



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARACTERIZAÇÃO DA PERFUSÃO SANGUÍNEA DO FOLÍCULO PRÉ-
OVULATÓRIO EM PROTOCOLOS DE IATF**

FERNANDA BESERRA DE ALMEIDA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA/ DF
MARÇO DE 2019**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARACTERIZAÇÃO DA PERFUSÃO SANGUÍNEA DO FOLÍCULO PRÉ-
OVULATÓRIO EM PROTOCOLOS DE IATF**

FERNANDA BESERRA DE ALMEIDA

ORIENTADORA: MARGOT ALVES NUNES DODE

CO-ORIENTADORA: BIANCA DAMIANI MARQUES SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO 211/2019

**BRASÍLIA/DF
MARÇO DE 2019**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

Almeida, F. B. **Caracterização da perfusão sanguínea do folículo pré-ovulatório em protocolos de IATF.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2019, 81p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente pra fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Almeida. Fernanda Beserra, **Caracterização da perfusão sanguínea do folículo pré-ovulatório em protocolos de IATF.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2019, 81p. Dissertação de Mestrado. (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2019.

1. Ultrassonografia Doppler. 2. Protocolos hormonais. 3. Prenhez. 4. bovino.

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARACTERIZAÇÃO DA PERFUSÃO SANGUÍNEA DO FOLÍCULO PRÉ-OVULATÓRIO
EM PROTOCOLOS DE IATF**

FERNANDA BESERRA DE ALMEIDA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
ANIMAIS.**

APROVADA POR:

**MARGOT ALVES NUNES DODE, DOUTORA (EMBRAPA RECURSOS
GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA) (ORIENTADORA)**

IVO PIVATO, DOUTOR (UnB) (EXAMINADOR INTERNO)

**MARILIA VIVIANE SNEL DE OLIVEIRA, DOUTORA (UPIS) (EXAMINADOR
EXTERNO)**

BRASÍLIA/DF, 11 de março de 2019.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que me guiou em direção a minha vocação. Aos meus pais João Batista e Dartinélia por terem se doado e aceitaram viver comigo o meu sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus principal autor da minha história por nunca ter me deixado desistir.

Agradeço aos meus pais Dartinélia de Cassia e João Batista que sempre acreditaram no meu potencial e me incentivaram a prosseguir.

Ao meu irmão que mesmo longe sempre me apoiou e também embarcou no meu sonho.

Ao meu namorado Marcos Tomaz pela força, compreensão, companheirismo, por sempre ter acreditado em mim.

A toda a minha família e amigos que estiveram ao meu lado, me incentivando, me ajudando, dando palpites sempre acreditando em mim.

À minha orientadora, Dra. Margot, por ter me dado a oportunidade de fazer parte da equipe e pela confiança.

À minha co-orientadora Dra. Bianca Damiani Marques Silva, pela confiança, paciência que teve comigo. Por não ter medido esforços em me ajudar. A sua filha Júlia a qual tenho um grande carinho, minha ajudante mirim. Meus sinceros agradecimentos!

As amigas que construí ao longo dessa caminhada, Otávio, Áurea, Taynan, Fabrício, Eder, Felipe, Luzia, Murilo, por terem me ajudado durante os experimentos, pela troca de experiências, pela paciência que tiveram comigo, pelos bons momentos de convivência.

Aos pesquisadores e funcionários do Campo experimental fazenda Sucupira, que nunca mediram esforços quando precisei de ajuda. Obrigada pelo carinho e atenção!

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela disponibilidade de toda sua estrutura para realização dos trabalhos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais da Universidade de

Brasília, pela oportunidade de realização do Mestrado.

Ao Médico Veterinário Roger, por ter me ajudado a conseguir os animais para que eu pudesse concluir o meu mestrado, pela disposição, pela paciência e pela troca de experiências. Aos proprietários das fazendas Grande e Vale do Ouro, senhor Carlito Fernandes e Welson Diniz por terem confiado no meu trabalho e aberto a porta de suas propriedades para que eu pudesse realizar o meu experimento e pela paciência que tiveram comigo.

Obrigada a todos que de alguma forma me ajudaram, que acreditaram em mim. A todos os meus sinceros agradecimentos!

ÍNDICE

	PÁGINAS
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	xvi
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 OBJETIVOS	4
1.1.1 Objetivo Geral	4
1.1.2 Objetivos Específicos	4
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 FISIOLOGIA DO CICLO ESTRAL	5
2.2 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEPO FIXO	7
2.3 INDUTORES DE OVULAÇÃO	9
2.4 FUNÇÕES DA PROSTAGLANDINA NA OVULAÇÃO	10
2.5 HEMODINÂMICA FOLICULAR	12
2.6 ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER	13
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
CAPÍTULO 2. PROSTAGLANDINA F2α COMO INDUTOR DE OVULAÇÃO NA IATF EM VACAS ZEBU	23
RESUMO	24
ABSTRACT	26
1 INTRODUÇÃO	28
2 MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1 Local e amostra	30
2.2 Delineamento experimental	31
2.3 Ultrassonografia e avaliação do fluxo sanguíneo	31
2.4 Detecção do pico de LH	32
2.5 Análise estatística	33
3 RESULTADOS	34

4 DISCUSSÃO	38
5 CONCLUSÃO	42
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
CAPÍTULO 3. PERFUSÃO SANGUÍNEA DO FOLÍCULO PRÉ-OVULATÓRIO NO MOMENTO DA IATF	47
RESUMO	48
ABSTRACT	50
1 INTRODUÇÃO	52
2 MATERIAL E MÉTODOS	54
2.1 Local e amostra	54
2.1.1 Fazenda Grande	54
2.1.2 Fazenda Vale do Ouro	54
2.2 Delineamento experimental	55
2.3 Ultrassonografia e avaliação do fluxo sanguíneo	55
2.4 Análise estatística	56
3 RESULTADOS	57
4 DISCUSSÃO	59
5 CONCLUSÃO	62
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
CAPÍTULO 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS/ CONCLUSÕES	65

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DA PERFUSÃO SANGUÍNEA DO FOLÍCULO PRÉ- OVULATÓRIO EM PROTOCOLOS DE IATF

Fernanda Beserra de Almeida¹, Bianca Damiani Marques Silva², Margot Alves Nunes Dode²
¹Médica Veterinária, Brasília-DF, Brasil, ²Pesquisadora, Brasília-DF, Brasil

O objetivo do primeiro trabalho foi avaliar o uso da PGF2 α em protocolos de IATF como indutor de ovulação, caracterizando a perfusão sanguínea folicular. Vinte e duas vacas zebuínas foram divididas aleatoriamente em 3 protocolos de sincronização do estro, num modelo *crossover*. O Grupo PGF2 α -D7, teve o estro sincronizado recebendo no dia (D) 0 um dispositivo intravaginal contendo um 1g de P4 associado a 2,0 mg IM de BE., sendo que a P4 permaneceu até D8, e em D7 e D8 os animais receberam 500 μ g IM de PGF2 α . Grupo PGF2 α -D9: no D0 os animais receberam um dispositivo intravaginal contendo um 1g de P4 associado a 2,0 mg IM de BE. No D8 os implantes foram retirados e, no D8 e no D9 os animais receberam 500 μ g IM de PGF2 α . Grupo CONTROLE (CT): no D0 os animais receberam um dispositivo intravaginal contendo um 1g de P4 associado a 2,0 mg de BE IM, no D8 foram retirados os implantes e os animais receberam 500 μ g IM de PGF2 α e, no D9 foi aplicado 1mg de BE. Esses animais foram avaliados com ultrassom Doppler durante o desenvolvimento folicular e na avaliação luteal. Para essa avaliação foi adotada uma classificação subjetiva de Grau 1 a 5, que considerou a porcentagem de circulação na parede da estrutura avaliada. O grupo CT (72,4 \pm 3,7h) ovulou antecipadamente (P<0,05) quando comparado aos outros dois tratamentos (PGF2 α -D7 96 \pm 12,8 e PGF2 α -D9 90 \pm 18,2h). O tamanho do folículo pré-ovulatório também diferiu nos protocolos sendo maior (P<0,05) no

