

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**DINÂMICA DO FLUXO SANGUÍNEO FOLICULAR EM
VACAS NELORE SUBMETIDAS A PROTOCOLOS DE
IATF**

João Ricardo Scaliante Júnior
Médico Veterinário

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
Dezembro de 2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**DINÂMICA DO FLUXO SANGUÍNEO FOLICULAR EM
VACAS NELORE SUBMETIDAS A PROTOCOLOS DE
IATF**

João Ricardo Scaliante Júnior

**Orientador: Prof. Dr. Maurício Machaim Franco
Co-orientadora: Dra. Bianca Damiani Marques Silva**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UFU, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Produção Animal).

**UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
Dezembro de 2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S282d
2015 Scaliante Junior, João Ricardo, 1991-
 Dinâmica do fluxo sanguíneo folicular em vacas nelore submetidas a
 protocolos de IATF / João Ricardo Scaliante Junior. - 2015.
 62 f. : il.

 Orientador: Maurício Machaim Franco.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
 Inclui bibliografia.

 1. Ciências veterinárias - Teses. 2. Ultrassonografia Doppler - Teses.
 3. Ovulação - Bovino - Teses. 4. Inseminação artificial - Hormônios -
 Gado - Teses. I. Franco, Maurício Machaim, 1965-. II. Universidade
 Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências
 Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JOÃO RICARDO SCALIANTE JÚNIOR – nascido em 7 de novembro de 1991, na cidade de Dracena, São Paulo, ingressou no 1º semestre de 2009 no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Maringá (UEM), tendo concluído em Janeiro de 2014. Em março de 2014 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), área de concentração em Produção Animal, juntamente com o ingresso na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia como pós-graduando, no qual foi bolsista pela CAPES no período de abril de 2014 a Dezembro de 2015.

“Instrua a criança segundo os objetivos que você tem para ela, e mesmo com o passar dos anos não se desviará deles.”

(Provérbios 22:6)

Dedico esse trabalho a uma pessoa que sempre esteve presente em minha vida, que me fez crescer e incentivou para ir além. A uma pessoa que mesmo sem entender do que se tratava, me apoiou e incentivou imensamente. Pessoa essa que tinha muito orgulho de saber onde eu estava, o que estava estudando, e o que eu estava buscando para mim... Dedico esse trabalho à minha bisavó Antônia Arangues Sanches Scaliante (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por ter me proporcionado à vida e as oportunidades nela surgidas...

Aos meus pais **João Ricardo Scaliante e Ione Mary Abonizio Scaliante**, pelo incentivo, apoio e confiança. Por não medirem esforços para que esse sonho fosse realizado, e por acreditarem plenamente em mim....

À minha **família**, que são meus maiores valores. Pelos companheirismos, pela paciência em minhas ausências, por todo o amor envolvido...

À **Amanda de Castro Gusson**, por, direta ou indiretamente, sempre querer o melhor para mim, me apoiar e estar ao meu lado...

Ao meu orientador **Dr. Maurício Machaim Franco**, pela oportunidade, ensinamentos, confiança, e a grande amizade estabelecida... Meu muito obrigado!

À minha co-orientadora **Dra. Bianca Damiani Marques Silva**, pela oportunidade dada, pela grande paciência, pela amizade... Por não medir esforços para passar seus conhecimentos, tanto profissional quanto pessoal... Agradeço de coração!

A todos os novos **amigos** aqui encontrado, que me ajudaram, apoiaram e não mediram esforços para me ajudar na realização desse trabalho...

A todos **componentes e funcionários** da Fazenda Sucupira, pela convivência e trabalhos realizados...

Aos **Doutorandos, Mestrandos e Estagiários** que se dispuseram de tempo e conhecimento para ajudar na execução deste trabalho...

Aos pesquisadores **Margot Dode, Ricardo Alamino Figueiredo e Eduardo Melo**, pela amizade e compartilhamentos de conhecimentos e ensinamentos científicos...

Aos **animais**, por contribuírem fundamentalmente para a realização desse trabalho...

À **Universidade Federal de Uberlândia**, pelo curso oferecido...

À **EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia**, por todo o suporte dado para a realização do experimento de pesquisa, apoio financeiro, e consequentemente conclusão desse trabalho...

À **CAPES** pelo apoio financeiro...

Agradeço a todos que torceram e vibraram junto comigo à conclusão de mais essa etapa em minha vida. Agradeço aos que me **ajudaram**, aos que me **ajudam** e aos que me **ajudarão**...

A **todos**, meu eterno agradecimento!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
I – INTRODUÇÃO.....	1
1.2 – Objetivo Geral.....	2
1.3 – Objetivo Específico.....	2
II – REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 – Biotecnologia aplicada à reprodução e produção animal.....	3
2.2 – Fisiologia reprodutiva da fêmea bovina.....	3
2.3 – Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF).....	6
2.4 – Protocolos hormonais para o uso na IATF.....	7
2.5 – Angiogênese folicular e luteal.....	9
2.6 – Ultrassonografia Doppler.....	11
III – MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 – Local e Amostra.....	13
3.2 – Delineamento Experimental.....	13
3.3 – Ultrassonografias e avaliação do fluxo sanguíneo.....	15
3.4 – Análise Estatística.....	18
IV – RESULTADOS.....	19
4.1 – Caracterização da mudança de fluxo sanguíneo folicular.....	20
4.1.1 – Protocolo BED9.....	20
4.1.2 – Protocolo BED8.....	22
4.1.3 – Protocolo CED8.....	24
4.2 – Comparação geral entre os três protocolos.....	26
V – DISCUSSÃO.....	28
VI – CONCLUSÕES.....	34
VII – REFERÊNCIAS.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µg	Micrograma (s)
BE	Benzoato de Estradiol
CE	Cipionato de Estradiol
CL	Corpo Lúteo
DF	Distrito Federal
DP	Desvio Padrão
eCG	Gonadotrofina Coriônica Equina
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IGF-I	Insulin like growth factor (Fator de Crescimento semelhante a insulina)
LH	Hormônio Luteinizante
MHz	Mega Hertz (s)
Ng	Nanograma (s)
P4	Progesterona
PGF2α	Prostaglandina F2α
PIB	Produto Interno Bruto
PIV	Produção <i>in vitro</i>
TAMV	Tempo Médio de Velocidade Máxima
TE	Transferência de Embriões
Vs	Versos (Comparação)
β	Beta
IM	Intramuscular

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Esquema do Protocolo BED9.....	14
Figura 2. Esquema do protocolo BED8.....	14
Figura 3. Esquema do Protocolo CED8.....	15
Figura 4. Imagens de folículos exemplificando os graus de circulação, de 1 a 5, pelo método subjetivo de avaliação.....	17
Figura 5. Imagem de um corpo lúteo exemplificando o método de cálculo da área total e a área irrigada, utilizando o programa MyLabDesk 8.0. A: imagem de corpo lúteo no modo bidimensional. B: imagem de corpo lúteo com sinais colorido do Doppler. C: imagem do corpo lúteo no modo bidimensional com a área total delimitada. D: imagem do corpo lúteo com sinais colorido do Doppler com a área irrigada delimitada.....	17

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

	Páginas
Tabela 1. Resultados do horário de ovulação, tamanho do folículo pré-ovulatório e taxa de ovulação nos três protocolos de IATF do presente trabalho.....	19
Tabela 2. Resultados da área total (cm ²) e área irrigada (cm ²) dos corpos lúteos avaliados no sétimo dia pós ovulação, nos três protocolos do presente trabalho (média±D.P.).....	20
Gráfico 1. Caracterização da mudança de fluxo sanguíneo no protocolo BED9, segundo a quantidade de folículos em cada grau correspondido.....	21
Gráfico 2. Comparação do diâmetro médio folicular com o grau de circulações em todos os momentos de avaliação ultrassonográfica do protocolo BED9.....	22
Gráfico 3. Caracterização da mudança de fluxo sanguíneo no protocolo BED8, segundo a quantidade de folículos em cada grau correspondido.....	23
Gráfico 4. Comparação do diâmetro médio folicular com o grau de circulação em todos os momentos de avaliação ultrassonográfica do protocolo BED8.....	24
Gráfico 5. Caracterização da mudança de fluxo sanguíneo no protocolo CED8, segundo a quantidade de folículos em cada grau correspondido.....	25
Gráfico 6. Comparação do diâmetro médio folicular com o grau de circulação em todos os momentos de avaliação ultrassonográfica do protocolo CED8.....	26
Gráfico 7. Demonstração geral dos protocolos BED9, BED8 e CED8, quanto ao diâmetro folicular e o grau de circulação em todos os momentos de avaliação ultrassonográfica.....	27

DINÂMICA DO FLUXO SANGUÍNEO FOLICULAR EM VACAS NELORE SUBMETIDAS A PROTOCOLOS DE IATF

RESUMO – Objetivou-se caracterizar a perfusão sanguínea folicular em vacas submetidas a três protocolos de IATF. Foram utilizadas 21 vacas, divididas aleatoriamente em três protocolos de IATF num modelo *crossover*, com intervalo de 30 dias de descanso. O protocolo BED9 constituiu na inserção de um dispositivo intravaginal de P4 e aplicação IM de 2mg de BE em D0, retirada da P4 e 150µg IM de PGF2α (D-cloprostenol) em D8, e 1mg de BE IM em D9; o BED8 de um dispositivo de P4 e 2mg de BE em D0, retirada da P4, 150µg de PGF2α e 1mg de BE em D8; o CED8 de um dispositivo de P4 e 2mg de BE em D0, retirada da P4, 150µg de PGF2α e 1mg de CE em D8. As vacas foram avaliadas com ultrassom Color Doppler (MyLab™30GoldVET, Itália) em intervalos de 3 horas, nas três primeiras manipulações e após de 6 em 6 horas até ocorrer a ovulação ou um prazo máximo de 90 horas após a retirada do dispositivo. Para a avaliação da vascularização folicular foi adotada uma classificação subjetiva de Grau 1 a 5, a qual considera a porcentagem de circulação na parede do folículo. Foi observado diferença ($P < 0,05$) no horário de ovulação após a retirada da P4, onde o BED8 ($64,36 \pm 10,42h$) antecipou a ovulação em relação aos outros dois tratamentos, sendo o BED9 ($74,40 \pm 3,04h$) e CED8 ($72,00 \pm 6,63h$) iguais. O tamanho médio do folículo pré-ovulatório foi igual nos três protocolos ($p = 0,0708$). A taxa de ovulação foi menor no protocolo BED8 (52,38%), e igual em BED9 (80,95%) e CED8 (90,47%) ($p = 0,3778$). No início da avaliação de todos os protocolos, todas as vacas apresentaram um folículo em grau 1, dos folículos que ovularam todos chegaram ao grau 5 antes de ovular, ocorrendo a ovulação em 12 horas, em média. Foi observado que o folículo tem a taxa de crescimento inversamente proporcional ao aumento do grau de circulação. A ferramenta Color Doppler permite examinar a vascularização na parede do folículo, tal como predizer a proximidade da ovulação.

Palavras-chave: Indutor de ovulação, perfusão sanguínea, Doppler, bovino, benzoato de estradiol, cipionato de estradiol

DYNAMICS OF FOLLICULAR BLOOD FLOW IN FTAI PROTOCOLS IN NELORE COWS

ABSTRACT – This study aimed to characterize the blood follicle perfusion in 3 fixed-time artificial insemination protocols. Twenty one Nelore cows, randomly divided into three FTAI protocols in a crossover model with a 30 days interval, were used. The BED9 protocol consisted of an intravaginal progesterone implant Sincrogest® and 2 mg of BE IM in D0; implant removal and 150µg IM PGF2α (D-cloprostenol) in D8, and 1 mg of BE IM in D9; BED8 protocol consisted of a P4 implant and 2 mg BE in D0; removal of the implant, 150µg of PGF2α and 1 mg BE in D8; CED8 protocol consisted of na P4 implant and 2 mg BE D0, removal of the implant, 150µg of PGF2α and 1 mg CE in D8. The group of cows was evaluated with ultrasound Color Doppler (MyLab™ 30GoldVET, Italy) at 3 hours intervals in the first three manipulations and then with 6 hours intervals until ovulation occurs or a maximum of 90 hours, after implant withdrawal. For follicle vascularization was used a subjective rating of degree 1 to 5, which considers the percentage of vascularization in the follicle wall. There was difference ($P<0.05$) in ovulation time after P4 withdrawal, with BED8 (64.36 ± 10.42 h) anticipated ovulation comparing with the other two treatments, being BED9 (74.40 ± 3.04 h) and CED8 (72.00 ± 6.63 h) equal. The average size of the pre-ovulatory follicles were similar in the three protocols ($p=0.0708$). The ovulation rate was lower in BED8 protocol (52.38%), and BED9 (80.95%) and CED8 (90.47%) were similar ($p=0.3778$). In the three protocols, all animals had a degree 1 follicle at the beginning of evaluation; all ovulatory follicles had degree 5 before ovulation time and this occurred in 12 hours. It was observed that the follicle has the growth rate inversely proportional to the increase of vascularization grade. The Color Doppler tool can examine the vasculature in the follicle wall as predicting the approach of ovulation.

Keywords: Ovulation inductor, blood perfusion, Doppler, bovine, estradiol benzoate, estradiol cypionate

I – INTRODUÇÃO

A biotecnologia da reprodução bovina tem avançado para chegar a uma máxima eficiência reprodutiva e conseqüentemente um ótimo índice de produção animal. Uma das tecnologias empregadas para isso é a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), onde sua execução pode ser feita sem a observação do estro, aplicando em grande escala. Os hormônios para indução e sincronização de ovulação são vários dependendo do protocolo de IATF, sendo o benzoato de estradiol (BE), o Cipionato de Estradiol (CE) e o GnRH os mais utilizados. Porém, alguns protocolos de IATF ainda resultam em uma baixa sincronização de ovulação, e conseqüentemente uma baixa taxa de prenhes. A caracterização do fluxo sanguíneo do folículo pré-ovulatório através da ferramenta Color Doppler permite avaliar a vascularização folicular e assim poderá auxiliar no esclarecimento dos mecanismos que envolvem a ovulação.

Estes exames ultrassonográficos com o Doppler colorido são uma ferramenta útil, não invasiva, para avaliação do fluxo sanguíneo do ovário, o que permite observação visual em tempo real da perfusão sanguínea em uma área delimitada dentro do corpo lúteo e na parede de folículos pré-ovulatórios (ACOSTA et al., 2002). Esta técnica foi utilizada para estudos hemodinâmicos de folículos pré-ovulatórios em humanos (BRANNSTROM et al., 1998) e em vacas (ACOSTA et al., 2003). Nas vacas demonstraram uma diferença da vascularização na parede de um folículo pré-ovulatório em comparação com folículos anovulatórios (ACOSTA et al., 2003). Então, para compreensão dos papéis dos fluxos sanguíneos fisiológicos é importante determinar mudanças locais de fluxo sanguíneo em folículos individuais e corpo lúteo em fases específicas do ciclo estral.

