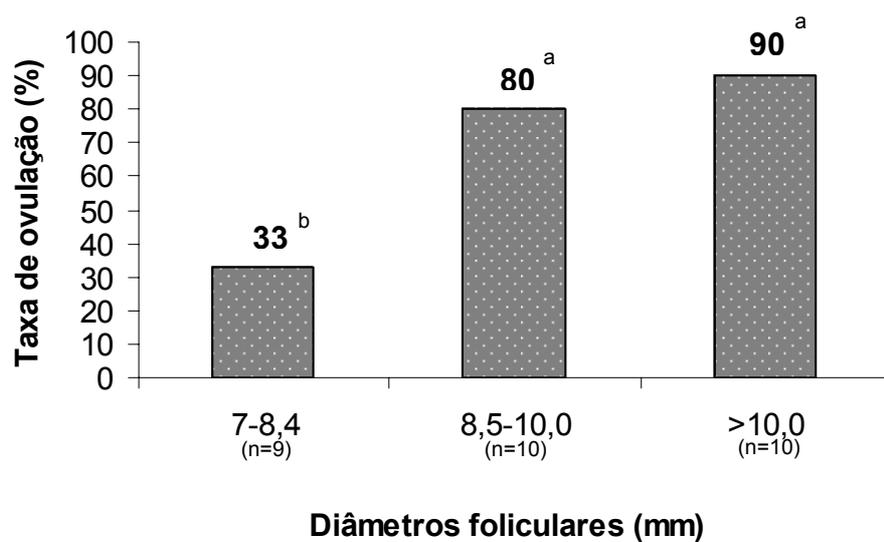


Gráfico 2 - Taxa de ovulação após o tratamento com LH em novilhas zebuínas agrupadas de acordo com a classe de diâmetro folicular (n=29; a≠b - P<0,05). Pindamonhangaba - SP, 2005

5 DISCUSSÃO

O presente capítulo aborda pela primeira vez os aspectos relacionados à capacidade ovulatória em bubalinos (*Bubalus bubalis*) e em zebuínos (*Bos indicus*).

Para tanto, foram administrados 25mg de hormônio luteinizante em diferentes classes de diâmetros foliculares, sendo esta dose a preconizada pelo fabricante para indução de ovulação em protocolos de sincronização.

O LH é um indutor direto de ovulação que se liga aos receptores de LH presentes nas células da granulosa, desencadeando uma série de eventos que culminam na ovulação. O período requerido para que este fármaco exerça sua ação apresenta variações entre os trabalhos realizados em cada espécie. É possível que isto seja atribuído a fatores individuais ou às condições de cada experimento, como explanado abaixo.

Em condições de manifestação natural de estro em bubalinos, foram reportados intervalos LH – ovulação de $25,6 \pm 2,6$ h (PORTO FILHO, 2000); $27,7 \pm 0,5$ h (KANAI; SHIMIZU, 1986) e $35,5$ h (SEREN; PARMIGGIANI⁴, 1997 apud PORTO FILHO, 2000, p. 100), sendo este último relato o mais próximo ao obtido no presente estudo ($37,2 \pm 2,9$ h e $30,0 \pm 3,8$ h). No entanto, este resultado difere daquele descrito por Berber, Madureira e Baruselli (2002), os quais verificaram ovulação $24,4 \pm 7,9$ h após o tratamento com LH empregado no final do protocolo Ovsynch, em substituição à usual dose de GnRH.

Em bovinos, o período LH – ovulação varia de $25,9 \pm 0,6$ h (CAVALIERI et al., 1997) a $29,4 \pm 1,5$ h (SAUMANDE; HUMBLLOT, 2005), em protocolos de sincronização de estro sem indução de ovulação, a $33,6 \pm 4,8$ h (MARTÍNEZ et al., 1999), quando a ovulação foi induzida pela administração de LH em dias pré-determinados do ciclo estral. À exceção do primeiro trabalho, os dados do presente estudo em novilhas *Bos indicus* ($38,0 \pm 4,0$ h; $31,5 \pm 2,7$ h e $30,0 \pm 2,0$ h) estão de acordo com as investigações anteriormente apresentadas em bovinos.

No experimento 1 (*Bubalus bubalis*), a escolha dos diâmetros foi realizada de forma a se detectar o menor tamanho folicular no qual haveria responsividade diante de um indutor de ovulação. Entretanto, os grupos avaliados no primeiro experimento

⁴ SEREN, E.; PARMEGGIANI, A. Oestrous cycle in italian buffalo. *Bubalus bubalis*, n.4, p.21-8, 1997. Suplemento.