grupo PGF2 α -D7 (13,07 \pm 1,6) do que no grupo CT (11,96 \pm 1,5mm). Na avaliação da concentração de LH o grupo CT teve diferença no momento -36 horas, com aumento de sua concentração no sangue em relação aos demais grupos. Estes resultados sugerem que a PGF2 α tem potencial como indutor de ovulação em protocolos de IATF, embora haja um aumento no intervalo entre sua aplicação e a ovulação. O objetivo do segundo trabalho foi avaliar a relação entre o grau de irrigação do folículo pré-ovulatório no momento da IATF e a taxa de prenhez. Foram utilizadas 209 vacas nelores que no momento da inseminação foram avaliadas quanto ao tamanho do folículo e seu grau de irrigação. Os folículos foram avaliados por ultrassonografia transretal usando o ultrassom bidimensional com Doppler colorido. Para a avaliação da A circulação sanguínea foi utilizado o mesmo procedimento do experimento 1. Trinta dias após a inseminação artificial o diagnóstico de gestação foi realizado. Quando a taxa de prenhez foi avaliada considerando a irrigação os animais que apresentaram grau 4 (60 a 80% de fluxo sanguíneo na parede do folículo) apresentaram maior taxa de gestação (72,5%) do que os Grau 1, (43,9%); Grau 2, (38,9%) Grau 3 (57,7%) e Grau 5 (60%). A taxa de prenhez total foi 54,6%, diferente (P<0,05) da taxa dos animais do grupo grau 4 (72,5%). Pode-se concluir que há influência da irrigação na taxa de prenhez.

Palavras chave: Ultrassonografia Doppler, protocolos hormonais, Prenhez, bovino.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF BLOOD PERFUSION OF PRE-OVULATING FOLICLE IN FTAI PROTOCOLS

Fernanda Beserra de Almeida¹, Bianca Damiani Marques Silva², Margot Alves Nunes Dode²
¹Veterinary, Brasília-DF, Brazil, ²Researcher, Brasília-DF, Brazil,

The objective of the first study was to evaluate the use of PGF2 α in IATF protocols as an inducer of ovulation, characterizing follicular blood perfusion. Twenty-two zebu cows were randomly divided into three estrus synchronization protocols in a crossover model. The PGF2 α -D7 group had the estrus synchronized receiving on day (D0) an intravaginal device containing 1g of P4 associated with 2.0 mg of BE. P4 remained until D8, and in D7 and D8 the animals received 500 μ g IM of PGF2 α . PGF2 α -D9 group: in the D0 animals received an intravaginal device containing 1g of P4 associated with 2.0 mg IM of BE. In D8 implants were removed and in D8 and D9 the animals received 500 μ g IM of PGF2 α . Control group (CT): in the D0 the animals received an intravaginal device containing a 1g of P4 associated to 2.0 mg of IM, in the D8 the implants were removed and the animals received 500 μ g IM of PGF2 α and in D9 1mg was applied of BE. These animals were evaluated with Doppler ultrasound during follicular development and at the luteal evaluation. For this evaluation a subjective classification of Grade 1 to 5 was adopted, which considered the percentage of circulation in the wall of the evaluated structure. The CT group (72.4 ± 3.7 h) ovulated in advance ($P < 0.05$) when compared to the other two treatments (PGF2 α -D7 96 ± 12.8 and PGF2 α -D9 90 ± 18.2 h). The preovulatory follicle size also differed in the protocols being greater ($P < 0.05$) in the PGF2 α -D7 group (13.07 ± 1.6) than in the CT group (11.96 ± 1.5 mm). In the evaluation of the LH concentration, the CT group had a difference at the moment -36 hours, with an increase in their blood concentration in relation to the other

groups. These results suggest that PGF2 α has potential as an ovulation inducer in IATF, although there is an increase in the interval between its application and ovulation. The objective of the second study was to evaluate the relationship between the degree of irrigation of the preovulatory follicle at the time of TAI and the pregnancy rate. A total of 209 nellore cows were used at the time of insemination and were evaluated for the size of the follicle and its degree of irrigation. The follicles were evaluated by transrectal ultrasonography using two-dimensional color Doppler ultrasound. For the evaluation of blood circulation the same procedure was used as in experiment 1. Thirty days after artificial insemination the diagnosis of gestation was performed. When the pregnancy rate was evaluated considering the irrigation the animals that presented grade 4 (60 to 80% of blood flow in the wall of the follicle) had a higher gestation rate (72.5%) than the Grade 1, (43.9 %); Grade 2, (38.9%) Grade 3 (57.7%) and Grade 5 (60%). The total pregnancy rate was 54.6%, different ($P < 0.05$) from the animals in the grade 4 group (72.5%). It can be concluded that there is influence of irrigation on the pregnancy rate.

Keywords: Doppler ultrasound, hormonal protocols, pregnancy, bovine.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Capítulo 2	23
Figura 2.1 Alteração do fluxo sanguíneo na parede do folículo pré-ovulatório. Quanto mais se aproxima o momento da ovulação mais intenso se torna a vascularização, sendo considerado grau 1 de 0 a 20%, 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% de detecção de fluxo sanguíneo na parede do folículo	32
Figura 2.2 Caracterização da mudança de fluxo sanguíneo no grupo Controle de acordo com o horário dos exames ultrassonográficos.	35
Figura 2.3 Caracterização da mudança de fluxo sanguíneo no grupo PGF2 α -D7 de acordo com o horário dos exames ultrassonográficos.	35
Figura 2.4 Caracterização da mudança de fluxo sanguíneo no grupo PGF2 α -D9 de acordo com o horário dos exames ultrassonográficos.	36
Figura 2.5 Distribuição e porcentagem das vacas que ovularam após a retirada do implante intravaginal de progesterona nos grupos PGF2 α -D7, PGF2 α -D9 e CONTROLE.	36
Figura 2.6 Concentrações séricas de LH nas horas que antecedem a ovulação nos grupos PGF2 α - D7, PGF2 α -D9 e CONTROLE.	37
Capítulo 3	47
Figura 3.1 Alteração do fluxo sanguíneo na parede do folículo pré-ovulatório. Quanto mais se aproxima o momento da ovulação mais intenso se torna a vascularização, sendo considerado grau 1 de 0 o 20%, 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% de detecção de fluxo sanguíneo na parede do folículo.	56

LISTA DE TABELAS

	Página
Capítulo 2	23
Tabela 2.1 Resultados referentes ao horário de ovulação, tamanho do folículo pré- ovulatório, taxa de ovulação e grau de irrigação no momento da ovulação em diferentes protocolos de IATF.	34
Tabela 2.2 Resultados referentes ao diâmetro do CL e o grau de irrigação nos diferentes protocolos de IATF.	37
Capítulo 3	47
Tabela 3.1 Resultados referentes a comparação entre o grau de irrigação, diâmetro dos folículos pré-ovulatórios no momento da IATF e suas respectivas taxas de prenhez.	57
Tabela 3.2 Média do diâmetro do folículo dominante no momento da IATF independente do grau de irrigação.	58

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

BE = Benzoato de estradiol

CE = Cipionato de estradiol

CL = Corpo lúteo

CT = Controle

D = Dia

DP = Desvio padrão

eCG = Gonadotrofina coriônica equina

ECP = Cipionato de estradiol

EM = Estação de monta

EMBRAPA = Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FSH = Hormônio folículo estimulante

GnRH = Hormônio liberador de gonadotrofina

IA = Inseminação artificial

IATF = Inseminação artificial em tempo fixo

LH = Hormônio luteinizante

P4 = Progesterona

PGE = Prostaglandina E

PGF2 α = Prostaglandina F2 α

PIB = Produto interno bruto

IM = Intramuscular

β = Beta

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2016) com aproximadamente 218 milhões de cabeças, o Brasil tem o maior rebanho comercial do mundo. As raças zebuínas (*Bos indicus*) compõe cerca de 80% do rebanho, na qual o Nelore se destaca com 90% dessa parcela (ABIEC, 2016).