Foi verificada uma elevação do fluxo sanguíneo folicular e de concentrações de estradiol e LH em resposta à elevação do GnRH, seja ele endógeno ou exógeno (ACOSTA et al., 2003). Já o corpo lúteo é dependente de um processo angiogênico ativo que ocorre nos primeiros dias após a ovulação para produzir e liberar progesterona. Este processo torna o corpo lúteo um órgão altamente vascularizado, recebendo a maior taxa de fluxo de sangue por unidade de tecido do que qualquer outro órgão, sendo esse sistema vascular lúteo necessário para aporte de substâncias

biológicas e fornecer nutrientes, substratos hormonais e hormônios para realizar a secreção de progesterona (WILTBANK et al., 1988). Entretanto, não há informações disponíveis sobre mudanças locais e caracterização do fluxo sanguíneo ovariano durante protocolos de IATF, e com o desenvolvimento da biotecnologia e o aumento do volume de comercialização do Doppler colorido, o seu custo tende a baratear, permitindo sua utilização de forma mais ampla no campo (AYRES & MINGOTI, 2012). Isto será uma ferramenta útil para avaliações mais detalhadas e precisas de folículos ovarianos e corpo lúteo, porém ainda necessita de mais pesquisas nesta área.

Hipótese

O fluxo sanguíneo na parede do folículo prediz qual será o folículo dominante e a proximidade da ovulação, e o fluxo sanguíneo no corpo lúteo prediz a qualidade do mesmo.

1.2 - Objetivo Geral

Caracterizar, com a ferramenta Color-Doppler, as mudanças em tempo real do fluxo sanguíneo na parede do folículo dominante, e em um momento específico no corpo lúteo.

1.3 - Objetivo Específico

- Caracterizar as mudanças de fluxo sanguíneo do folículo dominante desde sua provável divergência até a ovulação em vacas submetidas a três protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF).
- Estabelecer a área compreendida de fluxo sanguíneo em corpos lúteos no sétimo dia pós ovulação.

II – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biotecnologia aplicada à reprodução e produção bovina

O setor agropecuário vem crescendo cada vez mais dentro da economia brasileira. O produto interno bruto (PIB) de toda economia brasileira representou uma queda de 0,2% em comparação do primeiro trimestre de 2015 ao quarto trimestre de 2014, enquanto a agropecuária brasileira cresceu 4,7% dentro do PIB no mesmo período (IBGE, 2015).

O Brasil possui aproximadamente 209 milhões de bovinos, sendo o segundo maior rebanho mundial (IBGE, 2015). Desse total, 80% é composto por animais de raças zebuínas (*Bos taurus indicus*), e dentro dessas raças podemos destacar a raça Nelore, com 90% desta parcela (ABIEC, 2015). E, aliado a estes números, a bovinocultura de corte vem se modernizando através da incorporação de biotécnicas e profissionalizando seus processos para evoluir a sistemas cada vez mais produtivos (STOCK et al., 2008; OLIVEIRA, 2015).

Dentre as biotecnologias que envolvem o melhoramento genético e reprodutivo do rebanho, destacam-se a inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE), produção de embriões in vitro (PIV), e clonagem (SCHMIDT, 2007). Sendo a IA a biotécnica reprodutiva mais antiga e de grande impacto na produção animal, difundida em todo mundo como uma ferramenta eficaz e econômica no melhoramento genético da bovinocultura de corte e de leite (REICHENBACH et al., 2008).

2.2 Fisiologia reprodutiva da fêmea bovina

Compreender os fenômenos fisiológicos reprodutivos da fêmea bovina, associados aos mecanismos que ocorrem nos ovários, é de fundamental importância para otimizar as biotécnicas da reprodução e a eficiência reprodutiva dos rebanhos (BARUSELLI et al., 2007).

O ciclo estral em bovinos tem uma duração média de 21 dias, e é caracterizado por uma série de alterações hormonais, morfológicas e comportamentais (MOREIRA et al., 2002; ALBUQUERQUE et al., 2004; JAINUDEEN e HAFEZ, 2004). As

características do ciclo estral são influenciadas por vários fatores, entre eles a idade (DE SILVA et al., 1981), produção de leite (VAN VLIET E VAN EERDENBURG, 1996), condições ambientais (WHITE et al., 2002) e fatores sociais (hierarquia) (LANDAETA-HERNÁNDEZ et al., 2004).

Fêmeas *Bos taurus indicus* geralmente apresentam um estro de duração mais curto (aproximadamente 10 horas) em relação a fêmeas *Bos taurus taurus*, o que pode dificultar sua detecção (BÓ et al., 2003). E, além disso, mais de 50% desses animais iniciam a manifestação de estro no período noturno (entre 18:00 e 6:00 h), dificultando o manejo na detecção do estro e a execução de algumas biotécnicas (PINHEIRO et al., 1998; MEMBRIVE, 2000).

Em cada fase do ciclo estral ocorrem mecanismos físicos e químicos que são basicamente regulados por hormônios através de um mecanismo de *feedback* (positivos em alguns momentos e negativos em outros). Hormônios são substâncias químicas que são produzidas por células específicas que atuam sobre uma célula-alvo, as quais são condicionadas para responder aos seus estímulos específicos em determinados momentos. Vários hormônios participam direta ou indiretamente de eventos reprodutivos em fêmeas bovinas. O FSH (Hormônio Folículo Estimulante) estimula o crescimento folicular e contribui para a formação de receptores de LH e FSH no folículo, estando diretamente envolvido na fase de recrutamento e início de uma onda de crescimento folicular, e o LH (Hormônio Luteinizante) desencadeia a ovulação após seu pico por pulso. O estrógeno atua na receptividade sexual (aceitação de monta) durante o estro, promove o relaxamento da cérvix e tem efeito *feedback* (+) para estimular o pico e liberação de LH. Os progestágenos atuam inibindo a motilidade uterina espontânea e são essenciais para a manutenção de gestações. As prostaglandinas executam funções em muitas células e tecidos corporais, sendo que em relação aos eventos reprodutivos da fêmea bovina, a F2 α tem a função de realizar a luteólise (PALHANO, 2008).

Na dinâmica folicular, a população de folículos ovarianos apresenta uma grande variação de número, tamanho e taxas de crescimento; participando estes folículos da fase de recrutamento, seleção e dominância. Em bovinos, o desenvolvimento folicular acontece em um padrão de ondas, onde cada onda de crescimento 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., 2003). Destes, apenas um continua seu desenvolvimento (folículo dominante), enquanto os outros sofrem decréscimo de tamanho (folículos subordinados) (LUCY et al., 1992). O folículo dominante de cada onda é capaz de inibir o crescimento e induzir a atresia dos demais folículos em desenvolvimento, além de bloquear o surgimento de uma nova onda folicular (PIERSON & GINTHER, 1988; SÁVIO et al., 1988; ASSEY et al., 1993). O folículo da fase de dominância só chegará à ovulação na segunda ou terceira onda de crescimento, em função da regressão do nível plasmático de progesterona e produção contínua de 17β -estradiol e inibina; ovulando logo após o pico de secreção de LH (PALHANO, 2008).

Animais *Bos taurus indicus* têm um maior número de folículos presentes no ovário em relação a animais *Bos taurus taurus*, e a hipótese dessa maior população de folículos pode ser devido à elevada concentração de IGF-I, mesmo na presença de baixos níveis de FSH (BÓ et al., 2003).

Em bovinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), o desvio tem início por volta do dia 2,5 a 2,7 após a emergência da onda (GIMENES et al., 2005; SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2006), e de acordo com MARTINEZ et al. (2004) a seleção do folículo dominante fica evidente três dias após a emergência da onda. Contudo, apesar de relatos sobre a aquisição de receptores de LH pelo folículo dominante no momento da divergência, existem estudos demonstrando que este folículo ainda não é responsivo a um indutor de ovulação (BARUSELLI et al., 2007). SARTORI et al. (2001), verificaram em vacas Holandesas que os folículos alcançam a capacidade ovulatória somente após atingirem 10 mm de diâmetro. Novilhas *Bos taurus indicus* (Nelore e Gir) que foram tratadas com 25 mg de LH quando o folículo dominante atingiu um diâmetro médio de 7,7 mm tiveram uma taxa de ovulação de apenas 33%, enquanto que novilhas da mesma raça com diâmetro médio de 10 mm tiveram uma taxa de ovulação superior a 90% (GIMENES et al., 2005).

Relatos do diâmetro médio de folículos pré-ovulatórios em animais *Bos taurus indicus* foram de 11,3 a 12,1 mm (FIGUEIREDO et al., 1997) e, corpos lúteos de zebuínos variam de 17 a 21 mm de diâmetro em seu tamanho máximo (RHODES et al., 1995; FIGUEIREDO et al., 1997). De acordo com GIMENES et al. (2008), a

capacidade ovulatória de um folículo em protocolos hormonais de IATF é dependente do tamanho que o folículo se encontra no momento da aplicação do indutor de ovulação, sendo essa uma das grandes causas de variações em protocolos hormonais. Além disso, SÁ FILHO et al. (2011) descreveram que a mensuração do folículo dominante no momento da IA é uma importante estratégia para prever uma alta fecundidade em fêmeas zebuínas.

2.3 Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF)

A Inseminação Artificial (IA) mostrou ser uma técnica viável e economicamente eficaz para um melhor retorno econômico e aceleração no ganho genético, consagrando-se mundialmente. Dentre suas vantagens destacam-se a padronização do rebanho, controle de doenças sexualmente transmissíveis, melhor organização da fazenda, diminuição no custo de reposição de touros, maior conhecimento técnico dos funcionários, uso de sêmen de reprodutores que já faleceram, etc. Contudo, o principal benefício dessa técnica é o melhoramento genético, utilizando sêmen de touros avaliados, para obtenção de crias com alto potencial produtivo (ASBIA, 2007).

Porém, com a evolução e o emprego da técnica em grande escala, os problemas como detecção de estro e principalmente a necessidade de mão de obra em tempo integral, levaram pesquisadores a buscarem técnicas alternativas sem comprometer os índices de reprodução (BARUSELLI et al., 2004). Então, surgiram as técnicas de inseminação sem a necessidade de detecção de estro, a inseminação artificial em tempo fixo, que por meio da utilização de hormônios, induz a sincronização do estro e da ovulação nos animais (WILTBANK et al., 1971; MARTINEZ et al., 1998), levando a um aumento na eficiência reprodutiva, redução do intervalo entre partos e concentração de nascimento de bezerros em épocas do ano estratégicas (MALUF, 2002).

A IATF necessita de um investimento inicial, e seus resultados nem sempre são demonstrados no primeiro momento de sua implantação, surgindo, além das vantagens, gastos diretos e indiretos como: adoção de instrumentos de controle e de manejo, aquisição de hormônios, serviços veterinários, sendo estes muitas vezes uma dificuldade por parte do produtor para iniciar sua implantação (FERRAZ, 1996;

PEREIRA, 1999, ASBIA, 2003). Relação custo/benefício merece total atenção para empregar biotécnicas, tendo que ser levado em conta todos os custos e benefícios, que nem sempre são fáceis para individualizar e quantificar (MARION, 2001).

AMARAL et al. (2003) trabalhando com simulação do custo da IATF, em um protocolo contendo dispositivo de progesterona (1,9g), associado com a aplicação de 2mg de benzoato de estradiol (Estrogin®) no dia 0, aplicação de 25 mg de dinoprost trometamina no dia 6, retirada do dispositivo no dia 8, 1mg de benzoato de estradiol aplicado 24 horas após a retirada do dispositivo e IA realizada 48 horas após a retirada do dispositivo intravaginal, obtiveram 81, 15 e 4% dos custos totais para material de consumo, mão-de-obra e manutenção dos animais de serviço, respectivamente.

Comparando o custo total da IATF com a IA, a IATF teve um custo superior de 37,42%, sendo o material de consumo o item de maior contribuição desse aumento devido aos custos dos fármacos, mas proporcionou taxas de gestação de 62,5% e 55% para IATF e IA, respectivamente (SILVA, 2007). Porém a IA se limita a detecção em massa de estro, tornando a IATF uma biotécnica que vem promovendo um aumento na produtividade pela sua melhoria genética e estabelecendo eficientes manejos reprodutivo (BÓ et al., 2003).

2.4 Protocolos Hormonais para uso na IATF

Para viabilizar a IATF, diversos protocolos hormonais têm sido elaborados na tentativa de controlar as funções ovarianas foliculares e luteais. Para este fim, muitos são os hormônios, destacando as progesteronas e benzoato de estradiol, na finalidade de sincronizar a onda da emergência folicular no início do protocolo; a remoção do dispositivo impregnado de progesterona e as prostaglandinas para assegurar a luteólise; e os ésteres de estradiol, o GnRH e o LH para induzir a ovulação sincronizada (BÓ et al., 2003).

O controle preciso do momento da ovulação é de fundamental importância para a IATF, visto que inseminações perto do momento da ovulação levam a índices maiores de prenhes. Em bovinos, os indutores de ovulação mais utilizados são o benzoato de estradiol (BE) e o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), porém,

no Brasil, os ésteres de estradiol são os mais utilizados devido a sua eficiência e seu menor custo (MENEGETTI et al., 2009).

O estradiol e seus ésteres são frequentemente utilizados para promover o controle farmacológico do ciclo estral, pois quando administrado na ausência de níveis plasmáticos de progesterona pode promover a liberação de GnRH e LH, induzindo a ovulação. Porém ambos são diferentes quanto a sua utilização, pois possuem meias-vidas distintas, sendo necessário sua utilização em tempo distintos (MOENTER et al., 1990). O benzoato de estradiol induz o pico de LH por volta de 18 horas após sua administração (HANLON et al., 1997), enquanto o cipionato de estradiol induz 40 horas após sua aplicação (AMBROSE et al., 2001). Além disso, o cipionato de estradiol apresenta uma baixa solubilidade em água, conseqüentemente tendo uma liberação mais lenta no seu local de administração, levando uma atividade biológica mais lenta e possibilitando sua administração no dia 8 de protocolos de IATF (COLAZO et al., 2003).