(5,0 a 7,0mm) apresentaram diâmetros anteriores ao da divergência folicular (folículo dominante: 7,2mm; Capítulo 1 da presente Dissertação), ocasionando na ausência de ovulações. Este achado corrobora com relatos em fêmeas da raça Holandesa (GINTHER et al., 1996) e da raça Nelore (NOGUEIRA et al., 2005), de que folículos dominantes possuem maior expressão de receptores de LH após a divergência folicular. Isto pôde ser observado no experimento 2 (*Bos indicus*), no qual todos os grupos formados apresentaram diâmetros superiores aos do desvio (CASTILHO, 2003; SARTORELLI, 2003 e Capítulo 1 da presente Dissertação), sendo, portanto, esperado que algumas ovulações tenham ocorrido no grupo 7,0-8,4mm.

Os resultados demonstram que em *Bos indicus* a capacidade ovulatória já é adquirida por folículos maiores do que 7mm, aumentando de maneira significativa a partir de 8,5mm. Este dado é indicativo de que a ovulação em *Bos indicus* ocorre com diâmetro inferior àquele observado em *Bos taurus* (SARTORI et al., 2001). Nessa espécie se verificou que a capacidade ovulatória é obtida por folículos com diâmetro igual ou superior a 10mm. Contudo, em bubalinos ocorreram ovulações somente a partir de 8,5mm e, surpreendentemente, não houve aumento nas taxas de ovulação quando os folículos foram maiores do que 10mm.

Embora não existam relatos a respeito da relação temporal entre diâmetro folicular e aquisição de receptores de LH nas células da granulosa de bubalinos, é possível supor que assim como em novilhas Holandesas, a presença de receptores de LH no momento do desvio pode ser adequada para que o folículo dominante alcance o diâmetro necessário para a seleção, porém insuficiente para torná-lo capaz de ovular (SARTORI et al., 2001). Esta afirmação explica, portanto, o fato de folículos pertencentes ao grupo 7,0 – 8,4mm não terem ovulado após o desafio com LH na espécie bubalina.

Todavia, o mesmo não pode ser dito a respeito da baixa resposta ovulatória observada em folículos superiores a 10mm. Neste caso, existiriam duas possíveis explicações para o ocorrido: fase do folículo dominante no momento do tratamento com LH e baixa afinidade do LH suíno aos receptores presentes nos folículos de bubalinos.

A primeira hipótese está relacionada à administração de LH em folículos que seriam incapazes de responder ao tratamento por já estarem em fase de atresia folicular - como ocorreu claramente na novilha 892 logo após o desafio com LH.

Trabalhos anteriores demonstraram que a resposta do folículo dominante a um indutor de ovulação é dependente do estágio de desenvolvimento ao tratamento (MARTÍNEZ et al., 1999; SILCOX; POWELL; KISER, 1993). Estes autores observaram menores respostas quando a ovulação foi induzida em folículos nas fases estática e de regressão. Isto porque folículos estrógeno-ativos estão associados à elevada proporção estrógeno: progesterona/andrógenos, maiores diâmetros foliculares, maior número de células da granulosa e maior capacidade de ligação do hCG/ LH às células da granulosa e da teca (IRELAND; ROCHE, 1983; STEWART et al., 1996). Assim que o folículo dominante entra em atresia, suas propriedades são alteradas, dentre elas, a redução na expressão de RNAm para receptores de gonadotrofinas (XU et al., 1995), tanto nas células da granulosa quanto da teca (IRELAND; ROCHE, 1983), impedindo que a ovulação seja induzida.

Ainda, conforme citações prévias (BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003; PURSLEY et al., 1997), novilhas bovinas podem apresentar turnover folicular mais rápido do que vacas, devido a diferenças na dinâmica folicular entre essas categorias de animais (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995; PURSLEY et al., 1997).

Nulíparas tendem a apresentar menores diâmetros foliculares por onda de crescimento folicular e no momento da ovulação do que multíparas, e associado a este fator, maior número de ondas foliculares devido ao intenso turnover folicular. Desta maneira, o mesmo dia do ciclo estral pode representar status foliculares completamente diferentes entre estas categorias animais, influenciando na responsividade folicular a um estímulo exógeno de ovulação. Neste caso, a baixa resposta ovulatória encontrada em novilhas bubalinas, especialmente no grupo com folículos maiores que 10mm, pode ser decorrente da administração de indutor de ovulação em folículos que já se apresentavam em atresia folicular.