Na tentativa de melhorar a produtividade do rebanho nacional, inúmeras biotécnicas reprodutivas estão se destacando, dentre elas a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) a qual visa inseminar os animais em um tempo predeterminado, de modo a facilitar o manejo, diminuir mão de obra e concentrar as atividades, principalmente no que diz respeito a gado de corte em que a estação de monta (EM) é utilizada como o principal método de manejo (Cunha et al., 2013). Por esses motivos, a IATF cresceu significativamente no Brasil nos últimos anos.

Para realizar IATF é necessário ter gastos com hormônios, sêmen de qualidade, adoção de instrumentos (bainhas de inseminação, botijão de nitrogênio, aplicador de sêmen e descongelador de sêmen) e mão de obra qualificada para que esses animais sejam inseminados em um curto espaço de tempo. Entretanto, nem sempre os resultados são imediatos e satisfatórios, principalmente quando comparados à monta natural (prenhes/inseminação artificial variam de 40 a 60%) (Pfeifer et al., 2014), o que limita a implantação dessa biotecnologia pelo produtor. Um estudo realizado por Silva et al. (2007), demonstrou que para a IATF e a inseminação artificial (IA), houve um custo total de US\$1.310,31 e US\$952,91, respectivamente, uma diferença de 37,42% (US\$357,40). O item de maior contribuição para essa diferença foi material de consumo, 142,21% mais caro na

IATF, devido ao custo dos fármacos utilizados, fato este também observado por Amaral et al. (2003).

Apenas 12% das matrizes em idade reprodutiva são de fato inseminadas no Brasil. Diante dessa situação, novas estratégias para aumentar o uso da IATF, diminuindo seu impacto econômico, as dificuldades operacionais para sua execução e que tenha uma elevada eficiência reprodutiva, devem ser incorporados no sistema produtivo nacional (Baruselli, 2016).

Existe uma série de tratamentos hormonais que permitem a sincronização do estro e a indução da ovulação, eliminando a detecção de estro e determinando o horário da inseminação artificial (Baruselli et al., 2002; Bó et al., 2003). Vários hormônios são utilizados para indução e sincronização da ovulação, sendo que os mais utilizados são os ésteres de estradiol devido ao seu menor custo e boa eficiência (Meneghetti et al., 2009). No entanto desde 2008, o uso de estradiol - 17β foi extinto da comunidade europeia por ser considerado um carcinógeno completo (Diretiva 2008/97/CE).

O sucesso da IATF depende da sincronização da IA com o horário da ovulação, vários estudos têm sido realizados para determinar o melhor momento para inseminar e obter melhores taxas de concepção. Uma forma de determinar o momento mais adequado para inseminar é fazendo o acompanhamento da hemodinâmica folicular utilizando a ferramenta Doppler, pois sabe-se que há maiores taxas de prenhes se a inseminação é realizada próxima a ovulação e que o pico máximo de perfusão do folículo precede à ovulação (Meneghetti et al., 2009).

Diante do que foi exposto a hipótese desse estudo é que a circulação sanguínea do folículo pré-ovulatório influencia o momento da ovulação e a taxa de prenhez.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar as características do folículo pré-ovulatório em protocolos de IATF.

1.1.2 Objetivos Específicos

- 1) Avaliar o diâmetro folicular e o grau de perfusão sanguínea do folículo em protocolos de IATF.
- 2) Avaliar a substituição do benzoato de estradiol pela $PGF2\alpha$ como indutor de ovulação em protocolos de IATF.
- 3) Avaliar o grau de perfusão sanguínea do folículo pré-ovulatório no momento da inseminação artificial.
- 4) Avaliar se há influência da irrigação no folículo pré-ovulatório, no momento da IATF, na taxa de prenhez.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fisiologia do ciclo estral

Vários estudos vêm sendo realizados na tentativa de aperfeiçoar as biotecnologias reprodutivas. No entanto para se alcançar resultados satisfatórios é necessário ter um melhor conhecimento da fisiologia reprodutiva das fêmeas bovinas (Santos et al., 2012).

O ciclo estral em bovinos tem uma duração média de 21 dias sendo definido como o intervalo transcorrido entre dois estros, no qual ocorre uma série de alterações hormonais, morfológicas e comportamentais (Albuquerque et al., 2004; Jainudeen & Hafez, 2004). Compreende quatro fases: proestro e estro (fases foliculares) e metaestro e diestro (fases lúteas). O proestro é a fase onde ocorre o crescimento folicular. O estro ou cio é caracterizado como dia zero do ciclo estral no qual a fêmea apresenta sinais de receptividade sexual com duração média de 12 a 18 horas. O metaestro é a fase onde ocorre a ovulação e é caracterizado pelo desenvolvimento do corpo lúteo (CL) e o diestro é a fase de plena atividade do corpo lúteo (Cunningham, 2008; Valle, 1991).

Fêmeas *Bos taurus indicus* geralmente apresentam um estro de duração mais curto (aproximadamente 10 horas) quando comparado a fêmeas *Bos taurus taurus* (aproximadamente 18 horas) (Bó et al., 2003), sendo que mais de 50% desses animais iniciam a manifestação de estro no período noturno (entre 18:00 e 6:00), o que dificulta o manejo na detecção do estro e a execução de algumas biotécnicas (Galina et al., 1996; Pinheiro et al., 1998; Membrive, 2000).

A fisiologia reprodutiva desses animais é complexa e depende da perfeita interação entre o sistema nervoso central, sistema endócrino e órgãos reprodutivos.

O hipotálamo possui núcleos responsáveis pela secreção de hormônios reguladores de gonadotrofinas (GnRH) os quais são liberados de forma pulsátil. Estes se ligam aos receptores da hipófise induzindo a síntese e liberação dos hormônios folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH). (Moraes et al., 2002; Jainudeen & Hafez, 2004). A forma como são liberados esses dois hormônios é distinta. O LH é secretado de forma pulsátil e o FSH é secretado de maneira constitutiva, ou seja, a maior parte do hormônio é liberada na mesma velocidade em que é produzida (Moraes et al., 2002). O FSH secretado pelo lobo anterior da hipófise promove 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. Já o LH induz a maturação e a ovulação dos folículos, produção de andrógenos pela teca interna e luteinização tanto da teca interna quanto da granulosa e posterior desenvolvimento e manutenção do corpo lúteo (Grunert & Gregory, 1989, Palhano, 2008).