Protocolos a base de P4 + estradiol não são dependentes da presença de um folículo dominante, pois este visa a diminuição das concentrações de FSH e LH, provocando uma atresia folicular e início de uma nova onda 3 a 5 dias após o tratamento (BURKE et al., 2005; RHODES et al., 2002), sendo dependente da dose utilizada e independente da fase de desenvolvimento que a onda folicular se encontra (BURKE et al., 2001; MARTÍNES et al., 2005; SALFEN et al., 2001; BURKE et al., 2000; THUNDATHIL et al., 1998).

Utilizando o protocolo P4 + estradiol em D0, PGF₂α em D7 e E.C.P.[®] (cipionato de estradiol) em D9, VASCONCELOS E MENEGETTI (2006) obtiveram uma taxa de sincronização de ovulação próximo a 95%, enquanto que no protocolo GnRH em D0, PGF₂α em D6,5 e GnRH em D8,5, os mesmos autores obtiveram taxa de sincronização de ovulação próximo a 75%. Já em protocolo submetido em vacas cíclicas, em que foi introduzido dispositivo de progesterona e administrado 2 mg de benzoato de estradiol no dia 0, administração de PGF₂α no dia 7, E.C.P.[®] no dia 9 e inseminação artificial 48 horas após a aplicação de E.C.P.[®], obteve-se 90,6% de sincronização da taxa ovulação e 66% na taxa de concepção.

MOURA et al. (2003) avaliaram o efeito da administração de benzoato de estradiol (BE) 24 horas após a retirada de um dispositivo de progesterona previamente

utilizado (Crestar[®]), onde o protocolo era composto de 2mg de BE e dispositivo de progesterona no dia 0, no dia 8 retiraram-se os dispositivos e foram administrados 400 UI de eCG IM e 150 µg de d-cloprostenol. Um grupo recebeu BE 24 horas após a retirada do dispositivo e outro grupo não. Os resultados mostraram que a administração de 1 mg de BE (24 horas após a retirada dos dispositivos) determinou aumento significativo na taxa de concepção (sem BE 32,5% vs com BE 51,2%).

Com objetivo de diminuir o número de vezes que os animais são manejados para realização do protocolo de IATF (de 4 para 3 manejos), AYRES et al. (2006) realizaram um estudo experimental para substituir o BE 24 horas após a remoção do implante de progesterona pelo cipionato de estradiol (CE) no momento da retirada do implante. Os protocolos foram constituídos de um dispositivo previamente utilizado (Crestar[®]) associado a 2mg de BE no Dia 0, no Dia 8 realizou a remoção do Crestar junto com a administração de uma dose de d-cloprostenol (150 µg) e de eCG (400 UI). A partir desse momento, o lote foi dividido em três grupos, onde um grupo recebeu BE 24 horas após a retirada do implante, outro recebeu 0,5mg de CE no momento da retirada do implante, e o terceiro grupo recebeu 1mg de CE, também no momento da retirada do implante. Os resultados mostraram que os animais que receberam 1mg de CE (D8) obtiveram taxa de concepção semelhante aos animais que receberam 1mg de BE (D9), e superiores aos animais que receberam 0,5mg de CE (D8), validando a dose do CE e do protocolo de três manejos.

2.5 Angiogênese Folicular e Luteal

O folículo dominante mantém seu crescimento fisiológico em função do aumento do número de receptores para gonadotrofinas e de um aumento no aporte sanguíneo (FORTUNE, 1994). Os folículos do período transitório são visivelmente menos vascularizados e possuem uma atividade proliferativa menor (WATSON et al., 2002).

Estudos morfológicos em bovinos têm demonstrado uma extensa rede vascular ao redor da camada da teca e, uma área avascular na membrana basal e granulosa. Os sinais de fluxo sanguíneo na base do folículo antes do aumento do LH plasmático são bem limitados, ocorrendo o primeiro aumento na área do fluxo sanguíneo seis

horas antes do começo do pico de LH (MATTIOLI et al., 2001). No entanto, quando avaliado o tempo médio da velocidade máxima (TAMV) do fluxo vascular, este não aumentou até seis horas antes nem seis horas depois do pico de LH, indicando que a avaliação do fluxo da área colorida é um melhor indicador em relação à avaliação do tempo médio da velocidade máxima. E, sinais de fluxo sanguíneo colorido não são detectados em um folículo de tamanho pré-ovulatório que não irá ovular, sugerindo o potencial da ferramenta Color-Doppler para aplicar a função de avaliações de fluxo sanguíneo colorido (GINTHER, 2007).

A transição folicular-luteal é um processo dinâmico que envolve várias mudanças bioquímicas e estruturais do folículo pré-ovulatório, incluindo a diferenciação de células da granulosa e da teca em células luteinizadas. E para suprir essa demanda, há a necessidade de um crescimento de vasos e estabelecimento de uma rede capilar para suprimento sanguíneo (REYNOLDS & REDMER, 1999; NISWENDER et al., 2000).

O desenvolvimento do corpo lúteo é caracterizado pelo aumento da vascularização e pela ocorrência de repetidas mitoses. Sendo que após dois a três dias de ovulação há uma intensidade no processo angiogênico dentro do corpo lúteo (REYNOLDS et al., 2000). Com todo esse processo, o corpo lúteo torna-se uma das estruturas mais vascularizadas do corpo (GAYTAN et al., 1999), recebendo a maior taxa de fluxo sanguíneo por tecido de todo o organismo (WILTBANK et al., 1988).

Um sistema de cascata é visto nesse processo de angiogênese, onde o sangue fornece precursores de esteroides e gonadotrofinas (JANSON et al, 1981). Por consequência, a vascularização precede a síntese de progesterona (ACOSTA et al, 2004), e a maioria das células esteroideogênicas do CL estão em contato bem próximo com capilares (REYNOLDS et al, 1992). O espalhamento desses capilares é induzido por fatores de crescimento e potenciada localmente pela angiotensina II, apoiando a síntese de progesterona em células lúteas (KOBAYASHI et al., 2001).

O sistema de vascularização do corpo lúteo funciona como um entregador biológico de nutrientes para as células lúteas, indispensáveis para produção de hormônios e reguladores; onde estes hormônios e reguladores agem na regulação da progesterona (AYRES & MINGOTI, 2012).

2.6 Ultrassonografia Doppler

A ultrassonografia bidimensional convencional é um método não invasivo utilizado para diagnóstico de gestação e controle do ciclo estral na reprodução animal. No entanto nenhuma informação das características hemodinâmicas vasculares podem ser detectadas, sendo necessário o uso da ferramenta Color Doppler para este fim (DI SALVO et al., 2006).

A ultrassonografia Doppler é uma técnica relativamente recente na medicina veterinária, descrita pela primeira vez em 1842 por Christian Johann Doppler. Doppler é uma ferramenta associada à ultrassonografia convencional que fornece informações em tempo real sobre a arquitetura vascular e os aspectos hemodinâmicos dos vasos, permitindo avaliar a presença, a direção e a qualidade do fluxo sanguíneo (KING, 2006; CARVALHO et al., 2008), se tornando uma ferramenta amplamente utilizada na clínica de grandes animais e programas de pesquisas na reprodução animal (GINTHER & UTT, 2004; MIYAMOTO et al., 2006).

O ultrassom Color-Doppler é uma técnica útil na avaliação da função vascular ovariana, por permitir a observação em tempo real do fluxo sanguíneo em uma área delimitada (MATSUI & MIYAMOTO, 2009), apresentando alta sensibilidade, acurácia e pouco invasiva, que permite procedimentos não cirúrgicos para monitoramento. Esta técnica auxilia a investigação da vascularização do folículo, do ovário e do útero (AYRES & MINGOTI, 2012), e foi usado para estudos hemodinâmicos não invasivos de folículos pré-ovulatórios em seres humanos (BRANNSTROM et al., 1998) e vacas. Em vacas, demonstrou uma clara diferença na vascularização da parede de folículos pré-ovulatórios em comparação com a de folículos anovulatórios (ACOSTA et al., 2003).

A ultrassonografia com o modo Doppler fornece duas abordagens diferentes para a avaliação do sistema vascular: 1) exibição do fluxo colorido em cima da imagem do modo-B em estruturas de tecidos e órgãos (color-flow), e 2) análise do Doppler pulsado na mudança de velocidade em uma pequena área de fluxo durante o pulso arterial. Imagens do Color-Doppler fornecem a visualização do fluxo sanguíneo em tempo real, variando de fluxo de alta velocidade em grandes vasos e mínimos fluxos em pequenos vasos. A exibição do fluxo colorido na imagem é preferível pelo operador

à mudança de velocidade do fluxo, pois este fornece a visualização do fluxo sanguíneo enquanto a área de interesse está sendo escaneada. Nessa abordagem (fluxo colorido), a avaliação é feita em tempo real e de julgamento subjetivo do operador, e quando adquirido experiência de operação, a avaliação subjetiva pode ser considerada uma avaliação objetiva de sinais coloridos confiáveis. O fluxo sanguíneo na parede do folículo pode ser classificada e obtida pela porcentagem, baseada na proporção estimada de sinais coloridos na parede dos mesmos. A extensa perfusão local ou fluxo sanguíneo nas estruturas e tecidos podem estimar os níveis de fluxo no tecido, usando as imagens no modo color-flow. Com essa ferramenta, pode-se rapidamente fazer uma avaliação transretal e obter imagens com fluxo sanguíneo de estruturas e tecidos em tempo real (GINTHER, 2007).

III – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local e Amostra

O experimento foi realizado no Campo Experimental Fazenda Sucupira, pertencente à EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) Recursos Genéticos e Biotecnologia, que está situado a sudoeste da cidade de Brasília, a 35 km, entre as cidades satélites Recanto das Emas e Riacho Fundo I, com coordenadas 15° 52' a 15° 56' e 48° 00' a 48° 02' W. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia para o uso de animais sob o número de protocolo 003-2015.

Foram utilizadas 21 vacas da raça nelore (*Bos taurus indicus*), em média com 48 meses de idade, peso 420 kg (380 a 460 kg) e escore corporal 3,5 (em escala de 1-5, EDMONSON et al., 1989), as quais foram mantidas em pastagem de braquiária com sal mineral e água a vontade durante todo o experimento. Previamente ao início do protocolo de IATF, esses animais foram submetidos a exame clínico-ginecológico e ultrassonografia transretal, utilizando um ultrassom (MyLab™30GoldVET, Esaote S.p.A., Firenze, Itália) com transdutor linear de 7,5 MHz de frequência (Esaote S.p.A., Via di Caciolle, 15 Firenze, Itália), sendo considerados aptos a participar do experimento os animais que não apresentassem, no momento da avaliação, anormalidades do trato reprodutivo e sem histórico de enfermidades.

3.2 Delineamento Experimental

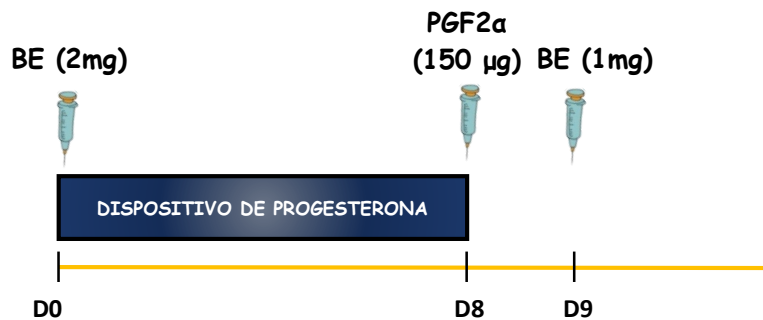
Foram utilizados um total de 21 animais num modelo crossover, submetidos, aleatoriamente, a três protocolos de IATF. Todos os animais passaram pelos três tratamentos, visando atenuar influências de fármacos, com um intervalo de descanso de 30 dias entre as etapas.

Os protocolos utilizados foram:

Protocolo BED9 (n=21): No dia 0 (D0) foi inserido o dispositivo intravaginal impregnado com 1g de progesterona (Sincrogest®, Ouro Fino Saúde Animal Ltda, Cravinhos-SP, Brasil) e administrado 2mg de benzoato de estradiol IM (Benzoato HC,

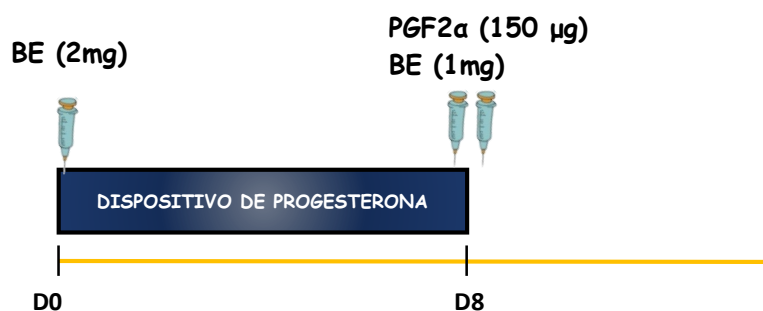
Hertape Calier Saúde Animal S.A., Juatuba-MG, Brasil). No dia 8 (D8) foi retirado o dispositivo impregnado de progesterona e administrado 150 µg de D-cloprostenol IM (Veteglan®Luteolítico, Hertape Calier Saúde Animal S.A., Juatuba-MG, Brasil), e 24 horas após a retirada do dispositivo (D9) foi administrado 1mg de BE IM (Benzoato HC, Hertape Calier Saúde Animal S.A., Juatuba-MG, Brasil).

Figura 1. Esquema do Protocolo BED9.



Protocolo BED8 (n=21): No D0 foi inserido o dispositivo intravaginal impregnado com 1g de progesterona (Sincrogest®, Ouro Fino Saúde Animal Ltda, Cravinhos-SP, Brasil) e administrado 2mg de BE IM (Benzoato HC, Hertape Calier Saúde Animal S.A., Juatuba-MG, Brasil). No D8 foi retirado o dispositivo impregnado de progesterona, administrado 150 µg de D-cloprostenol (Veteglan®Luteolítico, Hertape Calier Saúde Animal S.A., Juatuba-MG, Brasil) e 1mg de BE (Benzoato HC, Hertape Calier Saúde Animal S.A., Juatuba-MG, Brasil), ambos IM.