Embora não existam trabalhos que demonstrem que novilhas bubalinas apresentam maior número de ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral, pressupõe-se que isto seja possível, ocasionando na redução da capacidade ovulatória em animais com três ou mais ondas foliculares. Entretanto, esta concepção permanece controversa mesmo para bovinos, pois se verificou em dois recentes estudos que, sob as mesmas condições, não há diferenças quanto à dinâmica folicular de novilhas e vacas *Bos taurus* (SARTORI et al., 2004; WOLFENSON et al., 2004), havendo a necessidade de maior investigação sobre o turnover folicular em novilhas.

A segunda interpretação pode advir de baixa afinidade estrutural entre o LH suíno e o bubalino. O receptor de LH, assim como outros receptores acoplados à proteína G, possui um domínio extracelular, que é o segmento N-terminal, sete hélices hidrofóbicas que constituem o domínio transmembrana, e um segmento C-terminal sobre a face citosólica da membrana citoplasmática (LODISH et al., 2002; LOU; GAGEL, 2001; ROBERT et al., 2003).

Durante o processo de transcrição, múltiplos RNAm podem ser formados a partir de uma molécula precursora. Este fenômeno é denominado *splicing* alternativo, e consiste na inclusão ou exclusão de um ou mais éxons na estrutura final do RNAm, além da remoção de íntrons (revisado em LODISH et al., 2002; LOU; GAGEL, 2001). Os transcritos formados são conhecidos como isoformas, e isto implica em funções diversas da original, que ainda permanecem desconhecidas, podendo inclusive gerar proteínas inativas (revisado em LOU; GAGEL, 2001; ROBERT et al., 2003). Ainda que seja difícil comparar estudos que não empregam a mesma técnica, é fato que existem várias isoformas de LH suíno (NOMURA et al., 1989), bovino (KOJIMA et al., 1995; PERERA-MARÍN et al., 2005; ROBERT et al., 2003; ZALESKY; GROTTJAN, 1991) e bubalino (MURALIDHAR; RAJENDRAKUMAR; SHARMA, 1992; SAIRAM; ZAKY; HASSAN, 1994), e é possível que estas diferenças afetem a afinidade hormônio-receptor.

As elevadas taxas de ovulação obtidas em novilhas *Bos indicus* no presente estudo comprovam os achados de Maghuin-Rogister, Closset e Hennen (1971), que encontraram grande homologia da porção carboxi-terminal entre as subunidades α do LH suíno e bovino, embora nesta última espécie haja maior heterogeneidade estrutural. Contrariamente aos bovinos, não foram encontrados trabalhos comparativos entre a estrutura do LH bubalino com qualquer outra espécie zootécnica, porém é provável que existam diferenças estruturais, incluindo isoformas alternativas, que reduzam a capacidade de ligação ou transdução de sinal entre o hormônio e o receptor, neste caso, heterólogos.

Recentemente, os dados do presente experimento foram confirmados em estudos sobre sincronização da ovulação em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo para doadoras *Bos indicus* (Nelore; BARUSELLI et al., 2005), *Bos taurus* (Holandês; BARUSELLI et al., 2005; MARTINS et al., 2005; RODRIGUES et al., 2005) e *Bubalus bubalis* (BARUSELLI; CARVALHO, 2002; CARVALHO et al., 2002).

Nos trabalhos de Martins et al. (2005) e Rodrigues et al. (2005), as doadoras foram tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona em dia aleatório do ciclo estral (D0) associado a 2,5mg de benzoato de estradiol e 50 mg de progesterona injetável. A partir do D4, administraram-se 100mg de FSH em 8 doses decrescentes a cada 12 horas. Na manhã do dia 6 os animais receberam uma dose de PGF2 α , e na tarde do dia 7 os dispositivos de progesterona foram removidos. As fêmeas foram divididas para receber 25mg de LH, 12 ou 24 horas após a última aplicação de FSH, sendo submetidas a duas inseminações artificiais que ocorreram 12 e 24 horas após o LH.

Em doadoras Nelore, o atraso de 12 para 24 horas no indutor de ovulação ocasionou no aumento do número de embriões degenerados e na redução do número de estruturas transferíveis e congeláveis (BARUSELLI et al., 2005). Inversamente em Holandês, a administração do indutor de ovulação 24 horas após o último FSH resultou em aumento na resposta ovulatória e maior número de embriões transferíveis (BARUSELLI et al., 2005; MARTINS et al., 2005; RODRIGUES et al., 2005). Com base nestes resultados é possível verificar que em *Bos indicus* a indução de ovulação em protocolos de superestimulação pôde ser obtida precocemente, ao passo que em *Bos taurus* foi necessário retardar o tratamento para melhorar a resposta ovulatória. O atraso de 12 horas empregado em *Bos taurus*, permitiu que tempo adicional fosse disponibilizado aos folículos para que estes atingissem diâmetros condizentes com a capacidade ovulatória.