Durante o ciclo estral, o crescimento dos folículos ovarianos, em bovinos, ocorre em um padrão denominado ondas de crescimento folicular. A dinâmica folicular em vacas e novilhas da raça Nelore foi caracterizada por duas ou três ondas foliculares (Figueiredo et al., 1997). Cada onda de crescimento folicular caracteriza-se por haver 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). Essas ondas foliculares são precedidas ou acompanhadas de um ligeiro aumento nas concentrações de FSH. Dos folículos recrutados apenas um continua o seu desenvolvimento (folículo dominante) enquanto os outros sofrem decréscimo de tamanho (folículos subordinados) (Lucy et al., 1992). O folículo dominante de cada onda tem a capacidade de induzir a atresia dos demais folículos em desenvolvimento e, bloquear o surgimento de uma nova onda folicular devido a sua capacidade de controlar a liberação de FSH através da secreção de inibina. O folículo dominante também adquire receptores de LH, que lhe permitem continuar a crescer em um ambiente com baixos níveis de FSH e com níveis crescentes de LH (Pierson & Ginther, 1988; Sávio et al., 1988; Assey et al., 1994). O folículo da fase de dominância só chegará à ovulação na segunda ou terceira onda de crescimento, devido a regressão do corpo lúteo e conseqüentemente a diminuição do nível plasmático de progesterona. E, com a produção contínua de 17- β estradiol e inibina, ocorre o pico LH e a ovulação (Palhano, 2008). 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 segundo Silveira et al. (2014) o diâmetro médio de folículos pré-ovulatórios foi de 12,4 mm.

Na ovulação há liberação do ovócito do folículo dominante e o corpo lúteo se forma a partir da parede do folículo. Sua principal função é a secreção de progesterona que prepara o útero para provável início e manutenção da gestação. Corpos lúteos de zebuínos variam de 17 a 21 mm de diâmetro em seu tamanho máximo (Rhodes et al., 1995; Figueiredo et al., 1997). Caso não haja fecundação e sinalização embrionária, cerca de 14 dias pós ovulação ocorre a liberação de prostaglandina (PGF2 α) pelo útero que leva a regressão do corpo lúteo. Aos 21 dias quando inicia o próximo ciclo o corpo lúteo já está afuncional e continua regredindo até sua ausência ou formação cicatricial (Cunningham & Klein, 2008).

2.2 Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF)

A inseminação artificial (IA) foi a primeira biotecnologia reprodutiva empregada no melhoramento genético animal no Brasil (Severo, 2015). A IA possui diversas vantagens como a padronização do rebanho, organização do trabalho na fazenda, menor custo com reposição de touros, entre outros. Todavia, sua principal vantagem está diretamente ligada ao processo de melhoramento genético e à obtenção de animais com maior potencial de produção e reprodução (Baruselli et al., 2004). Apesar dos avanços dos programas de IA, a implantação desses programas é dificultada principalmente pelo anestro pós-parto e pelas falhas na detecção de estro (Bó et al., 2007). Quando se trata de raças zebuínas essas dificuldades são agravadas, pois apresentam elevada incidência de estros noturnos e de curta duração (Bó et al., 2003).

Com a evolução e a demanda dessa técnica em grande escala, os problemas como detecção de estro e principalmente a necessidade de mão de obra em tempo integral fizeram com que pesquisadores buscassem 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 (IATF), que por meio da utilização de hormônios controla o crescimento das ondas foliculares, regula a função lútea e momento da ovulação (Wiltbank et al., 1971; Martinez et al., 1998, Ribeiro et al., 2009) levando a um aumento na eficiência reprodutiva, redução do intervalo entre partos e concentração de bezerros em épocas do ano estratégicas (Maluf, 2002). O uso desta biotécnica tem aumentado no Brasil em decorrência das facilidades de sua realização no campo e da obtenção de resultados cada vez mais compensadores (Araújo, 2009).

Grande parte dos protocolos de IATF consiste basicamente na introdução de um dispositivo intravaginal impregnado com progesterona e BE para induzir a emergência de uma nova onda folicular, análogos de $PGF2\alpha$ para induzir luteólise e um indutor de ovulação podendo ser um éster de estradiol (benzoato ou cipionato) ou um análogo de GnRH.

Análogos de progesterona (P4) mimetizam a fase luteal do ciclo estral. Os progestágenos exógenos suprimem a liberação do LH endógeno, inibindo dessa forma o crescimento dos folículos dependentes desse hormônio. Com a retirada do implante de progesterona ocorre um padrão secretório de LH com alta frequência e baixa amplitude, característico da fase folicular. Desse modo é permitido que o folículo cresça aumentando a produção de estradiol, podendo ocorrer o pico de LH e conseqüentemente ocorrer a ovulação (Savio et al., 1993).

O estradiol e seus ésteres possuem a função de indução de uma nova onda de crescimento folicular e sincronização da ovulação, visto que na ausência de P4 a administração de estrógeno pode provocar a liberação de GNRH/LH fazendo com que ocorra a ovulação do folículo dominante (Moenter et al., 1990). No início do protocolo a utilização de BE junto com o dispositivo de progesterona resultam em boas taxas de sincronização da ovulação e de gestação (Bó et al., 2003) devido a sincronização de uma nova onda de crescimento folicular (Martinez et al., 2000). A emergência dessa nova onda de crescimento folicular se dá provavelmente devido a supressão temporária do FSH e/ou do LH fazendo com que o folículo dominante (FD) que esteja presente entre em atresia, iniciando uma nova onda folicular (Diskin et al., 2002). O estradiol é pouco utilizado em certos países por ser considerado um agente cancerígeno, porém é bastante utilizado em países da América do Sul, como o Brasil e a Argentina, devido ao seu menor custo quando comparado aos análogos de GnRH. Barros et al. (2000), compararam o uso do GnRH e benzoato de estradiol após a retirada do dispositivo em vacas nelores em um estudo de sincronização da ovulação e não encontraram diferença na eficiência da sincronização.

A função da $PGF2\alpha$ e seus análogos no momento da retirada do implante de progesterona é baixar drasticamente os níveis séricos de P4 através da luteólise. A administração de $PGF2\alpha$ causa a regressão do corpo lúteo com 5 ou mais dias de existência ocorrendo uma queda brusca nas concentrações séricas de P4 a níveis basais, permitindo o aumento na frequência de pulsos de LH, aumentando dessa forma a produção de estradiol pelo folículo dominante levando o animal a entrar no cio e posteriormente ovular (Diskin et al., 2002).

Este protocolo padrão e suas modificações fornecem uma fertilidade satisfatória ($\pm 50\%$) nos rebanhos comerciais, independente da raça (*Bos tauros*, *Bos indicus* ou cruzamento entre elas) (Baruselli et al., 2004; Colazo et al., 1999; Martínez et al., 2002; Meneghetti et al., 2009; Pfeifer et al., 2009, 2014).

2.3 Indutores de ovulação

Os indutores de ovulação utilizados no Brasil atualmente para sincronização da ovulação e IATF são os análogos de GnRH, o estradiol 17 β e os ésteres de estradiol (Benzoato, Valerato e Cipionato de estradiol). Porém os mais utilizados são os ésteres de estradiol devido ao seu menor custo e boa eficiência (Meneghetti et al., 2009; Moenter et al., 1990).