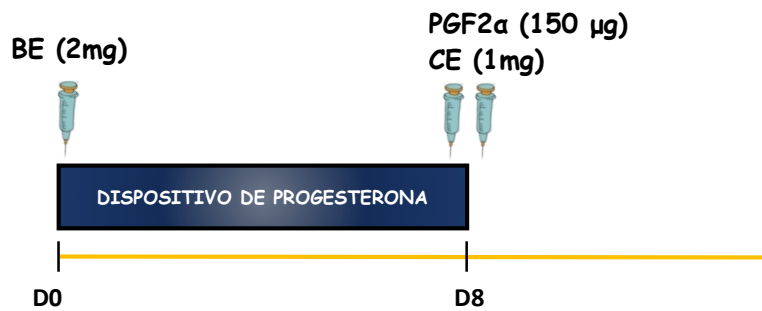
Figura 2. Esquema do protocolo BED8.



Protocolo CED8 (n=21): No D0 foi inserido o dispositivo intravaginal impregnado com 1g de progesterona (Sincrogest®, Ouro Fino Saúde Animal Ltda, Cravinhos-SP, Brasil) e administrado 2mg de BE IM (Benzoato HC, Hertape Calier

Saúde Animal S.A., Juatuba-MG, Brasil). No D8 foi retirado o dispositivo impregnado de progesterona, administrado 150 μg de D-cloprostenol (Veteglan®Luteolítico, Hertape Calier Saúde Animal S.A., Juatuba-MG, Brasil) e 1mg de cipionato de estradiol (E.C.P.®, Ouro Fino Saúde Animal Ltda, Cravinhos-SP, Brasil), ambos IM.

Figura 3. Esquema do Protocolo CED8.



3.3 Ultrassonografias e avaliação do fluxo sanguíneo

Os folículos e corpos lúteos foram avaliados por ultrassonografia transretal usando um ultrassom bidimensional com Doppler (MyLab™30GoldVET, Esaote S.p.A., Firenze, Itália) equipado com um transdutor linear multi-frequencial (Esaote S.p.A., Via di Caciolle, 15 Firenze, Itália), no qual foram feitas tanto avaliação bidimensional quanto avaliação com a ferramenta Doppler em todos os exames. Para avaliar o diâmetro folicular utilizou o transdutor linear em 7,5 MHz, e na avaliação do fluxo sanguíneo utilizou o transdutor linear em 5 MHz de frequência. Todas as investigações ultrassonográficas foram feitas pelo mesmo examinador. A ultrassonografia iniciou-se no D4 e foi realizada a cada 24 horas (sempre no mesmo horário), até o D8 dos protocolos. Após a retirada do dispositivo de progesterona (D8), a ultrassonografia começou a ser realizada num intervalo de 3 horas nas primeiras três manipulações e em seguida realizada de 6 em 6 horas até ocorrer a ovulação do folículo dominante ou atingir um prazo máximo de 90 horas (0h, 3h, 6h, 12h, 18h, 24h, 30h, 36h, 42h, 48h, 54h, 60h, 66h, 72h, 78h, 84h e 90h), definido como 0 horas a retirada do dispositivo de progesterona. Os folículos de maior diâmetro nos ovários foram mensurados, e após, ligado a ferramenta color-flow classificou-se o grau de circulação em tempo real. O momento da ovulação foi estimado pelo intervalo médio entre a observação do maior diâmetro do folículo dominante e seu desaparecimento

na imagem ultrassonográfica do exame seguinte, e o tamanho do folículo pré-ovulatório foi considerado o tamanho da sua última visualização antes de ovular.

A classificação da mudança de fluxo sanguíneo folicular foi feita de forma subjetiva segundo GINTHER et al., (2007) modificado, no qual descrevem que uma das abordagens para avaliação do sistema vascular na ultrassonografia com o modo Doppler é a exibição do fluxo colorido em cima da imagem do modo-B em estruturas de tecidos e órgãos, podendo ser estimado por porcentagem. A circulação sanguínea foi observada em tempo real, quando obtido o maior diâmetro e melhor circulação do folículo dominante, e foram classificadas em graus de 1 a 5, no qual o grau 1 compreendeu detecção de circulação sanguínea em 0 a 20% da circunferência da parede do folículo, grau 2 em 20 a 40%, grau 3 em 40 a 60%, grau 4 em 60 a 80% e grau 5 em 80 a 100% de detecção de fluxo sanguíneo na parede do folículo.

Após esse período, as vacas retornaram ao curral no sétimo dia pós-ovulação para realização de exames ultrassonográficos no corpo lúteo dos animais que chegaram a ovulação. Nesses exames ultrassonográficos foram feitas imagens dos corpos lúteos no modo-B e posteriormente feito vídeos do fluxo sanguíneo sobre o corpo lúteo. A área total (cm²) e a área irrigada (cm²) foram calculadas com o auxílio do programa MyLabDesk 8.0 (Esaote S.p.A.).

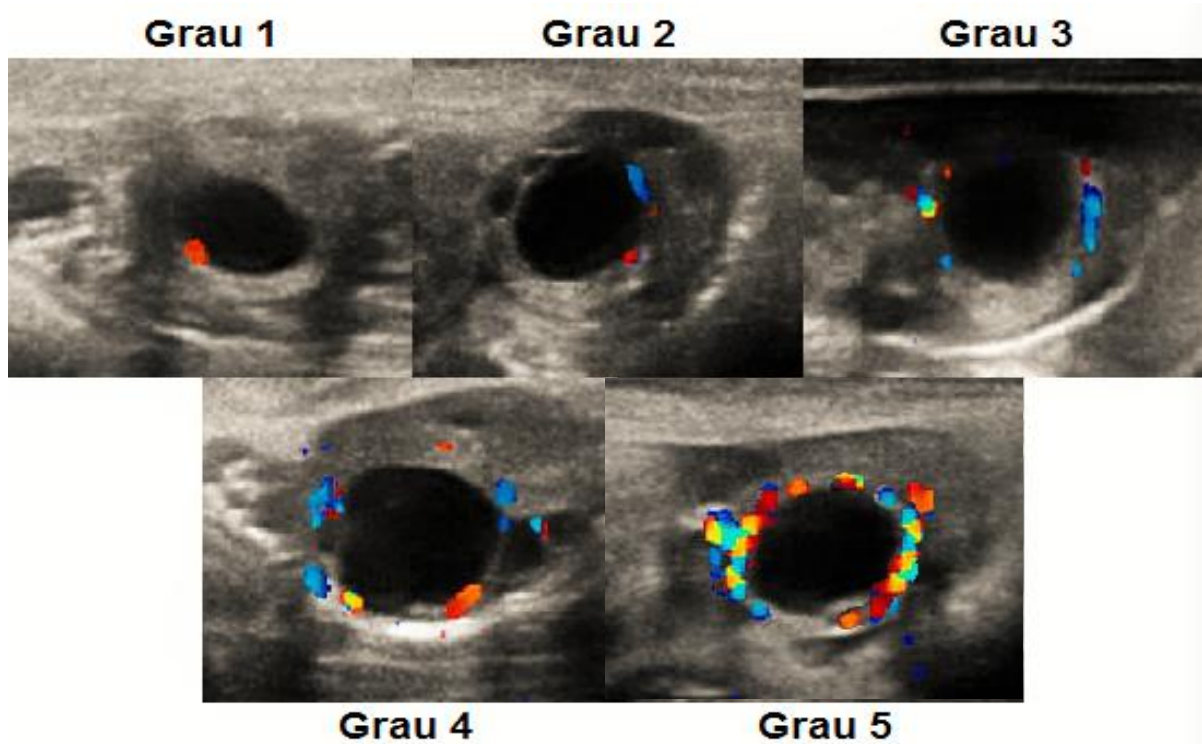


Figura 4. Imagens de folículos exemplificando os graus de circulação, de 1 a 5, pelo método subjetivo de avaliação. Grau 1 de 0 a 20% da circunferência, grau 2 de 20 a 40%, grau 3 de 40 a 60%, grau 4 de 60 a 80% e grau 5 de 80 a 100%.

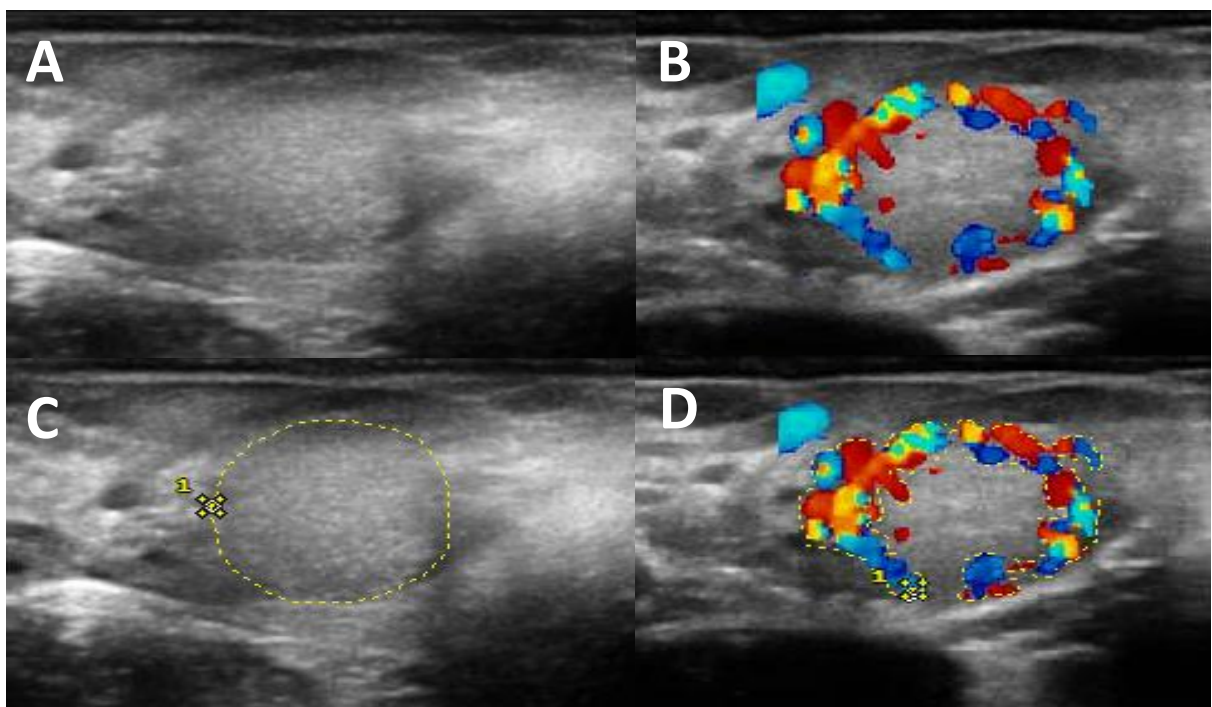


Figura 5. Imagem de um corpo lúteo exemplificando o método de cálculo da área total e a área irrigada, utilizando o programa MyLabDesk 8.0. A: imagem de corpo lúteo no modo bidimensional. B: imagem de corpo lúteo com sinais colorido do Doppler. C: imagem do corpo lúteo no modo bidimensional com a área total delimitada. D: imagem do corpo lúteo com sinais colorido do Doppler com a área irrigada delimitada.

3.4 Análise Estatística

Na análise Estatística, testou-se a normalidade dos resíduos de cada variável (significância de 5%) com a finalidade de definir o tipo de teste a ser aplicado em cada caso. Usou-se o teste de análise de variância (ANOVA: um critério) para os dados que apresentaram normalidade, e análise de variância (ANOVA: um critério, teste de Tukey) para os dados que obtiveram variâncias desiguais. Para a quantidade de animais que ovularam dentro do tratamento, foi utilizado o teste binominal: duas proporções. Na caracterização da mudança de fluxo sanguíneo foi aplicado a análise descritiva com o auxílio visual de gráficos. Esses procedimentos foram realizados com o objetivo de avaliar a ocorrência de diferença estatística entre os três grupos e formalizar a caracterização da mudança de fluxo sanguíneo. Os procedimentos de análise foram realizados com o auxílio do programa BioEstat 5.3 (MANUEL AYRES, 2007).

VI - RESULTADOS

No horário de ovulação, após a retirada do dispositivo, houve diferença entre os tratamentos. O Protocolo BED8 foi diferente em relação ao protocolo BED9 e CED8 ($p < 0,01$ entre protocolos BED9 e BED8, e $p < 0,05$ entre protocolos BED8 e CED8), propondo que o BED8 antecipou o horário de ovulação. Considerando os protocolos BED9 e CED8, estes não tiveram diferença significativa entre eles ($p > 0,05$).

No tamanho dos folículos pré-ovulatórios (diâmetro), no momento antecedente à ovulação, não houve diferença entre os três protocolos ($p = 0,0708$).

Na taxa de ovulação houve diferença entre os tratamentos. O protocolo BED8 (52,38%) foi diferente comparado ao protocolo BED9 (80,95%) e CED8 (90,47%) ($p = 0,0495$ entre BED8 e BED9, e $p = 0,0063$ entre BED8 e CED8), já os protocolos BED9 e CED8 foram iguais ($p = 0,3778$), propondo que o protocolo BED8 teve uma menor quantidade de animais que ovularam até o prazo de 90 horas. Os dados estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados do horário de ovulação, tamanho do folículo pré-ovulatório e taxa de ovulação nos três protocolos de IATF do presente trabalho.

	Protocolo BED9	Protocolo BED8	Protocolo CED8
Horário de ovulação (média \pmD.P.)	74,40 \pm 3,04h ^A	64,36 \pm 10,42h ^B	72,00 \pm 6,63h ^A
Tamanho do folículo pré-ovulatório (média \pmD.P.)	12,53 \pm 1,29mm	11,77 \pm 1,54mm	12,77 \pm 1,17mm
Taxa de ovulação	80,95% ^A	52,38% ^B	90,47% ^A

^{A,B} Letras diferem na mesma linha ($p < 0,05$)

Quando comparado a área total ($p = 0,1427$) e a área irrigada ($p = 0,0574$) dos corpos lúteos nos três protocolos, não se observou diferença estatística entre os protocolos. Os dados estão expressos na tabela 2.

Tabela 2. Resultado da área total (cm²) e área irrigada (cm²) dos corpos lúteos avaliados no sétimo dia pós ovulação, nos três protocolos do presente trabalho (média ±D.P.).