Fêmeas bubalinas apresentaram o mesmo comportamento que fêmeas taurinas quanto ao momento apropriado para a indução de ovulação em protocolos de superestimulação. De maneira semelhante, a administração de LH 24 horas após a última dose de FSH proporcionou melhores resultados quanto à taxa de ovulação e de recuperação de embriões (CARVALHO et al., 2002), quando comparada a 12 horas. Este achado comprova que, devido aos maiores diâmetros alcançados no momento da divergência folicular, diâmetros superiores são requeridos para que os folículos de bubalinos sejam responsivos à ovulação, a exemplo do que ocorre em *Bos taurus*.

Devido a tais diferenças fisiológicas, pode-se inferir que manejos reprodutivos distintos sejam aplicados entre estes dois grupos genéticos de bovinos, e também em bubalinos, especialmente quanto à indução de ovulação (em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo ou de superovulação).

6 CONCLUSÕES

A hipótese de que fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) e zebuínas (*Bos indicus*) ovulam após o tratamento com LH exógeno com diâmetros inferiores àqueles relatados em taurinos (*Bos taurus*) foi aceita.

Dentre os objetivos propostos, é possível concluir:

- Em novilhas bubalinas a aquisição de capacidade ovulatória ocorre a partir de 8,5mm de diâmetro, contudo não há aumento nas taxas de ovulação quando diâmetros superiores são alcançados.
- Em novilhas zebuínas a aquisição de capacidade ovulatória ocorre a partir de 7,0mm e aumenta após os folículos atingirem diâmetro entre 8,5 e 10 mm, e acima de 10mm.

REFERÊNCIAS

ALI, A.; ABDEL-RAZEK, A. K.; ABDEL-GHAFFAR, S.; GLATZEL, P. S. Ovarian follicular dynamics in buffalo cows (*Bubalus bubalis*). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, p. 214-218, 2003.

ARMSTRONG, D. G.; BAXTER, G.; GUTIERREZ, C. G.; HOGG, C. O.; GLAZYRIN, A. L.; CAMPBELL, B. K.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. Insulin-like growth factor binding protein -2 and -4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: effect of gonadotropins and developmental status. **Endocrinology**, v. 139, p. 2146-2154, 1998.

AVENELL, J. A.; SAEPUDIN, Y.; FLETCHER, I. C. Concentrations of LH, oestradiol-17 beta and progesterone in the peripheral plasma of swamp buffalo cows (*Bubalus bubalis*) around the time of oestrus. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 74, p. 419-424, 1985.

BAO, B.; GARVERICK, A.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; SALFEN, B. E.; YOUNGQUIST, R. S. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 1158-1168, 1997.

BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T. Embryo transfer (ET) and in vitro fertilization (IVF) in southern Brazil. In: BUFALO SYMPOSIUM OF AMÉRICAS, 1., 2002, Pará. **Proceedings...**, 2002. 1 CD-ROM.

BARUSELLI, P. S.; MUCCIOLO, R. G.; VISINTIN, J. A.; VIANA, W. G.; ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H.; OLIVEIRAS, C. A.; MOLERO-FILHO, J.R. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 47, p. 1531-1547, 1997.

BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; REIS, E. L.; NASSER, L. F.; BÓ, G. Novos avanços nos tratamentos de superovulação em doadoras de embriões bovino. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 6., 2005, Córdoba. **Proceedings...** 2005, 1 CD-ROM.

BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; KOT, K.; GINTHER, O. J. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 120-126, 2002.

BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; KOT, K.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 432-441, 2001.

BERBER, R. C. A. **Sincronização da ovulação com GnRH e benzoato de estradiol para inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos (*Bubalus bubalis*)**. 2003. 83 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

BERBER, R. C. A.; MADUREIRA, E. H.; BARUSELLI, P. S. Comparison of two Ovsynch protocols (GnRH versus LH) for fixed timed insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 57, p. 1421-1430, 2002.

BERGFELT, D. R.; SEGO, L. H.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Calculated follicle deviation using segmented regression for modeling diameter differences in cattle. **Theriogenology**, v. 59, p. 1811-1825, 2003.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTINEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 307–326, 2003.

BODENSTEINER, K. J.; KOT, K.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v. 45, p. 1115-1128, 1996.

BOLT, D. J.; SCOTT, V.; KIRACOFÉ, G. H. Plasma LH and FSH after estradiol norgestomet and GnRH treatment in ovariectomized beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 23, p. 263-271, 1990.