Sabe-se que os ésteres de estradiol possuem farmacocinéticas diferentes, possuem meia vida distintas tendo que levar em consideração o momento de sua aplicação (Moenter et al., 1990). Quando o benzoato de estradiol é aplicado 24 a 30 horas após a remoção do dispositivo de progesterona o pico de LH ocorre em média 21,5 horas após sua administração (Lammoglia et al., 1998). No entanto quando se utiliza cipionato de estradiol no momento da retirada do implante, o pico de LH ocorre aproximadamente 45 horas após a remoção (Sales et al., 2007). O CE possui baixa solubilidade em água e como consequência uma liberação mais lenta do local de administração prolongando sua atividade biológica em comparação com o benzoato de estradiol (Vinckier et al., 1990). Além da antecipação do pico de LH, devido as diferenças na farmacocinética dos ésteres de estradiol há uma maior liberação de LH e menor duração nos animais tratados com benzoato de estradiol (Sales et al., 2012).

Sabendo-se disso alguns trabalhos na tentativa de reduzir o número de manejo dos animais no curral sem prejudicar a fertilidade em programas de IATF compararam o uso de CE no momento da retirada do implante e o uso de BE 24 horas após a retirada do implante. Meneghetti et al. (2009) não observaram diferença na taxa de prenhez entre vacas tratadas com BE (50,8%) 24 horas após a remoção do implante de progesterona ou CE (51,9%) no momento da retirada do implante. Sales et al. (2012) utilizando vacas da raça Nelore também não encontraram diferença estatística na taxa de ovulação no grupo BE (77,8%) e no grupo CE (82,8%), assim como na taxa de prenhes BE (57,5%) e CE (61,8%),

chegando a conclusão de que reduzindo um manejo, aplicando CE no momento da retirada do implante, não prejudica a fertilidade do rebanho sendo uma característica desejável para aumentar a adoção e a disseminação dos programas de IATF.

Porém o comitê científico “Veterinary Measures relating to Public Health” (SCVPH) de 30 de abril de 1999, demonstrou que existe um conjunto de provas que consideram o 17β estradiol um cancerígeno total, que tem por efeito estimular o aparecimento e o crescimento de tumores principalmente relacionados a câncer de mama em humanos, demonstrando os riscos potenciais para a saúde humana decorrentes dos resíduos hormonais presentes na carne e nos produtos à base de carne bovina. Devido as essas consequências alguns países decretaram a proibição total da utilização do estradiol 17β e seus ésteres nos animais destinados a produção de alimentos (Diretiva 2008/97/CE).

Nesse contexto é necessário que se busque alternativas cada vez mais sustentáveis, de baixo custo e sem poder residual que possam ser utilizados como indutores de ovulação em protocolos garantindo uma melhor segurança dos alimentos e da saúde humana.

2.4 Funções das prostaglandinas na ovulação

As prostaglandinas fazem parte de um grupo chamado eicosanóides, derivados do metabolismo do ácido araquidônico. Estas têm sua síntese desencadeada por estímulos nas membranas celulares após estímulos fisiológicos, farmacológicos ou patológicos exercendo ação imediata de forma parácrina ou autócrina (Narumiya et al., 1999; Hata & Breyer, 2004; Weems et al., 2006).

As prostaglandinas endógenas exercem diversas funções em vários tecidos e células, sendo sua ação mais típica relacionada ao relaxamento e contração da musculatura lisa em diversos órgãos (Fernandes & Figueiredo, 2007; Narumiya et al., 1999). Com relação as funções reprodutivas as prostaglandinas estão envolvidas na ovulação, fecundação, implantação, maturação ovocitária, desenvolvimento embrionário, contratilidade miometral, parto, abortamento, modulação da defesa uterina, entre outros (Barreta et al., 2008; Duffy, 2015; Espey, 1994; Gurevich et al., 1993; Lewis, 2004; Liu & Sirois, 1998; Liu et al., 1997; Murdoch et al., 1993). Porém a propriedade terapêutica mais utilizada é a capacidade de algumas prostaglandinas da série F provocarem luteólise (Tsai & Wiltbank, 1997) causando regressão morfológica e funcional do corpo lúteo. Com essa descoberta foi possível manipular

o ciclo estral pela redução da fase luteal (Kotwica et al., 2002; Viana et al., 1999). O corpo lúteo é responsivo a ação luteolítica da $PGF2\alpha$ e/ou seus análogos entre os dias 5 e 17 do ciclo estral, sabendo-se dessa propriedade a $PGF2\alpha$ tem sido largamente utilizada na sincronização de estro em bovinos (Larson & Ball, 1992; Odde, 1990). Porém quando não associada aos progestágenos o cio não se manifesta de forma sincronizada com manifestações de estro podendo ocorrer em um período de até 5 dias. Assim a maioria dos protocolos utilizados para sincronização de cio e IATF associa análogos de $PGF2\alpha$ a outros fármacos como a progesterona exógena, GnRH, eCG, LH e análogos de estradiol (Castro, 2015; Pfeifer et al., 2009; Weems et al., 2006).

Tanto em bovinos quanto em outras espécies de mamíferos a prostaglandina está associada ao processo de ovulação (Algire et al., 1992; De Silva; Reeves, 1985; Killick & Elstein, 1987; Leonardi et al., 2012; Mikuni et al., 1998; Murdoch et al., 1986; Pfeifer et al., 2009, 2014; Priddy et al., 1990). As prostaglandinas E2 e $F2\alpha$ começam a aumentar seus níveis no início do processo de ovulação atingindo níveis máximos no momento da ovulação (Duffy & Stouffer, 2001; Liu et al., 1997; Sirois et al., 1992), sendo mediadoras de vários eventos periovulatórios (Murdoch & Hansen; Mcpherson, 1993). Além disso, elas parecem desenvolver um papel crucial na ruptura folicular (Pfeifer et al., 2014). Pfeifer et al. (2009, 2014) e Leonardi et al. (2012) demonstraram em seus estudos que a PGF está diretamente ligada ao processo ovulatório em novilhas e vacas, atuando por um mecanismo independente da luteólise. Porém o mecanismo pelo qual a PGF atua ainda não está totalmente esclarecido. Diversas linhas de estudos tem buscado compreender como ocorre a indução da ovulação através das prostaglandinas (Fortune et al., 2009; Murdoch et al., 1993; Naor et al., 2007; Randel et al., 1996).

Além do efeito local no ovário a prostaglandina parece ter um efeito central (eixo hipotalâmico gonadal). A primeira hipótese que surgiu seria que a prostaglandina poderia estar envolvida no processo de liberação do GnRH (Zor et al., 1970). Logo após, alguns estudos correlacionaram a administração de PGF ao aumento da liberação de LH em camundongos (Ratner et al., 1974), vacas pós parto (Randel et al., 1988, 1996) e touros (Kiser et al., 1976). Além disso a $PGF2\alpha$ quando utilizada em protocolos de sincronização da ovulação pode potencializar os efeitos da progesterona exógena no hipotálamo após sua retirada (Pfeifer et al., 2009) aumentando a capacidade de resposta da hipófise ao GnRH (Randel et al., 1996), induzindo a ovulação (Murdoch et al., 1993; Weems et al., 2006). Foi sugerido também que a $PGF2\alpha$ exerce um efeito direto na hipófise anterior aumentando sua capacidade de resposta resultando em uma maior liberação de LH (Randel et al., 1996).