	Protocolo BED9	Protocolo BED8	Protocolo CED8
Área Total	2,21±0,41 cm ²	1,82±0,58 cm ²	2,02±0,54 cm ²
Área Irrigada	0,89±0,29 cm ²	0,66±0,19 cm ²	0,83±0,28 cm ²

4.1 - Caracterização da mudança de fluxo sanguíneo folicular

4.1.1 – Protocolo BED9

No protocolo BED9, no qual a principal diferença entre os protocolos foi a administração de benzoato de estradiol 24 horas após a retirada o dispositivo, os animais apresentaram um provável folículo dominante com diâmetro médio de 5,54mm, e 100% destes estavam em irrigação Grau 1 no D4, propondo a já existência da divergência folicular no dia quatro do protocolo. No D6 para o D7 houve uma mudança de fluxo sanguíneo folicular nos animais avaliados, passando de grau 1 para grau 2 e apresentando uma média de diâmetro folicular de 8,24 mm. Já a mudança de fluxo sanguíneo folicular de grau 2 para grau 3 ocorreu em “18 horas” e apresentou uma média de diâmetro folicular de 10,74 mm. O grau 4 ocorreu em “48 horas” e teve média folicular de 12,12 mm, tendo fim em “66 horas” e dando início então nesse momento o grau 5 com média de diâmetro folicular de 12,37mm. Após esse período, os animais que ovularam (80,95%) chegaram a ovulação num prazo máximo de 78 horas com a média de diâmetro folicular de 12,53 mm. Os dados estão expressos no gráfico 1.

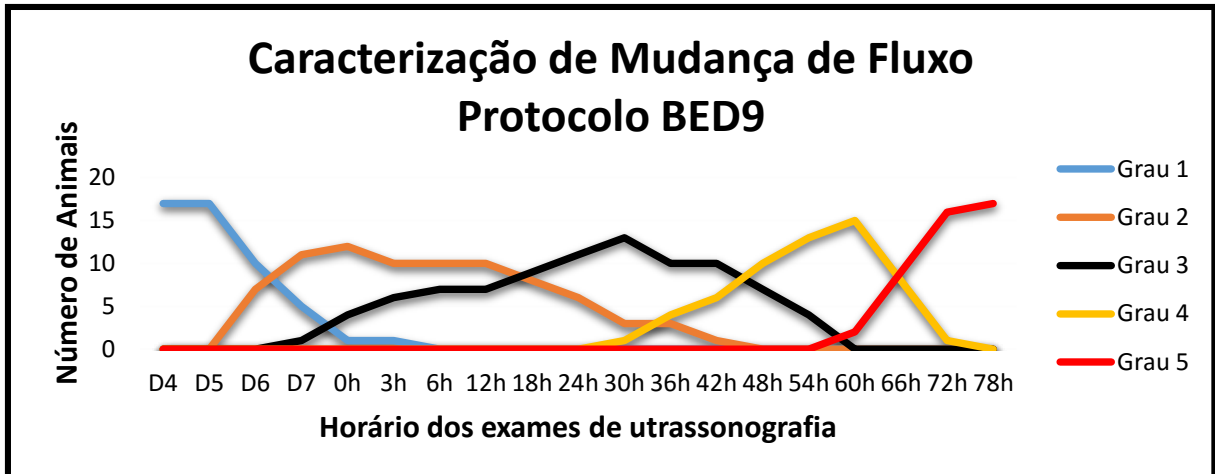


Gráfico 1. Caracterização da mudança de fluxo sanguíneo no protocolo BED9, segundo a quantidade de folículos em cada grau correspondido.

Quando comparado a taxa de crescimento do diâmetro folicular com o aumento do grau de circulação, foi observado que o diâmetro folicular tem um crescimento cada vez mais lento conforme vai se aproximando o momento da ovulação e, o grau de circulação tem um aumento inversamente proporcional. No protocolo BED9 o folículo avaliado teve uma taxa de crescimento média diária de 0,85 mm, porém seu crescimento foi maior nos primeiros dias de avaliação. Comparando os momentos em que se observou a mudança no grau de circulação, de D4 para D7 (intervalo de 72 horas) o folículo teve um aumento de 2,70 mm e passou de grau 1 para grau 2. De D7 para “18 horas” (intervalo de 42 horas) o folículo teve um aumento de 2,50 mm e passou de grau 2 para grau 3. De “18 horas” para “48 horas” (intervalo de 30 horas) o folículo teve um aumento de 1,38 mm e passou de grau 3 para grau 4. De “48 horas” para “66 horas” (intervalo de 18 horas) o folículo teve um aumento de 0,25 mm e passou de grau 4 para grau 5. Esses dados confirmam a diminuição dos intervalos de horas conforme há mudança no grau de circulação, nos mostrando um aumento mais acentuado da circulação no período pré-ovulatório. Os dados estão expressos no gráfico 2.

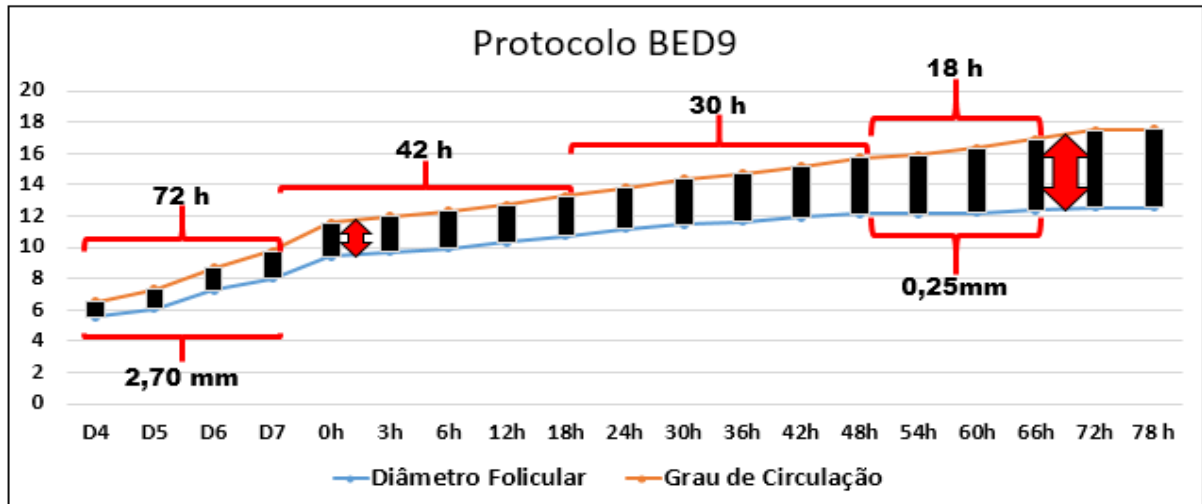


Gráfico 2. Comparação do diâmetro médio folicular com o grau de circulação em todos os momentos de avaliação ultrassonográfica do protocolo BED9.

4.1.2 – Protocolo BED8

No protocolo BED8, onde a principal diferença entre os protocolos é a administração do benzoato de estradiol no momento da retirada do dispositivo, os animais apresentaram um provável folículo dominante com diâmetro médio de 6,02 mm, e 100% destes estavam com irrigação Grau 1 em D4, propondo a já existência da divergência folicular no dia quatro do protocolo. No D6 houve uma mudança de fluxo sanguíneo folicular, passando de Grau 1 para Grau 2 e com uma média de diâmetro folicular de 7,89 mm. Já a mudança de fluxo sanguíneo folicular de grau 2 para grau 3 ocorreu em “3 para 6 horas” com uma média folicular de 9,71 mm. A classificação de grau 3 para grau 4 ocorreu em “36 horas” com média de diâmetro folicular de 11,16 mm, e teve fim em “54 horas” com uma média de 11,68 mm, tendo início então nesse momento os folículos em grau 5. Após esse período, nos animais que ovularam (52,38%), a ovulação ocorreu num horário máximo de 66 horas e uma média de diâmetro folicular de 11,77 mm. Os dados estão expresso no gráfico 3.

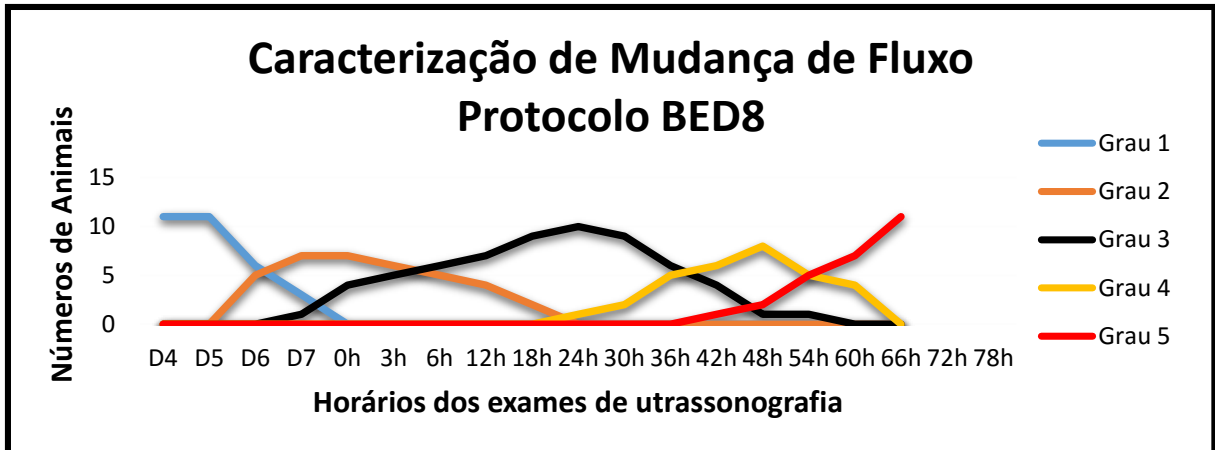


Gráfico 3. Caracterização da mudança de fluxo sanguíneo no protocolo BED8, segundo a quantidade de folículos em cada grau correspondido.

Quando comparado a taxa de crescimento do diâmetro folicular com o aumento do grau de circulação, vimos que o diâmetro folicular também tem um crescimento mais lento conforme vai aumentando o tamanho do folículo e, o grau de circulação tem seu aumento inversamente proporcional. No protocolo BED8 o folículo avaliado teve uma taxa de crescimento média diária de 0,76 mm. Comparando momentos em que se observou as mudanças do grau de circulação, de D4 para D6 (intervalo de 48 horas) o folículo teve um aumento de 1,87 mm e passou de grau 1 para grau 2. De D6 para “6 horas” (intervalo de 30 horas) o folículo teve um aumento de 1,82 mm e passou de grau 2 para grau 3. De “6 horas” para “36 horas” (intervalo de 30 horas) o folículo teve um aumento de 1,45 mm e passou de grau 3 para grau 4. De “36 horas” para “54 horas” (intervalo de 18 horas) o folículo teve um aumento de 0,52 mm e passou de grau 4 para grau 5. Esses dados nos mostram que, embora tivessem um crescimento parecido entre os graus no início do protocolo, o intervalo de horas foi diminuindo, e no final se observou o baixo crescimento folicular juntamente com o aumento da circulação, em um intervalo menor de horas. Os dados estão expresso no gráfico 4.

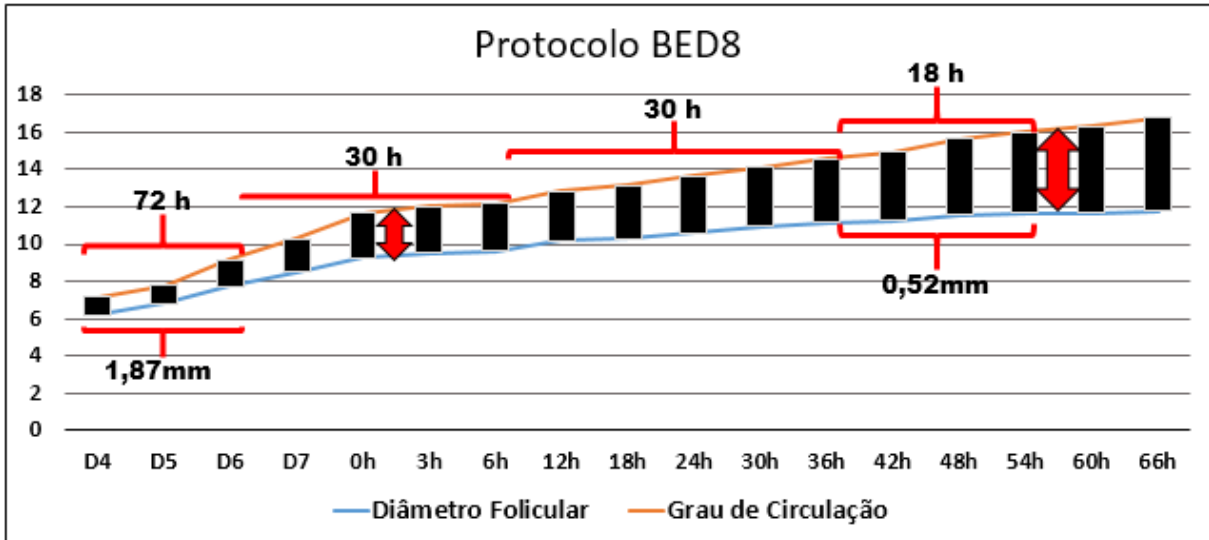


Gráfico 4. Comparação do diâmetro médio folicular com o grau de circulação em todos os momentos de avaliação ultrassonográfica do protocolo BED8.

4.1.3 – Protocolo CED8

No protocolo CED8, onde a principal diferença entre os protocolos é a administração de cipionato de estradiol no momento da retirada do dispositivo, os animais apresentaram um provável folículo dominante com diâmetro médio de 6,11 mm, e 100% destes estavam com irrigação grau 1 em D4, propondo a já existência da divergência folicular no dia quatro do protocolo. No D6 para o D7 houve uma mudança de fluxo sanguíneo folicular, passando de grau 1 para grau 2 e com uma média de diâmetro folicular de 8,32 mm. Já a mudança de fluxo sanguíneo folicular de grau 2 para grau 3 ocorreu em “18 horas” e com média de 10,40 mm. A classificação de grau 3 para grau 4 ocorreu em “42 horas” com média de 12,04 mm e teve fim em “66 horas” com média de 12,70 mm, tendo início então nesse momento a maioria de animais em grau 5. Após esse período, os animais que chegaram a ovulação (90,47%), ovularam num prazo máximo de 78 horas e com uma média de diâmetro folicular de 12,77 mm. Os dados estão expresso no gráfico 5.