BURATINI JR, J. ; PRICE, C. A. ; VISINTIN, J. A.; BO, G. A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (bst) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, v. 54, p. 421-431, 2000.

CAMPBELL, B. K.; SCARAMUZZI, R. J.; WEBB, R. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, p. 335-350, 1995. Suplemento.

CARDOSO, C. Brasil será a quarta economia, diz consultoria. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 04 mar. 2006. Seção Dinheiro (Além da Imaginação). Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/fsp/dinheiro/fi04032006.07.htm>>. Acesso em: 18 maio 2006

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

CARVALHO, N. A. T.; BARUSELLI, P. S.; ZICARELLI, L.; MADUREIRA, E. H.; VISINTIN, J. A.; D'OCCHIO, M. J. Control of ovulation with GnRH agonist subsequent to superovulation of follicular growth in buffalo: fertilization and embryo recovery. **Theriogenology**, v. 58, p. 1641-1650, 2002.

CASTILHO, C. **Divergência no crescimento folicular e sua influência sobre a competência oocitária para o desenvolvimento embrionário *in vitro* em novilhas da raça Nelore**. Jaboticabal, 2003. 90 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

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

CHASE JR, 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.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. Brasília: CNA; 2005. Disponível em: <<http://www.cna.org.br>>. Acesso em: 21 nov. 2005.

CONOVER, C. A.; FAESSEN, G. F.; ILG, K. E.; ALADIN CHANDRASEKHER, Y.; CHRISTIANSEN, M.; OVERGAARD, M. T.; OXVIG, C.; GIUDICE, L. C. Pregnancy-associated plasma protein-A is the insulin-like growth factor binding protein-4 protease secreted by human ovarian granulosa cells and is a marker of dominant follicle selection and corpus luteum. **Endocrinology**, v. 142, p. 2155-2158, 2001.

CROWE, M. A.; KELLY, P.; DRIANCOURT, M. A.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Effects of follicle-stimulating hormone with and without luteinizing hormone on serum hormone concentrations, follicle growth, and intrafollicular estradiol and aromatase activity in gonadotropin-releasing hormone-immunized heifers. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 368-374, 2001.

DE LA SOTA, R. L.; SIMMEN, F. A.; DIAZ, T.; THATCHER, W. W. Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 803-812, 1996.

DOBSON, H.; SMITH, R. F. What is stress, and how does it affect reproduction? **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 743-752, 2000.

DONALDSON, L. E.; HANSEL, W. Cystic corpora lutea and normal and cystic graafian follicles in the cow. **Australian Veterinary Journal**, v. 44, p. 304-308, 1968.

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

EVANS, A. C. O.; 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, p. 2963-2971, 1997.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2005. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat/collection>>. Acesso em: 20 mar. 2006.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLE, J. M. P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 1489-1505, 1997.

FINDLAY, J. K. Peripheral and local regulators of folliculogenesis. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 6, p. 127-139, 1994.

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, p. 648-654, 2001.

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, 2004.

GIBBONS, J. R.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1066-1073, 1997.

GILCHRIST, R. L.; RYU, KI-SUNG; JI, INHAE; JI, TAE H. The luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor has distinct transmembrane conductors for camp and inositol phosphate signals. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 19283-19287, 1996.

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 431-446, 2004.

GINTHER, O. J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 61-79, 2000.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; KOT, K. Activin A, estradiol, and free insulin-like growth factor I in follicular fluid preceding the experimental

assumption of follicle dominance in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 14-19, 2002a.

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, p. 239-257, 2003a.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; KOT, K.; MEIRA, C.; BERGFELT, D. R. Associated and independent comparisons between the two largest follicles preceding follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 524-529, 2003b.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; KOT, K. Effect of LH on circulating oestradiol and follicular fluid factor concentrations during follicle deviation in cattle. **Reproduction**, v. 122, p. 103-110, 2001b.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; KOT, K. Follicle selection in cattle: relationships among growth rate, diameter ranking, and capacity for dominance. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 345-350, 2001c.

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

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; KOT, K. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. **Reproduction**, v. 124, p. 475-482, 2002b.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; MEIRA, C.; KOT, K. In vivo effects of an intrafollicular injection of insulin-like growth factor 1 on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 99-105, 2004.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Pulsatility of systemic FSH and LH concentrations during follicular wave development in cattle. **Theriogenology**, v. 50, p. 507-519, 1998.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, v. 52, p. 1079-1093, 1999.

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

GINTHER, O. J.; KOT, K.; KULICK, L. J.; WILTBANK, M. C. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v. 48, p. 75-87, 1997.

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.

GONG, JIN G.; BRAMLEY, T. A.; WILMUT, I.; WEBB, R. Effect of recombinant bovine somatotropin on the superovulatory response to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 1141-1149, 1993.