Porém é controverso o efeito da prostaglandina sobre a secreção do LH, pois embora a sua administração cause ovulação em vacas e ovelhas em anestro (Cruz et al., 1997; Davies et al., 2006) sua relação com aumento de LH só foi associado em vacas. Diante de tais informações pode-se considerar que a ovulação induzida pela prostaglandina pode ter um efeito tanto na sensibilização dos receptores de GnRH na hipófise quanto por ação direta nas células dos folículos pré-ovulatórios (Pfeifer et al., 2009). Pfeifer et al. (2014) demonstraram que análogos de prostaglandina podem ser usados para induzir ovulação de forma sincronizada em novilhas. Foi demonstrado também que a prostaglandina possui efeito semelhante aos indutores de ovulação convencionalmente utilizados (BE e CE) em protocolos de IATF resultando em taxas de gestação satisfatórias (50%).

2.5 Hemodinâmica folicular

Em bovinos, o desenvolvimento folicular tem início com a ativação do folículo primordial, que passa a ser primário e depois secundário, compreendendo a fase pré-antral. Depois passa a folículo terciário e pré-ovulatório que compreende a fase antral, culminando com ovulação ou atresia. Os folículos pré-antrais não possuem suprimento vascular próprio, porém recebem nutrientes e oxigênio por difusão passiva dos vasos sanguíneos do estroma ovariano. No entanto para que esses folículos possam crescer além dessa fase é necessário a formação de uma rede individual capilar em torno de cada folículo. É indispensável a neovascularização para o crescimento de folículos antrais, dominância e desenvolvimento pré-ovulatório (Robinson et al., 2009; Araújo et al., 2011). Dessa forma, o aporte sanguíneo dos folículos dominantes é maior do que a dos folículos subordinados e a taxa de diminuição do folículo subordinado se dá mais tardiamente do que a diminuição da vascularização (Acosta et al., 2003).

A secreção do pico de LH faz com que ocorra complexas alterações estruturais e funcionais no folículo maduro, as quais estão estreitamente associadas ao aumento de fluxo sanguíneo na parede do folículo pré-ovulatório (Acosta et al., 2003). Acosta & Miyamoto (2004) observaram que o primeiro aumento detectável na concentração de estradiol plasmático coincide com o aumento da vascularização do folículo maduro. Dessa forma parece haver uma íntima relação entre diâmetro folicular, concentração de estradiol no fluido folicular e área vascular (Mattioli et al., 2001).

Acosta et al. (2003) demonstraram uma clara diferença na vascularização na parede de folículos pré-ovulatórios em comparação com folículos anovulatórios, este último possuindo uma atividade proliferativa menor e uma menor perfusão sanguínea.

2.6 Ultrassonografia Doppler

O ultrassom Color Doppler é uma ferramenta associada à ultrassonografia convencional que fornece informações sobre a arquitetura vascular e os aspectos hemodinâmicos dos vasos em tempo real, 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). Esta técnica foi descrita por Christian Johann Doppler em 1842, na qual uma fonte de ondas (sonoras ou eletromagnéticas), que está em movimento em relação a um receptor, altera a frequência de onda durante este processo, aumentando a frequência durante a aproximação da fonte e diminuindo durante o seu distanciamento (Loupas & Gill, 1995; King, 2006).

Diferentemente da ultrassonografia bidimensional em escala de cinza que exibe a informação de interfaces teciduais, o ultrassom Doppler é otimizado para exibir informação sobre fluxo, permitindo a avaliação hemodinâmica por meio da análise do som emitido, das ondas espectrais de velocidade e do mapeamento colorido. Dessa forma pode-se observar que existem vários modos de exibição, sendo eles Doppler contínuo, Doppler pulsado, Doppler colorido e Doppler de amplitude (Viecelli et al., 2008).

O ultrassom color doppler é uma técnica não invasiva e útil na avaliação da função vascular ovariana, por permitir a observação do fluxo sanguíneo em uma área delimitada como na parede de folículos pré-ovulatórios dentro do corpo lúteo e no útero (Matsui & Miyamoto, 2009).

O ciclo estral de mamíferos domésticos é marcado por alterações hemodinâmicas envolvidas na remodelação do tecido ovariano cíclico, as quais ocorrem durante a última onda de crescimento folicular, ovulação e desenvolvimento do corpo lúteo. Uma extensa formação vascular (angiogênese) e diferenciação das células (luteinização) ocorrem na parede folicular entre o pico de LH e início do desenvolvimento do corpo lúteo. Dessa forma o Doppler colorido pode ser utilizado para auxiliar na investigação da

vascularização do folículo antes e durante o seu desvio, bem como no processo de ovulação (Ayres & Mingoti, 2012).

Scalante et al. (2015), em seu experimento com vacas da raça Nelore submetidas a diferentes protocolos de IATF, concluíram que, os folículos pré-ovulatórios ovularam em média 12 h após atingirem grau máximo de vascularização. Além disso, foi possível visualizar que o fluxo sanguíneo na parede do folículo aumenta em um ritmo bem maior do que o aumento do diâmetro folicular no período pré-ovulatório, sendo mais confiável avaliar a vascularização folicular do que o diâmetro do folículo, para determinar o momento mais próximo da ovulação.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Perfil da Pecuária Anual. **Relatório Anual 2016**, 2016.

ACOSTA, T. J. et al. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. **Society for Reproduction and Fertility**, v. 125, n. 5, 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.

ALGIRE, J. E.; SRIKANDAKUMAR, A.; GUILBAULT, L. A.; DOWNEY, B. R. Preovulatory changes in follicular prostaglandins and their role in ovulation in cattle. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 56, p. 67–69, 1992.

AMARAL, T. B.; COSTA, F. P.; CORRÊA, E. S. **Touros Melhoradores ou Inseminação Artificial: um exercício de Avaliação Econômica**. 2003.

ARAUJO, R. R. et al. Role of follicular estradiol-17beta in timing of luteolysis in heifers1. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 2, p. 426–437, 2009.

ARAÚJO, V. R. et al. Importance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in ovarian physiology of mammals. **Zygote**, v. 21, n. 3, p. 295–304, 2011.

ASSEY, R. J. et al. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, n. 3, p. 335–344, 1994.

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.

BARRETA, M. H. et al. Evidence that the effect of angiotensin II on bovine oocyte nuclear maturation is mediated by prostaglandins E2 and F2. **Reproduction**, v. 136, n. 6, p. 733–740, 1 dez. 2008.

BARROS, C.M. et al. Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using GnRH, PGF2 α and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 53, p.1121-1134, 2000.

BARUSELLI, P. S. et al. 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.; MARQUES, M.O.; CARVALHO, N.A.T.; MADUREIRA, E.H.; CAMPOS FILHO, E.P. Effect of different treatments for timed artificial insemination on the reproductive efficiency in lactating beef cows. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.26, p. 218-221, 2002.

BARUSELLI, P. S. IATF supera dez milhões de procedimentos e amplia o mercado de trabalho. **Revista CFMV**, v.69, p. 57–60, 2016.

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.

BÓ, G. et al. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. **Reproduction in Domestic Ruminants**, v. 6, n. 1, p. 223–236, 2007.

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

CASTRO, N.A. **Prostaglandina F2 α como indutor de ovulação em bovinos e bubalinos criados no bioma Amazônia**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Rondônia, 63p. Porto Velho, 2015.

COLAZO, M. G. et al. Fixed-Time artificial insemination in beef cattle using CIDR-B devices, progesterone and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 404 Abstr, 1999.

COMUNIDADE EUROPEIA. Diretiva 2008/97/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 19 de novembro de 2008 que altera a Diretiva 96/22/CE do Conselho relativa à proibição de utilização de certas substâncias com efeitos hormonais ou tireostáticos e de substâncias β -agonistas em produção animal. **Jornal Oficial da União Europeia**, L:318/9, 2008.