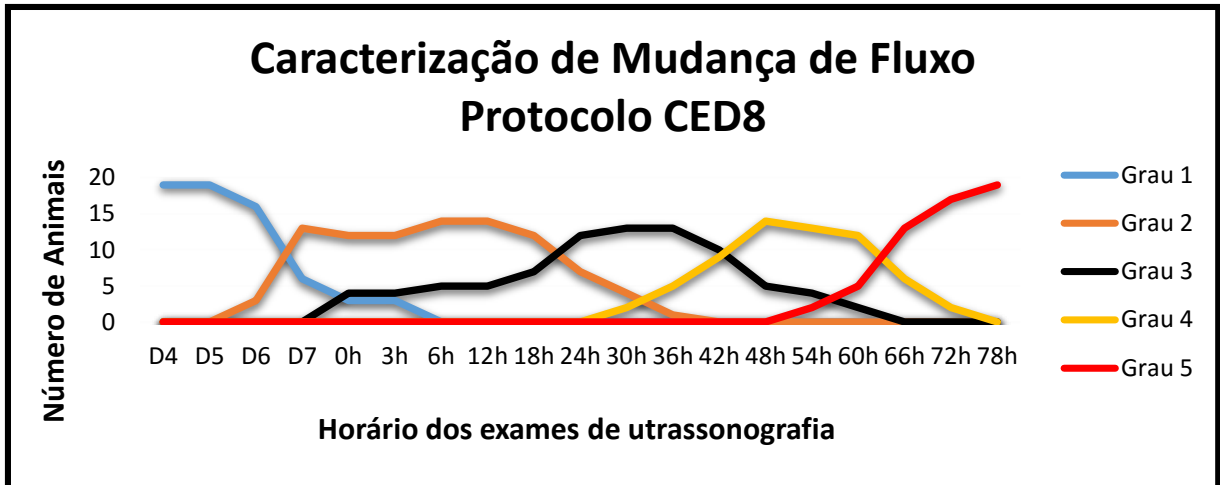


Gráfico 5. Caracterização da mudança de fluxo sanguíneo no protocolo CED8, segundo a quantidade de folículos em cada grau correspondido.

Quando comparado a taxa de crescimento do diâmetro folicular com o aumento do grau de circulação, também observamos uma taxa de crescimento menor do folículo no final do protocolo, e conseqüentemente quando o grau de circulação tem um aumento mais acentuado. No protocolo CED8 o folículo avaliado teve uma taxa de crescimento média diária de 0,83 mm, porém seu crescimento foi maior nos primeiros dias de avaliação. Comparando momentos em que se observou as mudanças do grau de circulação, de D4 para D7 (intervalo de 72 horas) o folículo teve um aumento de 2,21mm e passou de grau 1 para grau 2. De D7 para “18 horas” (intervalo de 42 horas) o folículo teve um aumento de 2,08 mm e passou de grau 2 para grau 3. De “18 horas” para “42 horas” (intervalo de 24 horas) o folículo teve um aumento de 1,64 mm e passou de grau 3 para grau 4. De “42 horas” para “66 horas” (intervalo de 24 horas) o folículo teve um aumento de 0,66 mm e passou de grau 4 para grau 5. Esses dados nos mostram que o diâmetro médio folicular teve um crescimento mais acentuado no começo do protocolo, sendo cada vez menor o intervalo de horas na passagem da classificação dos graus, confirmando um aumento na circulação mais acentuado no período pré-ovulatório. Os dados estão expresso no gráfico 6.

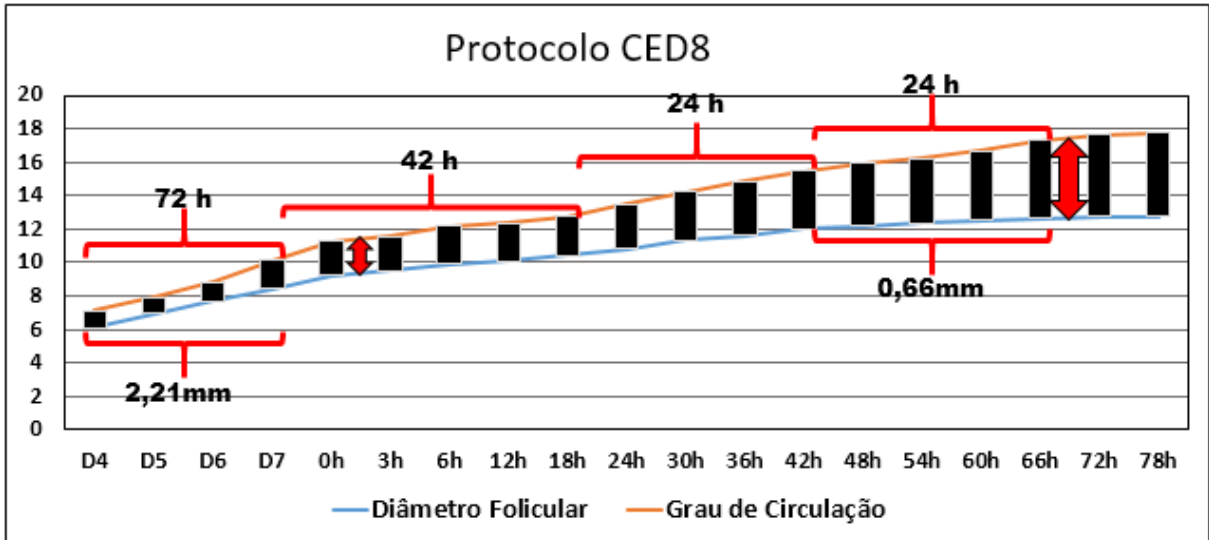


Gráfico 6. Comparação do diâmetro médio folicular com o grau de circulação em todos os momentos de avaliação ultrassonográfica do protocolo CED8.

4.2 – Comparação geral entre os três protocolos.

Quando comparado o diâmetro folicular e o grau de mudança de fluxo sanguíneo folicular individualmente entre os três protocolos, não se observa grandes diferenças visuais, apenas diferenciando no momento de ovulação, que é observado a antecipação no protocolo BED8 quando comparado aos outros dois protocolos, e consequentemente antecipando a mudança de fluxo sanguíneo. Os protocolos BED9 e CED8 são muito semelhantes tanto no diâmetro folicular quanto nos graus de circulação, e isso é confirmado nos dados de horário de ovulação, tamanho do folículo pré-ovulatório e taxa de ovulação, onde são estatisticamente iguais. Nos três protocolos, os folículos pré-ovulatório após atingirem um grau de circulação 5, chegam à ovulação em média 12 horas depois. Isto pode ser observado no gráfico 7.

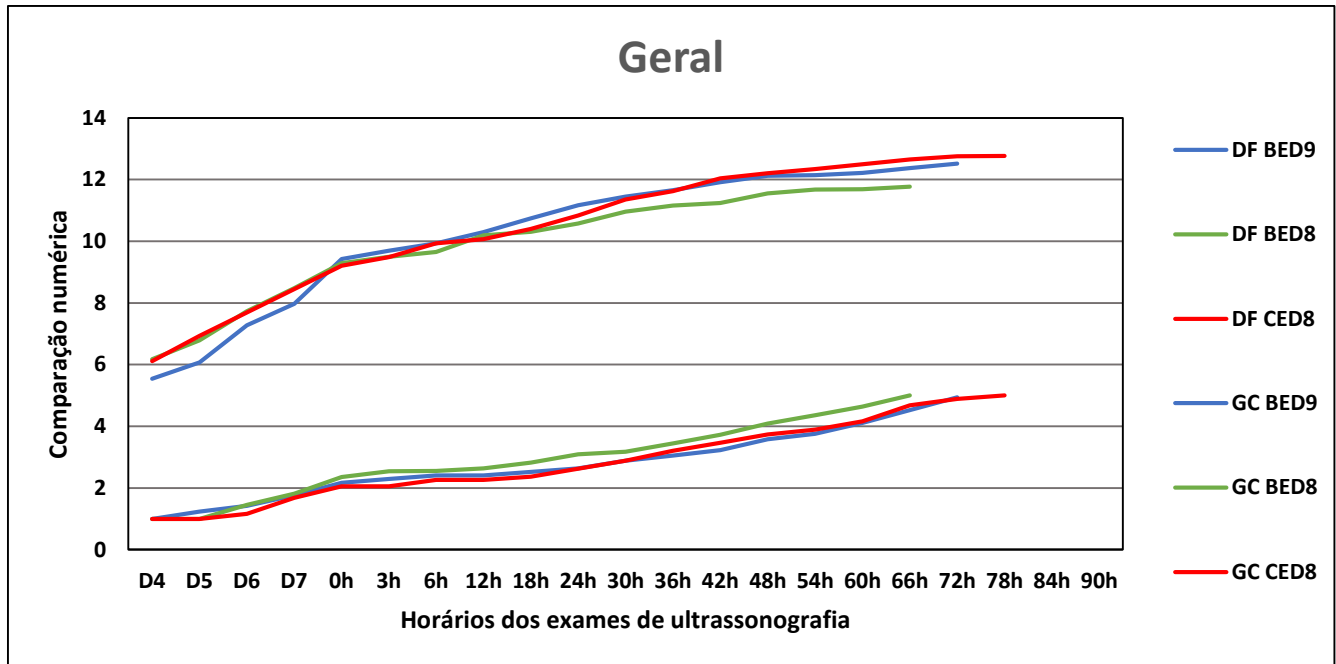


Gráfico 7. Demonstração geral dos protocolos BED9, BED8 e CED8, quanto ao diâmetro folicular e o grau de circulação em todos os momentos de avaliação ultrassonográfica.

V – DISCUSSÃO

O presente trabalho objetivou comparar e caracterizar a perfusão sanguínea do folículo ovulatório no início do seu crescimento à ovulação em 3 protocolos de IATF utilizados a campo. Observou-se que o protocolo BED9 e o protocolo CED8 tiveram em média o mesmo momento de ovulação (74,4 e 72,6 horas, respectivamente), provavelmente pelo fato do BE induzir o pico de LH 18 horas após sua administração (HANLON et al., 1997) e o CE 42 horas após sua administração (AMBROSE et al., 2001). De acordo com CREPALDI et al. (2008) e PERALTA-TORRES et al. (2010), a administração do cipionato de estradiol juntamente com a retirada do dispositivo de progesterona promoveu a ovulação cerca de 72 horas após seu uso, e quando aplicado benzoato de estradiol 24 horas após a retirada do dispositivo também promoveu a ovulação cerca de 72 horas após, resultando em dados semelhantes aos protocolos do presente trabalho. O protocolo BED8 do presente trabalho teve uma antecipação no tempo de ovulação (64,36 horas) comparado aos outros dois protocolos (BED9 e CED8), provavelmente pelo fato de ter administrado o BE 24 horas antes, automaticamente estimulando um pico de LH mais cedo. Esses dados corroboram com AYRES et al. (2008), onde o tratamento com BE em D8 levou os animais a ovularem em média 59,4 horas após a retirada do dispositivo.

Embora não tenha sido observada diferença estatística no momento da ovulação, no presente trabalho, o BED9 teve menor desvio padrão ($DP \pm 3.04h$) comparado ao CED8 ($DP \pm 6.63h$), propondo uma menor variância e, conseqüentemente uma melhor sincronização da ovulação no protocolo BED9. Tal observação condiz com MARTINS et al. (2005), no qual tiveram horário para as ovulações semelhantes entre protocolos com administração do benzoato de estradiol em D9 e cipionato de estradiol em D8, no entanto, classificou o cipionato de estradiol como menos eficiente em sincronizá-las.

Avaliando o diâmetro médio dos folículos pré-ovulatórios do presente trabalho nos protocolos BED9 ($12.53 \pm 1.29mm$), BED8 ($11.77 \pm 1.54mm$) e CED8 ($12.77 \pm 1.17mm$), e não havendo diferença estatística entre eles, pode-se fazer uma consideração importante sobre os mesmos, pois segundo SÁ FILHO et al., (2009); SÁ FILHO et al., (2010), o diâmetro do folículo pré-ovulatório destaca-se como um

importante fator de influência nas taxas de concepção e na eficiência reprodutiva dos programas de sincronização para IATF. RIBEIRO FILHO et al. (2013), trabalhando com fêmeas bovinas da raça Nelore obtiveram uma probabilidade de concepção média estimada em 33,78% para vacas com diâmetro folicular pré-ovulatório de até 11,20 mm, e com diâmetro folicular pré-ovulatório de 13,60 mm obtiveram uma probabilidade de concepção média estimada em 78,83%. Isso indica que o diâmetro do folículo pré-ovulatório está totalmente relacionado com a viabilidade dos ovócitos e taxa de concepção, sendo o fluxo sanguíneo provavelmente um dos responsáveis por tal viabilidade. Único entrave para a escolha dos protocolos está na taxa de ovulação, onde o protocolo BED8 proporcionou uma taxa de ovulação menor comparado aos protocolos BED9 e CED8. Porém, AYRES et al. (2008) não obtiveram diferença na taxa de ovulação entre protocolos com administração do BE em D8 e BE em D9.

A baixa taxa de ovulação no protocolo BED8 do presente trabalho pode ser explicada pelo fato de o benzoato de estradiol ter sido administrado quando os animais (que não chegaram à ovulação) estavam com um diâmetro médio folicular de 8,25 mm, e mesmo com 18 e 24 horas após a administração do BE (no momento do provável pico de LH) os folículos estavam com um diâmetro médio de 8,4 e 9,05 mm, respectivamente, e nesse momento os folículos talvez não tivessem receptores e tamanhos adequados, e conseqüentemente incapacidade ovulatória por serem folículos imaturos (CARVALHO et al., 2008); sendo que os animais que chegaram a ovulação tinham um diâmetro médio folicular de 10,58 mm no provável momento do pico de LH (24 horas após administração do BE). No protocolo BED9 o benzoato de estradiol foi administrado quando os folículos estavam com um diâmetro médio de 11,17 mm, e 24 horas depois (no momento provável do pico de LH) estavam com média de 12,12 mm. Embora no protocolo CED8 a administração do CE tenha sido feita quando os folículos estavam com um diâmetro médio de 9,21 mm, o cipionato de estradiol apresenta uma baixa solubilidade em água, conseqüentemente tendo uma liberação mais lenta no seu local de administração e uma indução do pico de LH mais tardia (COLAZO et al., 2003) e, no presente trabalho, 42 horas após a administração do CE (no momento provável do pico do LH), os folículos estavam com um diâmetro médio folicular de 12,04 mm. De acordo com SARTORI et al. (2001), vacas

Holandesas só alcançam a capacidade ovulatória após atingirem 10mm de diâmetro, e GIMENES et al. (2005) trabalhando com novilhas *Bos indicus* (Nelore e Gir) que foram tratadas com 25 mg de LH quando o folículo dominante atingiu um diâmetro médio de 7,7 mm tiveram uma taxa de ovulação de 33%, enquanto que novilhas da mesma raça, porém estas com diâmetro médio de 10 mm, tiveram uma taxa de ovulação superior a 90%. Isso é explicado pelo fato de que o número de receptores de LH nas células da granulosa em vacas zebuínas aumenta concomitantemente com o aumento do diâmetro folicular (SIMÕES et al., 2012).