GOOD, T. E. M.; WEBER, P. S. D.; IRELAND, J. L. H.; PULASKI, J.; PADMANABHAN, V.; SCHNEYER, A. L.; LAMBERT-MESSERLIAN, G.; GHOSH, B. R.; MILLER, W. L.; GROOME, N.; IRELAND, J. J. Isolation of nine different biologically and immunologically active molecular variants of bovine follicular inhibin. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 1478-1488, 1995.

IRELAND, J. L. H.; GOOD, T. E. M.; KNIGHT, P. G.; IRELAND, J. J. Alterations in amounts of different forms of inhibin during follicular atresia. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 1265-1276, 1994.

IRELAND, J. J.; ROCHE, J. F. Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. **Endocrinology**, v. 112, p. 150-156, 1983.

KANAI, Y.; SHIMIZU, H. Changes in plasma concentrations of luteinizing hormone, progesterone and oestradiol-17 β during the periovulatory period in cyclic swamp buffaloes. **Animal Reproduction Science**, v. 11, p. 17-24, 1986.

KNIGHT, P. G. Roles of inhibins, activins, and follistatin in the female reproductive system. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 17, p. 476-509, 1996.

KNOPF, L.; KASTELIC, J. P.; SCHALLENBERGER, E.; GINTHER, O. J. Ovarian follicular dynamics in heifers: test two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 6, p. 111-119, 1989.

KOJIMA, F. N.; CUPP, A. S.; STUMPF, T. T.; ZALESKY, D. D.; ROBERSON, M. S.; WERTH, L. A.; WOLFE, M. W.; KITTOK, R. J.; GROTTJAN, H. E.; KINDER, J. E. Effects of 17 β -estradiol on distribution of pituitary isoforms of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during the follicular phase of the bovine estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 297-304, 1995.

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.

LE MAIRE, W. J. Mechanism of mammalian ovulation. **Steroids**, v. 54, p. 455-69, 1989.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUIDARA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. Sinalização intracelular: Hormônios e receptores. In: _____. **Biologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Revinter, 2002. p. 848-909.

LOU, H.; GAGEL, R. F. Alternative ribonucleic acid processing in endocrine systems. **Endocrine Reviews**, v. 22, p. 205-225, 2001.

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, p. 3615-3626, 1992.

MAGHUIN-ROGISTER, G.; CLOSSET, J.; HENNEN, G. The carboxy-terminal primary structure of the α subunit from bovine and porcine luteinizing hormone. **Febs Letters**, v. 13, p. 301-305, 1971.

MANIK, R. S.; MADAN, M. L.; SINGLA, S. K. Ovarian follicular dynamics in water buffaloes (*Bubalus bubalis*): ultrasonically monitoring individual follicles for wave hypothesis. **Theriogenology**, v. 41, p. 246, 1994. Abstract.

MARION, G. B.; GIER, H. T. Ovarian and uterine embryogenesis and morphology of the non-pregnant female mammal. **Journal of Animal Science**, v. 32, p. 24-47, 1971. Suplemento 1.

MARTINEZ, M. F.; ADAMS, G. P.; BERGFELT, D. R.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 57, p. 23-33, 1999.

MARTINS, C. M.; CASTRICINI, E. S. C.; REIS, E. L.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; BARUSELLI, P. S. Produção embrionária de vacas Holandesas a diferentes protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 227, 2005. Suplemento 1. (Resumo. Reunião Anual da Sociedade de Tecnologia de Embriões, 19., 2005, Angra dos Reis).

MIHM, M.; AUSTIN, E. J. The final stages of dominant follicle selection in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 155-166, 2002.

MONGET, P.; MONNIAUX, D.; PISSELET, C.; DURAND, P. Changes in insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II, and their binding proteins during growth and atresia of ovine ovarian follicles. **Endocrinology**, v. 132, p. 1438-1446, 1993.

MONNIAUX, D.; MONGET, P.; BESNARD, N.; HUET, C.; PISSELET, C. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. **Theriogenology**, v. 47, p. 3-12, 1997.

MURALIDHAR, K.; RAJENDRAKUMAR, T.; SHARMA, H. P. Heterogeneity in buffalo lutropin. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 29, p. 168-172, 1992.

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.

NOGUEIRA, G. P. **Puberdade em novilhas Nelore**. 2003. 89 p. Tese (Livro-Docência) – Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2003.