CRUZ, L. C.; DO VALLE, E. R.; KESLER, D. J. Effect of prostaglandin F2 alpha-and gonadotropin releasing hormone-induced luteinizing hormone releases on ovulation and corpus luteum function of beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 49, n. 2–3, p. 135–42, 5 Des 1997.

CUNHA, R. R. et al. Inseminação artificial em tempo fixo em primíparas nelore lactantes acíclicas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 4, p. 1041–1048, 2013.

- CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 3 ed. Guanabara Koogan, p.386-431, 2008.
- CUNNINGHAM, J.G.; KLEIN, B.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 720p, 2008.
- DAVIES, K. L. et al. Does injection of prostaglandin F_{2a} (PGF_{2a}) cause ovulation in anestrous Western White Face ewes ? **Theriogenology**, v. 66, p. 251–259, 2006.
- DE SILVA, M.; REEVES, J. J. Indomethacin inhibition of ovulation in the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 75, n. 2, p. 547–9, 1985.
- DISKIN, M.G.;AUSTIN, E.J.; ROCHE, J.F. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.211-228, 2002.
- DUFFY, D. M.; STOUFFER, R. L. The ovulatory gonadotrophin surge stimulates cyclooxygenase expression and prostaglandin production by the monkey follicle. **Molecular Human Reproduction**, v. 7, n. 8, p. 731–9, 2001.
- DUFFY, D. M. Novel contraceptive targets to inhibit ovulation: The prostaglandin E₂ pathway. **Human Reproduction Update**, v. 21, n. 5, p. 652–670, 2015.
- ESPEY, L. L. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 2, p. 233–238, 1994.
- FERNANDES, A. C. F.; FIGUEIREDO, A. C. S. Avanços na utilização de prostaglandinas na reprodução de bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.3, p.406-414, 2007.
- FIGUEIREDO, R. A et al. Ovarian follicular dynamics in Nelore Breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, 1489-1505, 1997.
- FILHO, O. G. S. et al. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 210–218, 2009.
- FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 2, p. 225–232, 1994.
- FORTUNE, J. E. et al. The periovulatory period in cattle: progesterone, prostaglandins, oxytocin and ADAMTS proteases. **Animal Reproduction / Colegio Brasileiro de Reproducao Animal**, v. 6, n. 1, p. 60–71, 2009.
- GALINA, C. S.; ORIHUELA, A.; RUBIO, I. Behavioural trends affecting oestrus detection in Zebu cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1–4, p. 465–470, 1996.
- GINTHER, O. J. et al. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3–4, 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, p. 516–526, 2004.

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

GRUNERT, E.; GREGORY, R. M. **Diagnostico e terapêutica da infertilidade na vaca**. 2a ed. Porto Alegre: Editora Sulina, p. 174, 1989.

GUREVICH, M. et al. Prostaglandin production by the oocyte cumulus complex around the time of fertilization and the effect of prostaglandin E on the development of the early bovine embryo. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, n. 3, p. 281, 1993.

HATA, A. N.; BREYER, R. M. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: Multiple roles in inflammation and immune modulation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 103, n. 2, p. 147–166, ago. 2004.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Efetivos e produção pecuária. **Produção da Pecuária Municipal**, v.44, p. 7-12, 2016.

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.

KISER, T. E.; HAFS, H. D.; OXENDER, W. D. Increased blood LH and testosterone after administration of prostaglandin F_{2α} in bulls. **Prostaglandins**, v. 11, n. 3, p. 545–553, 1 Mrt 1976.

KILLICK, S.; ELSTEIN, M. Pharmacologic production of luteinized unruptured follicles by prostaglandin synthetase inhibitors. **Fertility and Sterility**, v. 47, n. 5, p. 773–777, 1987.

KING, A. M. Development, advances and applications of diagnostic ultrasound in animals. **Veterinary Journal**, v. 171, n. 3, p. 408–420, 2006.

KOTWICA, J.; BOGACKI, M.; REKAWIECKI, R. Neural regulation of the bovine corpus luteum. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1–2, p. 299–308, 2002.

LAMMOGLIA, M. A. et al. Induced and Synchronized Estrus in Cattle: Dose Titration of Estradiol Benzoate in Peripubertal Heifers and Postpartum Cows after Treatment with an Intravaginal Progesterone-Releasing Insert and Prostaglandin F_{2α}. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 6, p. 1662–1670, 1998.

LARSON, L. L.; BALL, P. J. H. Regulation of estrous cycles in dairy cattle: A review. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 255–267, 1992.

LEONARDI, C. E. P. et al. Prostaglandin F_{2α} promotes ovulation in prepubertal heifers. **Theriogenology**, v. 78, n. 7, p. 1578–1582, 2012.

LEWIS, G. S. Steroidal regulation of uterine immune defenses. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, n. 2004, p. 281–294, 2004.

LIU, J.; SIROIS, J. Follicle size-dependent induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 6, p. 1527–1532, 1998.

LIU, J. et al. Prostaglandin G/H synthase-2 is expressed in bovine preovulatory follicles after the endogenous surge of luteinizing hormone. **Biology of reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1524–31, 1997.

LOUPAS, T & GILL, R.W. Principles of colour Doppler. In: Transvaginal colour Doppler: The Scientific basis and practical application of colour Doppler in gynaecology. **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, p. 1- 11, 1995.

LUCY, M. C. et al. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3615–3626, 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.

MARTINEZ, M.F. et al. Alternative methods of synchronizing estrus and ovulation for fixed-time insemination in cattle. **Theriogenology**, v.49 (abstract), p.350, 1998.

MARTINEZ, M.F. et al. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. **Theriogenology**, v.54, p.757-769, 2000.

MARTÍNEZ, M. F. et al. The use of progestins in regimens for fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1049–1059, 2002.

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, n. 3, p. 232–240, 2009.

MATTIOLI, M. et al. Follicle Activation Involves Vascular Endothelial Growth Factor Production and Increased Blood Vessel Extension1. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 4, 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 17b 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.

MIKUNI, M. et al. The selective prostaglandin endoperoxide synthase-2 inhibitor, NS-398, reduces prostaglandin production and ovulation in vivo and in vitro in the rat. **Biology Reproduction**, v. 59, n. 5, p. 1077–1083, 1998.

MIYAMOTO, A. et al. 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, n. 1, p. 153–160, 2006.

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

MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H.; GONSALVES, P. B. D. **Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos**. In: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotecnicas aplicadas a Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, cap. 3, p. 25-55, 2002.

MURDOCH, W. J. et al. Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. **Biology of Reproduction**, v. 35, n. 5, p. 1187–94, 1986.

MURDOCH, W.J.; HANSEN, T.R.; MCPHERSON, L.A. A review – role of eicosanoids in vertebrate ovulation. **Prostaglandins**, v. 46, p. 85–115, 1993.

NAOR, Z. et al. Reciprocal cross talk between gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and prostaglandin receptors regulates GnRH receptor expression and differential gonadotropin secretion. **Molecular Endocrinology**, v. 21, p. 524–537, 2007.

NARUMIYA, S.; SUGIMOTO, Y.; USHIKUBI, F. Prostanoid Receptors: Structures, Properties, and Functions. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 4, p. 1193–1226, 10 jan. 1999.

ODDE, K. G. Synchronization of Estrus in Cattle: A Review. **Veterinary World**, v. 68, p. 136, 2011.

PALHANO, H.B. **Reprodução em bovinos-fisiopatologia, terapêutica, manejo e biotecnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: LF Livros, p.181-224, 2008.