ANDRADE et al. (2012) não encontraram diferença estatística comparando o diâmetro do folículo pré-ovulatório em tratamento com CE em D8 e BE em D9, obtendo um diâmetro médio de $13,03 \pm 2,24$ mm para o CE e $12,47 \pm 1,34$ mm para o BE. No presente trabalho o diâmetro médio do folículo pré-ovulatório entre os protocolos BED9 e CED8 foram estatisticamente iguais, no entanto, a escolha pelo protocolo CED8 poderia favorecer na quantidade de manejo necessário, onde esse protocolo necessita de apenas 3 manejos. De acordo com BARUSELLI et al. (2007), o uso de 1mg de cipionato de estradiol juntamente com a retirada do dispositivo de progesterona traz resultados de taxa de concepção semelhantes ao uso de 1mg de benzoato de estradiol 24 horas após a retirada do dispositivo, sem comprometer a eficiência do tratamento e diminuindo a mão-de-obra necessária, consequentemente diminuindo custos.

VASCONCELOS & MENEGHETTI (2006) utilizando o protocolo P4 + estradiol em D0, $PGF_{2\alpha}$ em D7 e E.C.P.[®] em D9 obtiveram uma taxa de sincronização de ovulação próximo a 95%; no protocolo submetido a vacas cíclicas, em que foi introduzido dispositivo de progesterona e administrado 2mg de benzoato de estradiol no dia 0, administração de $PGF_{2\alpha}$ no dia 7, E.C.P.[®] no dia 9 E.C.P.[®] obteve 90,6% de taxa de ovulação. No protocolo CED8 do presente trabalho, foi obtido taxa de ovulação de 90,47%, corroborando os dados da literatura.

Como os resultados do horário de ovulação, o diâmetro do folículo pré-ovulatório e a taxa de ovulação se assemelham com os dados da literatura, isto nos leva a um alto grau de confiança para a caracterização na mudança de fluxo sanguíneo na parede do folículo dominante e posteriormente no folículo pré-ovulatório com o uso da ferramenta Color Doppler. Segundo GINTHER et al., (2007), essa ferramenta oferece

duas abordagens: a exibição do fluxo colorido na imagem, e a análise do doppler pulsado (velocidade do fluxo), sendo a exibição do fluxo colorido na imagem preferível pelo operador do que a mudança de velocidade do fluxo, pois este fornece a visualização do fluxo sanguíneo enquanto a área de interesse está sendo escaneada; e ainda, o fluxo sanguíneo na parede do folículo pode ser classificada ou atribuída pela porcentagem, baseado na proporção estimada de cores na parede do folículo. No presente trabalho optou-se pela abordagem de exibição do fluxo colorido em cima da imagem do modo-B, pois nessa abordagem a avaliação é feita em tempo real e de julgamento subjetivo do operador, que quando adquirido pode ser considerada uma avaliação confiável dos sinais coloridos (GINTHER, 2007), tornando uma técnica facilmente aplicável a campo.

Como se buscou caracterizar a mudança de fluxo sanguíneo no possível folículo dominante e posteriormente no folículo pré-ovulatório, os exames ultrassonográficos foram realizados a partir do dia 4 de todos os protocolos, visto que, segundo GINTHER et al. (2003), cada onda de crescimento 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, e MARTINEZ et al. (2004) afirmaram que a seleção do folículo dominante fica evidente três dias após a emergência. No entanto, quando examinados os folículos em D4, todos os folículos estavam com presença de circulação Grau 1, afirmando os dados de MATSUI & MIYAMOTO (2008), no qual sugeriram que o crescimento folicular, seleção e atresia estão totalmente relacionados com alterações no suprimento sanguíneo folicular individual.

O protocolo BED9 proporcionou um aumento na circulação 18 a 24 horas após a aplicação do benzoato de estradiol, onde os folículos tinham um diâmetro médio de 12,01 mm. O protocolo BED8 também provocou um aumento na circulação 18 a 24 horas após a aplicação do benzoato de estradiol, onde os folículos tinham um diâmetro médio de 10,44 mm. O protocolo CED8 provocou esse aumento 42 a 48 horas após a aplicação do cipionato de estradiol e com um diâmetro médio folicular de 12,12 mm, sendo isso explicado provavelmente pelo fato que o pico de LH é surgido após 18 horas da aplicação do BE (HANLON et al., 1997) e 42 horas após a aplicação de CE (AMBROSE et al., 2001). Essa circulação é aumentada devido ao fato que o estrógeno pode causar uma rápida dilatação dos vasos sanguíneos pela síntese de óxido nítrico

endotelial (eNOS), e esse aumento do suporte sanguíneo na parede do folículo pré-ovulatório é responsável por suprir o folículo com nutrientes, hormônios e outros componentes responsáveis pela ovulação (ACOSTA et al., 2003).

Próximo ao estimado pico de LH, que foi induzido por ésteres de estradiol, independente do protocolo avaliado, o fluxo sanguíneo aumentou na parede do folículo dominante e, nesse mesmo período o diâmetro médio aumentou lentamente, tendo um crescimento médio de aproximadamente 0,5 mm/dia após o provável pico de LH. Isso se deve ao fato que o fluxo sanguíneo na parede do folículo dominante aumenta significativamente próximo ao pico de LH (GINTHER, 2007), e o folículo dominante já está com um tamanho médio próximo do tamanho do folículo a ovular. Isso explica o observado no presente trabalho, onde o crescimento do fluxo sanguíneo na parede do folículo aumenta em um ritmo bem maior, quando comparado com o aumento do diâmetro folicular no período pré-ovulatório, sendo então, a taxa de crescimento do diâmetro folicular inversamente proporcional ao aumento do grau de circulação. Também é observado que, independente do protocolo utilizado, todos os folículos que atingiram circulação Grau 5, chegaram à ovulação em média doze horas após, corroborando com ACOSTA et al. (2003), os quais demonstraram que a vascularização folicular pode ser usada para identificar a saúde dos folículos, tal como prever a proximidade da ovulação.

A avaliação dos corpos lúteos sete dias após a ovulação, teve o objetivo de confirmar o desenvolvimento fisiológico dos mesmos. HERZOG et al., (2010) avaliando o fluxo sanguíneo no desenvolvimento de novos corpos lúteos, confirmou a presença de uma área irrigada média de 0,7cm² sobre o corpo lúteo, juntamente com uma média de 4,0±0,5 ng/ml de P4 no plasma sanguíneo, no dia sete do desenvolvimento de novos corpos lúteos. No presente trabalho a média da área irrigada nos corpos lúteos no dia sete pós ovulação foi de 0,89cm², 0,66cm² e 0,83cm² para os protocolos BED9, BED8 e CED8, respectivamente. A irrigação estabelecida no presente trabalho corrobora com dados de irrigação de corpos lúteos ativos.

Durante a última década a ultrassonografia Doppler se tornou o método utilizado para avaliação do fluxo sanguíneo do trato reprodutivo de mulheres, sendo agora utilizada para avaliação em grandes animais, por exemplo, em pesquisas sobre a avaliação da viabilidade de um folículo pré-ovulatório, irrigação do corpo lúteo para

conhecimento de suas condições e a avaliação da qualidade uterina, levando em consideração a importância da perfusão vascular (GINTHER et al., 2007). Ainda tem-se feito muitas pesquisas visando melhorar os índices de reprodução e caracterizar as mudanças de fluxo sanguíneo do trato reprodutivo, nos levando a um maior conhecimento da fisiologia e estimulando pesquisas nesta área.

VI – CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho, conclui-se que:

O benzoato de estradiol quando administrado juntamente com a retirada do dispositivo de progesterona, este antecipa o tempo de ovulação, porém proporciona uma baixa taxa de ovulação.

O protocolo em que a administração do cipionato de estradiol é realizada juntamente com a retirada do dispositivo de progesterona é semelhante ao protocolo com a administração do benzoato de estradiol 24 horas após a retirada do dispositivo de progesterona no tempo de ovulação, taxa de ovulação, tamanho do folículo pré-ovulatório e na vascularização da parede do folículo.

A vascularização na parede do folículo aumenta com a proximidade do momento da ovulação, sendo mais acentuada após o provável pico de LH. No período pré-ovulatório os folículos adquirem um fluxo sanguíneo intenso, podendo predizer a proximidade da ovulação, possibilitando que o Color Doppler torne-se uma ferramenta de rotina no campo.

VII – REFERÊNCIAS

ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Rebanho Bovino Brasileiro**. São Paulo, 2015. Disponível em: http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp. Acesso em 15 agosto de 2015.

ACOSTA, T. J.; YOSHIKAWA, N.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local Changes in Blood Flow Within the Early and Midcycle Corpus Luteum after Prostaglandin F2a Injection in the Cow. **Biology of Reproduction**, v.66, p.651-658, 2002.

ACOSTA, T.J.; HAYASHI, K.G.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. **Reproduction**, v.125, p.759-767, 2003.

ACOSTA, T.J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal Reproduction**, v.40, p.82-83, 2004.

ALBUQUERQUE, F. T.; FILHO, J. B. B.; VIANA, J. H. M. **Manipulação do ciclo estral em bovinos de corte: bases anatômicas fisiológicas e histológicas da reprodução da fêmea**. Lavras (MG): UFL – Departamento de Medicina Veterinária, 2004.

AMARAL, T.B.; COSTA, F.P.; CORRÊA, E.S. Touros melhoradores ou inseminação artificial: um exercício de avaliação econômica. **Documentos 140 Embrapa/CNPGC**, p.15, 2003.

AMBROSE, D.J.; RAJAMAHENDRAN, R.; KASTELIC, J.P.; SMALL, J.A. Synchronization of ovulation and conception rates in Holstein heifers given an intravaginal progesterone-releasing device (CIDR), and estradiol cypionate, porcine LH or gonadotropin releasing hormone. **Archiv Tierzucht**, v.44, p.77-79, 2001.

ANDRADE, B.H.A.; FERRAZ, P.A.; RODRIGUES, A.S.R.; LOIOLA, M.V.G.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO-FILHO, A.L. Eficiência do cipionato de estradiol e do benzoato de estradiol em protocolos de indução da ovulação sobre a dinâmica ovariana e taxa de concepção de fêmeas nelore inseminadas em diferentes momentos. **Archives of Veterinary Science**, v.17, n.4, p.70-82, 2012.

ASBIA. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. **Estatísticas de evolução de venda de sêmen**, 2003.

ASBIA. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. **Relatório técnico Anual**, 2007. Disponível em: <http://www.asbia.org.br>. Acesso em: 28 ago. 2015.

ASSEY, R.J.; HYTTEL, P.; PURWANTARA, B. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles during the first follicular wave in cattle. **Theriogenology**, v.39, p.183-198, 1993.

AYRES, H.; G.Z. MINGOTI, G.Z. Angiogênese, vascularização e uso do ultrassom Doppler colorido na avaliação de estruturas ovarianas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, p.174-180, 2012.

AYRES, H.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; PENTEADO, L.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Efeito do momento da inseminação e do tratamento com GnRH na IATF sobre a taxa de concepção de vacas de corte lactantes sincronizadas com Norgestomet e Valerato de estradiol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, p.408, 2006.

AYRES, H.; MARTINS, C.M.; FERREIRAB, R.M.; MELLOA, J.E.; DOMINGUEZA, J.H.; SOUZAA, A.H.; VALENTINC, R.; SANTOSC, I.C.C.; BARUSELLI, P.S. Effect of timing of estradiol benzoate administration upon synchronization of ovulation in suckling Nelore cows (*Bos indicus*) treated with a progesterone-releasing intravaginal device. **Animal Reproduction Science**, v.109, p.77–87, 2008.

AYRES, M.; AYRES-JR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém; **Sociedade Civil Mamirauá**: MCT-CNPq, 2007.

BARUSELI, S.P; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S.. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p. 205-211, 2007.

BARUSELLI, P.S. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82/83, p.479-486, 2004.

BARUSELLI, P.S.; AYRES, H.; SOUZA, A.H.; MARTINS, C.M.; GIMENES, L.U.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S. Impacto da iatf na eficiência reprodutiva em bovinos de corte. **Biotecnologia da reprodução em bovinos**. In 2º Simpósio Internacional De Reprodução Animal Aplicada. São Paulo, 2004.

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.

BO, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRÍBULO, R.; TRÍBULO, H.; MAPLETOFT, R.J. The control of follicular wave development for self-pointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 53-72, 2002.

BORSATO, E. A.; LUDWIG JR., H. E.; RUBIN, K. C. P.; SAUT, J. P. E.; BARREIROS, T. R. R.; SENEDA, M. M. Relação entre o tamanho do folículo ovulatório e taxa de concepção em novilhas *Bos taurus* x *Bos indicus* submetidas a inseminação artificial em tempo fixo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.28, n.3, p.137-142, 2004.

BRANNSTROM, M.; ZACKRISSON, U.; HAGSTROM, H.G.; JOSEFSSON, B.; HELLBERG, P.; GRANBERG, S.; COLLINS, W.P.; BOURNE, T. Preovulatory changes of blood flow in different regions of the human follicle. **Fertil Steril**, v.69, p.435-442, 1998.

BURKE, C.R.; CÁRDENAS, H.; MUSSARD, M.L.; DAY, M.L. Histological and steroidogenic changes in dominant ovarian follicles during oestradiol-induced atresia in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.129, p.611-620, 2005.

BURKE, C.R.; DAY, M.L.; BUNT, C.R.; MACMILLAN, K.L. Use of a small dose of estradiol benzoate during diestrus to synchronize development of the ovulatory follicle in cattle. **Journal of Animal Science**, v.78, p.145-151, 2000.

BURKE, C.R.; MUSSARD, M.L.; GRUM, D.E.; DAY, M.L. Effects of maturity of the potential ovulatory follicle on induction of oestrus and ovulation in cattle with oestradiol benzoate. **Animal Reproduction Science**, v. 66, p.161-174, 2001.

CARVALHO, C.F.; CHAMMAS, M.C.; CERRI, G.G. Princípios físicos do Doppler em ultrassonografia. **Ciência Rural**, v.38, p.872-879, 2008.

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

CASTILHO, C.; GARCIA, J.M.; RENESTO, A.; NOGUEIRA, G.P.; BRITO, L.F.C. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.189-96, 2006.

COLAZO, M.G.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R.J. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-

based, fixed-time AL programs in beef heifers. **Theriogenology**, v.60, n.5, p.855-865, 2003.