NOGUEIRA, M. F. G.; PINTO, M. G. L.; RAINHO, C. A.; AVELLAR, M. C. W.; PRICE, C. A.; BURATINI JR., J.; BARROS, C. M. Expressão das isoformas do gene codificador do receptor de LH em células da teca e da granulosa de folículos antrais bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 337, 2005. Suplemento 1. (Resumo. Reunião Anual da Sociedade de Tecnologia de Embriões, 19., 2005, Angra dos Reis).

NOMURA, K.; OHMURA, K.; NAKAMURA, Y.; HORIBA, N.; SHIRAKURA, Y.; SATO, Y.; UJIHARA, M.; OHKI, K.; SHIZUME, K. Porcine luteinizing hormone isoform(s): relationship between their molecular structures, and renotropic versus gonadotropic activities. **Endocrinology**, v. 124, p. 712-719, 1989.

NOSEIR, W. M. B. Ovarian follicular activity and hormonal profile during estrous cycle in cows: the development of 2 versus 3 waves. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 50-55, 2003.

PADMANABHAN, V.; CONVEY, E. M.; ROCHE, J. F.; IRELAND, J. J. Changes in inhibin-like bioactivity in ovulatory and atretic follicles and utero-ovarian venous blood after prostaglandin-induced luteolysis in heifers. **Endocrinology**, v. 115, p. 1332-1340, 1984.

PARKER, K. I.; ROBERTSON, D. M.; GROOME, N. P.; MACMILLAN, K. L. Plasma concentrations of inhibin a and follicle-stimulating hormone differ between cows with two or three waves of ovarian follicular development in a single estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 822-828, 2003.

PARR, E. L. Rupture of ovarian follicles at ovulation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 22, p. 1-22, 1975. Suplemento.

PERERA-MARÍN, G.; MURCIA, C.; ROJAS, S.; HERNÁNDEZ-CERÓN, J.; GONZÁLEZ-PADILLA, E. Pattern of circulating luteinizing hormone isoforms during the estrous and luteal phases in Holstein heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 86, p. 53-69, 2005.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonography of the bovine ovary. **Theriogenology**, v. 21, p. 495-504, 1984.

PORTO FILHO, R. M. **Emprego da radiotelemetria na detecção de estro em fêmeas bubalinas: luteólise durante duas fases do ciclo estral, ultra-sonografia da ovulação e perfis hormonais**. São Paulo, 2000. 113 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

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, p. 1343-1355, 2004.

PRICE, C. A.; WEBB, R. Ovarian response to hCG treatment during the oestrous cycle in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 86, p. 303-308, 1989.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF 2α and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, p. 915-923, 1995.

PURSLEY, J. R.; WILTBANK, M. C.; STEVENSON, J. S.; OTTOBRE, J. S.; GARVERICK, H. A.; ANDERSON, L. L. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 295-300, 1997.

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, p. 265-277, 1995.

RICHARDS, J. S.; FITZPATRICK, S. L.; CLEMENS, J. W.; MORRIS, J. K.; ALLISTON, T.; SIROIS, J. Ovarian cell differentiation: a cascade of multiple hormones, cellular signals and regulated genes. **Recent progress in hormone research**, v. 50, p. 223-254, 1995

RIVERA, G. M.; CHANDRASEKHER, Y. A. ; EVANS, A. C. O. ; GIUDICE, L. C. ; FORTUNE, J. E. A potential role for insulin-like growth factor binding protein-4

proteolysis in the establishment of ovarian follicular dominance in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 102-111, 2001.

ROBERT, C.; GAGNÉ, D.; LUSSIER, J. G.; BOUSQUET, D.; BARNES, F. L.; SIRARD, M. A. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potencial marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. **Reproduction**, v. 125, p. 437-446, 2003.

RODRIGUES, C. A.; MANCILHA, R. F.; REIS, E. L.; AYRES, H.; GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; BARUSELLI, P. S. Efeito do número de implantes de norgestomet e do momento da administração do indutor de ovulação em vacas holandesas superovuladas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.229, 2005. Suplemento 1. (Resumo. Reunião Anual da Sociedade de Tecnologia de Embriões, 19., 2005, Angra dos Reis).

SAIRAM, M. R.; ZAKY, A. A.; HASSAN, A. A. Isolation and characterization of distinct bioactive forms of LH from male buffalo pituitaries: differences localized to their alpha subunits. **Journal of Endocrinology**, v. 143, p. 313-323, 1994.

SANTOS FILHO, A. S.; OLIVEIRA, M. A. L.; CALDAS, J. G. L.; LIMA, P. F.; DONATO, I. V. Ovarian follicular dynamics of five-eighths Girolando cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p. 207-210, 2001.

SARTORELLI, E. S. **Caracterização da fase de desvio folicular em novilhas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*)**. Botucatu, 2003. 63 p. Tese (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

SARTORELLI, E. S.; CARVALHO, L. M. ; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J.; BARROS, C. M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, p. 2382-2394, 2005.

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, p. 1403-1409, 2001.

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, p. 905-920, 2004.

SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS user's guide**: statistics. Versão 8.0. Cary: SAS, 2000.

SAUMANDE, J.; HUMBLLOT, P. The variability in the interval between estrus and ovulation in cattle and its determinants. **Animal Reproduction Science**, v. 85, p. 171-182, 2005.

SAVIO, J. D.; KEENAN, L.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, p. 663-671, 1988.

SILCOX, R. W.; POWELL, K. L.; KISER, T. E. Ability of dominant follicles (DF) to respond to exogenous GnRH administration is dependent on their stage of development. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 219, 1993. Suplemento 1.

SINGH, B.; DIXIT, V. D.; SINGH, P.; GEORGIE, G. C.; DIXIT, V. P. Plasma inhibin levels in relation to steroids and gonadotrophins during oestrous cycle in buffalo. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 36, p. 163-167, 2001.

SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 308-317, 1988.

SPICER, L. J.; ALVAREZ, P.; PRADO, T. M.; MORGAN, G. L.; HAMILTON, T. D. Effects of intraovarian infusion of insulin-like growth factor-I on ovarian follicular function in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 18, p. 265-278, 2000.

SPICER, L. J.; ALPIZAR, E.; ECHTERNKAMP, S. E. Effects of insulin, insulin-like growth factor i, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 1232-1241, 1993.

SPICER, L. J.; ECHTERNKAMP, S. E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 12, p. 223-245, 1995.

SPICER, L. J.; STEWART, R. E. Interactions among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin, and insulin-like growth factor-i (IGF-I) on cell numbers and steroidogenesis of bovine thecal cells: role of IGF-I receptors. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 255-263, 1996.

STEWART, R. E.; SPICER, L. J.; HAMILTON, T. D.; KEEFER, B. E.; DAWSON, L. J.; MORGAN, G. L.; ECHTERNKAMP, S. E. Levels of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins, luteinizing hormone and IGF-I receptors, and steroids in dominant follicles during the first follicular wave in cattle exhibiting regular estrous cycles. **Endocrinology**, v. 137, p. 2842-2850, 1996.

TSAFRIRI, A. Ovulation as a tissue remodelling process. Proteolysis and cumulus expansion. . **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 377, p. 121-140, 1995.

TSAFRIRI, A.; REICH, R. Molecular aspects of mammalian ovulation. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes** , v. 107, p. 1-11, 1999.

VIANA, J. H. M., FERREIRA, A. M., SÁ, W. F., CAMARGO, L. S. A., FREITAS, C., SANTOS, J. C. Follicular dynamics in Gyr cattle. **Arquivos da Faculdade de Veterinária. UFRGS**, v. 26, p. 379, 1998. Suplemento. (Resumo. Reunião Anual da Sociedade de Tecnologia de Embriões, 12., 1998, Atibaia).

VITTORIA, A. Anatomy of the female genital tract in the buffalo. In: **Third Course on Biotechnology of Reproduction in Buffaloes**, Casserta, Italy, p. 15-20, 1997.

WEBB, R.; GOSDEN, R. G.; TELFER, E. E.; MOOR, R. M. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. **Animal Science**, v. 68, p. 257-284, 1999.

WOLFENSON, D.; INBARA, G.; ROTH, Z.; KAIMB, M.; BLOCHA, A.; BRAW-TAL, R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology**, v. 62, p. 1042-1055, 2004.

WRATHALL, J. H.; KNIGHT, P. G. Effects of inhibin-related peptides and oestradiol on androstenedione and progesterone secretion by bovine theca cells in vitro. **Journal of Endocrinology**, v. 145, p. 491-500, 1995.

XU, Z.; GARVERICK, H. A.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; HAMILTON, S. A.; YOUNGQUIST, R. S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 951-957, 1995.

YUAN, W.; BAO, B.; GARVERICK, H. A.; YOUNGQUIST, R. S.; LUCY, M. C. Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factors (IGF)-I, IGF-II and IGF binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 15, p. 55-63, 1998.

ZALESKY, D.D.; GROTTJAN, H.E. Comparison of Intracellular and secreted isoforms of bovine and ovine luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v.44, p.1016-24, 1991.

ZEITOUN, M. M.; RODRIGUEZ, H. F.; RANDEL, R. D. Effect of season on ovarian follicular dynamics in Brahman cows. **Theriogenology**, v. 45, p. 1577-1581, 1996.