CREPALDI, G.A.; SALES, J.N.S.; GIROTTO, R.W. et al. Momento da ovulação e taxa de concepção de vacas nelore tratadas com cipionato ou benzoato de estradiol para induzir a ovulação em protocolos de IATF. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, p.464, 2008.

DE SILVA, A.W.M.V.; ANDERSON, G.W.; GWAZDAUSKAS, F.C.; MCGILLIARD, M.L.; LINEWEAVER, J.A. Correlations with estrous behavior and conception in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v.64, p.2409-2418, 1981.

DI SALVO, P.; BOCCI, F.; ZELLI, R.; POLISCA, A. Doppler evaluation of maternal and fetal vessels during normal gestation in the bitch. **Journal of Veterinary Science**, v. 81, p. 382-388, 2006.

EDMONSON, A.J.; LEAN, I.J.; WEAVER, L.D.; FARVER, T.; WEBSTER G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.68-78, 1989.

FERRAZ, J.B.S. Impacto econômico na pecuária de leite e de corte do Brasil, como aumento da utilização da inseminação artificial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.20, p.95-98, 1996.

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.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology Reproduction**, v.50, p.225-232, 1994.

GAYTAN, F.; MORALES, C.; GARCIA-PARDO, L.; REYMUNDO, C.; BELLIDO, C.; SANCHEZ-CRIADO, J.E. A quantitative study of changes in the human corpus luteum microvasculature during the menstrual cycle. **Biology Reproduction**, v.60, p.914–919, 1999.

GIMENES, L. U; SÁ FILHO, M. F.; CARVALHO, N. A. T.; TORRES-JUNIOR, J. R. S.; SOUZA, A. H.; MADUREIRA, E. H.; TRINCA, L. A.; SARTORELLI, E. S.; BARROS, C. M.; CARVALHO, J. B. P.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 852-858, 2008.

GIMENES, L.U.; CARVALHO, N.A.T.; SÁ FILHO, M.F.; SANTIAGO, L.L.; CARVALHO, J.B.P.; MAPLETOFT, R.J.; BARROS, C.M.; BARUSELLI, P.S. Capacidade ovulatória em novilhas *Bos indicus*. **Acta Science Veterinary**, v.33, supl.1 (resumo), p.209, 2005.

GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; MADUREIRA, E.H.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M.; BARUSELLI, P.S. Estudo ultra-sonográfico da divergência folicular em novilhas Nelore (*Bos indicus*). **Acta Science Veterinary**, v.33, supl.1 (resumo), p.210, 2005.

GINTHER, O.J. Follicle Blood Flow. **Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color-Doppler Ultrasonography**. USA: Equiservices Publishing, p. 105-107, 2007.

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, 2003.

GINTHER, O.J.; UTT, M.D. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.24, n.12, 2004.

HANLON, D.W.; WILLIAMSON, N.B.; WICHTEL, J.J. Ovulatory responses and plasma luteinizing hormone concentrations in dairy heifers after treatment with exogenous progesterone and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v.47, n.5, p.963-75, 1997.

HERZOG, K.; BROCKHAN-LUDEMANN, M.; KASKE, M.; BEINDORFF, N.; PAUL, V.; NIEMANN, H.; BOLLWEIN, H. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. **Theriogenology**, v.73, p.691-697, 2010.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística da Produção Pecuária (Junho de 2015). **Indicadores IBGE**, p. 5-45, 2015.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Ciclos reprodutivos: Bovinos e Bubalinos. **Reprodução Animal**. 7.ed. São Paulo: Manole, Cap.11, p.159-171, 2004.

JANSON, P.O.; DAMBER, J.E.; AXEN, C. Luteal blood flow and progesterone secretion in pseudopregnant rabbits. **Reproduction Fertility**, v.63, p.491-497, 1981.

KING, A.M. Development, advances and applications of diagnostic ultrasound in animals. **Veterinary Journal**, v.171, p.408-420, 2006.

KOBAYASHI, S.; BERISHA, B.; AMSELGRUDER, W.M.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Production and localisation of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin F₂ alpha. **Journal Endocrinology**, v.170, p.369-380, 2001.

LANDAETA-HERNÁNDEZ, A.J.; PALOMARES-NAVEDA, R.; SOTO-CASTILLO, G.; ATENCIO A.; CHASE-JR C.C.; CHENOWETH P.J. Social and breed effects on the expression of a PGF₂α induced oestrus in beef cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v.39, p.315-320, 2004.

LUCY, M.C.; THATCHER, W.W.; SAVIO, J.D.; DANET-DESNOYERS, G.; MOSER, M.T.; BADINGA, L.; SIMMEN, F.A.; COLLIER, R.J. Effect of bovine somatotropin on ovarian follicles, corpora lutea, and embryos during early pregnancy in cattle. **Journal of Animal Science**, v-70, p.271 (Abstract), 1992.

MALUF, D.Z. **Avaliação da reutilização de implantes contendo progestágenos para controle farmacológicos do ciclo estral e da ovulação em vacas de corte.** 60 fls. Dissertação (mestrado), Piracicaba, São Paulo, 2002.

MARION, J.C. **Contabilidade da pecuária.** 6. ed. São Paulo: Atlas, p.164, 2001.

MARTÍNEZ, M. F.; BÓ, G. A.; MAPLETOFT, R. J. Synchronization of follicular wave emergence and ovulation for reproductive biotechnologies. **In I Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Londrina,** p. 20-56, 2004.

MARTINEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; ADAMS, G.P.; JANZEN, E.; OLSON, W.; MAPLETOFT, R.J. Alternative methods of synchronizing estrus and ovulation for fixed-time insemination in cattle. **Theriogenology**, v.49 (abstract), p.350, 1998.

MARTÍNEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; BÓ, G.A.; CACCIA, M.; MAPLETOFT R.J. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v.86, p.37-52, 2005.

MARTINS, C.M.; CASTRICINI, E.S.C.; SÁ FILHO, M.F. Dinâmica folicular de vacas nelore tratadas com Cipionato ou Benzoato de estradiol em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.285, 2005.

MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Evaluation of ovarian blood flow by colour Doppler. **The Veterinary Journal**, doi.10.1016, 2008.

MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Evaluation Of Ovarian Blood Flow By Colour Doppler Ultrasound: Practical Use For Reproductive Management In The Cow. **Veterinary Journal**, v.181, p.232-240, 2009.

MATTIOLI, M.; BARBONI, B.; TURRIANI, M.; GALEATI, G.; ZANNONI, A.; CASTELLANI, G.; BERARDINELLI, P.; SCAPOLO, P.A. Follicle activation involves

vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. **Biology of Reproduction**, v.65, p.1014-1019, 2001.

MEMBRIVE, C.M.B. **Estudo da sincronização das ondas foliculares e das características de estros, por radiotelemetria, em novilhas cruzadas (Bos indicus x Bos taurus) tratadas com acetato de melengestrol e prostaglandina associados a hCG, GnRH ou 17 β estradiol + progesterona.** São Paulo, 2000. 156f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

MENEGHETTI, M.; SÁ FILHO, O.G.; PERES, R.F.G.; LAMB, G.C.; VASCONCELOS, J.L.M. Fixed time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cattle: I. Basis for development of protocols. **Theriogenology**, v.72, p.179–189, 2009.

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; HAYASHI, K.G.; KAMADA, D.; AWASHIMA, C.; KANEKO, E.; ACOSTA, T.J.; MATSUI, M. A potential use of color ultrasound as a tool for reproductive management: new observations using color ultrasound scanning that were not possible with imaging only in black and white. **Journal of Reproduction and Development**, v.52, p.153-160, 2006.

MOENTER, S.M; CARATY, A.; KARSCH, J.F. The estradiol - induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. **Endocrinology**, v.127, p.1375-1384, 1990.

MOREIRA, F. R. L; DE LA SOTA, T.; THATCHER, W. W. Effect of day of estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. **Journal Animal Science**. v.78, p.1568–1576, 2002.

MOURA, M.T.; MARQUES, M.O.; BARUSELLI, P.S. Efeito do benzoato de estradiol na sincronização com Crestar e eCG para inseminação artificial em tempo fixo em vacas de corte lactantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p.432-434, 2003.

NISWENDER, G.D.; JUENGEL, J.J.; SILVA, P.J.; ROLLYSON MK & MCINTUSH, E.W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiology Reviews**, v.80, p.1–29, 2000.

OLIVEIRA, M.S.S. **Levantamento Top 100 2015: os 100 maiores produtores de leite do Brasil**. 2015. Disponível em: www.milkpoint.com.br. Acessado em 07 de junho de 2015.

PALHANO, H. B. Produção in vitro de embriões bovinos. **Reprodução em bovinos: Fisiopatologia, Terapêutica, Manejo e Biotecnologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: L.F. Livros, p. 206-224, 2008.

PERALTA-TORRES, J.; LOPEZ, J.A.; CASTRO, F.C. Comparison of estradiol cypionate and estradiol benzoate effects on ovaric activity, estrus and ovulation on anestrus Bos indicus cows. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.9, n.3, p.466-470, 2010.

PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. 2. ed. Belo Horizonte, MG: FEP/MVZ, 480p, 1999.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, v.29, p.21-37, 1988.

PINHEIRO, O.L.; BARROS, C.M.; FIGUEREDO, R.A.; VALLE, E.R.; ENCARNAÇÃO, R.O.; PADOVANI, C.R. Estrous behaviour and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (Bos indicus) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F_{2α} or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v.49, p.667-681, 1998.

REICHENBACH, H.D.; MORAES, J.C.F.; NEVES, J.P. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial em bovinos. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. (Eds.) **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2.ed. São Paulo, Roca, p.57-82, 2008.

REYNOLDS, L.; GRAZUL-BILSKA, A.; REDMER, D. Angiogenesis in the corpus luteum. **Endocrine**, v.12, p.1-9, 2000.

REYNOLDS, L.P. & REDMER, D.A. Growth and development of the corpus luteum. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.54, p.182–192, 1999.

REYNOLDS, P.L.; KILLILEA, S.D.; REDMER, D.A. Angiogenesis in the female reproductive system. **FASEB Journal**, v.6, p.886-992, 1992.

RHODES, F.M.; BURKE, C.R.; CLARK, B.A.; DAY, M.L.; MACMILLAN, K.L. Effect of treatment with progesterone and oestradiol benzoate on ovarian follicular turnover in postpartum anoestrous cows and cows which have resumed oestrous cycles. **Animal Reproduction Science**, v. 69, p.139-150, 2002.

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.

RIBEIRO-FILHO, A.L.; FERRAZ, P.A.; RODRIGUES, A.S.; BITTENCOURT, T.C.B.S.C.; LOIOLA, M.V.G.; CHALHOUN, M. Diâmetro do folículo no momento da inseminação artificial em tempo fixo e taxa de concepção em vacas nelore. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, n.14, 2013.

SÁ FILHO, M. F.; CRESPILO, A. M.; SANTOS, J. E. P.; PERRY, G. A.; BARUSELLI, P. S. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestinbased protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, v.120, p.23-30, 2010.

SÁ FILHO, M. F.; SANTOS, J. E. P.; FERREIRA, R. M.; SALES, J, N. S.; BARUSELLI, P. S. Importance of estrus on pregnancy submitted to estradiol/progesterone- based timed insemination protocols. **Theriogenology**, v. 76, p.455-463, 2011.

SÁ FILHO, O. G.; MENEGHETTI, M.; PERES, R. F. G.; LAMB, G. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v. 72, p. 210-218, 2009.

SALFEN, B.E.; KOJIMA, F.N.; BADER, J.F.; SMITH, M.F.; GARVERICK, H.A. Effect of short-term calf removal at three stages of a follicular wave on fate of a dominant follicle in postpartum beef cows. **Journal of Animal Science**, v.79, p.2688-2697, 2001.

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 Reproduction**, v.65, p.1403-1409, 2001.

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

SCHMIDT, M. Perinatal death associated with ET, IVP and cloning in cattle. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.49, p.25-27, 2007.

SILVA, A.S.; SILVA, E.V.C.; NOGUEIRA, E.; ZÚCCARI, C.E.S.N. Avaliação do custo/benefício da inseminação artificial convencional e em tempo fixo de fêmeas bovinas pluríparas de corte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.443-455, 2007.

SIMÕES, R. A. L.; SATRAPA, R.A.; ROSA, F.S.; PIAGENTINI, M.; CASTILHO, A.C.S.; ERENO, R.L.; TRINCA, L.A.; NOGUEIRA, M.F.G.; BURATINI-JR, J, BARROS, C.M.

Ovulation rate and its relationship with follicle diameter and gene expression of the LH receptor (LHR) in Nelore cows. **Theriogenology**, v. 77, n.1, p.139-147, 2012.

STOCK, L.A. Sistemas de produção e sua representatividade na produção de leite no Brasil. In: Reunião da Associação Latino-americana de Produção Animal, Cuzco. **Anais, ALPA**. p.17-18, 2008.

THUNDATHIL, J.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R.J. The effect of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular development and ovulation in dairy cattle. **Journal of Veterinary Research**, v.62, p.314-316, 1998.

VAN VLIET, J.H.; VAN EERDENBURG, F.J.C.M.; Sexual activities and oestrus detection in lactating Holstein cows. **Applied Animal Behaviour Science**, v.50, p.57-69, 1996.

VASCONCELOS, J.L.M. & MENEGHETTI, M. Sincronização de ovulação como estratégia para aumentar a eficiência reprodutiva de fêmeas bovinas, em larga escala. **V simpósio de produção de gado de corte**, p.529-541, 2006.

WATSON, E.D.; HEALD, M.; TSIGOS, A.; LEASK, R.; STEELE, M.; GROOME, N.P.; RILEY, S.C. Plasma FSH, inhibin A, and inhibin isoforms containing pro- and dC during winter anestrus, spring transition, and the breeding season in mares. **Reproduction**, v.123, p.535–542, 2002.

WHITE, F.J.; WETTEMANN, R.P.; LOOPER, M.L.; PRADO, T.M.; MORGAN, G.L. Seasonal effects on estrous behavior and time of ovulation in non-lactating beef cows. **Journal Animal Science**, v.80, p.3053-3059, 2002.

WILTBANK, J.N.; STURGES, J.C.; WIDEMAN, D.; LEFEVER, D.G.; FAULKNER, L.D. Control of estrus and ovulation using subcutaneous implants and estrogens in beef cattle. **Journal Animal Science**, v.33, p.600-606, 1971.

WILTBANK, M.C.; DYSKO, R.C.; GALLAGHER, K.P.; KEYES, P.L. Relationship between blood flow and steroidogenesis in the rabbit corpus luteum. **Journal Reproduction Fertility**, v.84, p.513–520, 1988.