PFEIFER, L. F. M. et al. Effects of exogenous progesterone and cloprostenol on ovarian follicular development and first ovulation in prepubertal heifers. **Theriogenology**, v. 72, n. 8, p. 1054–1064, 2009.

PFEIFER, L. F. M. et al. The use of PGF 2α as ovulatory stimulus for timed artificial insemination in cattle. **Theriogenology**, v. 81, n. 5, p. 689–695, 2014.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, v. 29, n. 1, p. 21–37, 1988.

PINHEIRO, O. L. et al. Estrous behavior 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, n. 3, p. 667–681, 1998.

PRIDDY, A. R. et al. The Effect of Prostaglandin Synthetase Inhibitors on Human Preovulatory Follicular Fluid Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Concentrations. **The endocrine Society**, v. 71, n. 1, p. 235–242, 1990.

RIBEIRO, P. H. P. R.; COSTA FILHO, L. C. C.; RODRIGUES, L. A.; ALVES, L. G. C.; SILVA, A. S.; NOGUEIRA, E. Efeitos de diferentes indutores de crescimento folicular na taxa de prenhes de vacas Nelores submetidas a protocolos de IATF. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Maringá, 2009.

RANDEL, R. D. et al. Effect of alfaprostol on postpartum reproductive efficiency in brahman cows and heifers. **Theriogenology**, v. 29, n. 3, p. 657–670, 1988.

RANDEL, R. D. et al. Exogenous PGF_{2a} enhanced GnRH-induced LH release in postpartum cows. **Theriogenology**, n. 95, p. 643–654, 1996.

RATNER, A. et al. Stimulatory effect of PGE₂ on rat anterior pituitary cyclic AMP and luteinizing hormone release. **Prostaglandins**, v. 5, p. 165-171, 1974.

RHODES, F. M.; DE'ATH, G.; ENTWISTLE, K. W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 38, n. 4, p. 265–277, 1995.

ROBINSON, R. S. et al. Angiogenesis and vascular function in the ovary. **Reproduction**, v. 138, n. 6, p. 869–881, 2009.

SALES, J. N. M. S. et al. Perfil de liberação de LH após o tratamento com cipionato de estradiol em novilhas Nelore ovariectomizadas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 1028, 2007.

SALES, J. N. S. et al. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 510–516, 2012.

SAVIO, J. D. et al. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, n. 2, p. 663–671, 1988.

SAVIO, J. D.; THATCHER, W. W.; SOTA, R. L. DE. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 20, n. 97, p. 197–203, 1993.

SCALIANTE, J.R. et al. Blood perfusion in preovulatory follicle in Nelore cows under FTAI protocols. **Animal Reproduction**, v. 12, n. 3, p. 598, 2015.

SEVERO, N. C. História da inseminação artificial no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** Belo Horizonte, v. 39, n. 1, p. 17–21, 2015.

SILVA, A. S. S. et al. 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, n. 3, p. 443–455, 2007.

SILVEIRA, R. O. et al. Avaliação do tamanho do folículo ovulatório e da taxa de concepção de vacas nelore em protocolos de IATF. **Anais VI SIMPAC**, v. 6, p. 191–196, 2014.

SIROIS, J.; SIMMONS, D. L.; RICHARDS, J. S. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding a novel isoform of prostaglandin endoperoxide H synthase in rat preovulatory follicles. Induction in vivo and in vitro. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 16, p. 11586–92, 5 Jun 1992.

SIROIS, J.; DORÉ, M. The late induction of prostaglandin G/H synthase-2 in equine preovulatory follicles supports its role as a determinant of the ovulatory process. **Endocrinology**, v. 138, n. 10, p. 4427–4434, 1997.

TSAI, S. J.; WILTBANK, M. C. Prostaglandin F2alpha induces expression of prostaglandin G/H synthase-2 in the ovine corpus luteum: a potential positive feedback loop during luteolysis. **Biology of reproduction**, v. 57, n. 5, p. 1016–22, 1997.

VALLE, E. R. DO. **O CICLO ESTRAL DE BOVINOS E MÉTODOS DE CONTROLE**. Campo Grande: Embrapa. p. 24, 1991.

VIANA, J. H. M. et al. Regressão luteal e dinâmica folicular após luteólise natural ou induzida por cloprostenol em vacas da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 3, p. 257–262, Jun 1999.

VIECELLI, C. F. et al. Ultrassonografia Doppler em ginecologia. **Femina**, v. 36, n. 8, p. 497-503, 2008.

WEEMS, C.W.; WEEMS, Y.S.; RANDEL, R.D. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 206-228, 2006.

WILTBANK, J.N. et al. Control of estrus and ovulation using subcutaneous implants and estrogens in beef cattle. **Journal Animal Science**, v.33, p.600-606, 1971.

ZOR, U. et al. Further studies of stimulation of anterior pituitary cyclic adenosine 3',5'-monophosphate formation by hypothalamic extract and prostaglandins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 245, n. 11, p. 2883–2888, 1970.

CAPÍTULO 2

PROSTAGLANDINA F_{2α} COMO INDUTOR DE OVULAÇÃO NA IATF EM VACAS ZEBUÍNAS

RESUMO

PROSTAGLANDINA F_{2α} COMO INDUTOR DE OVULAÇÃO NA IATF EM VACAS ZEBUÍNAS

Fernanda Beserra de Almeida¹, Bianca Damiani Marques Silva², Margot Alves Nunes Dode²
¹Médica Veterinária, Brasília-DF, Brasil, ²Pesquisadora, Brasília-DF, Brasil

O objetivo deste estudo foi avaliar o uso da PGF_{2α} em protocolos de IATF como indutor de ovulação, caracterizando a perfusão sanguínea folicular em diferentes protocolos. Vinte e duas vacas zebuínas receberam em dia aleatório do ciclo estral (D0) um dispositivo intravaginal contendo um 1g de P4 (Sincrogest®, Ourofino, Cravinhos-SP) associado à aplicação IM de 2,0 mg de BE (Estrogin, Biofarm, Jaboticabal – SP) o qual permaneceu até o D8. Os animais então foram divididos aleatoriamente em 3 protocolos de sincronização do estro, num modelo *crossover*, com intervalo de 30 dias de descanso. No grupo PGF_{2α}-D7 os animais receberam 500µg IM de PGF_{2α} (Sincronize, Calbos, Curitiba-PR) em duas aplicações no D7 e no D8. No grupo PGF_{2α}-D9, as aplicações de 500µg ocorreram nos dias D8 e D9. No grupo CONTROLE (CT) os animais receberam 500µg IM de PGF_{2α} no D8, no D9 foi aplicado 1mg de BE. As vacas foram avaliadas com ultrassom Color Doppler a cada 12 horas do D8 até o D10, após esse período os animais foram avaliados de 6 em 6 horas até a ovulação, respeitando um prazo máximo de 120 horas após a retirada do dispositivo. Para acompanhar a curva da concentração sérica de LH foi coletado sangue da veia caudal de 6 em 6 horas a partir do D9 até D11, totalizando 8 coletas. Sete dias após a ovulação os animais foram examinados por ultrassonografia com modo Doppler colorido para avaliação

do fluxo sanguíneo luteal e estimativa da funcionalidade do CL. Para avaliação da vascularização folicular e luteal foi adotada uma classificação subjetiva de Grau 1 a 5, que considerou a porcentagem de circulação na parede da estrutura avaliada. Para comparação estatística do horário da ovulação, grau de irrigação, tamanho do folículo pré-ovulatório, caracterização da vascularização do CL e concentração de LH foi utilizado o teste Kruskal Wallis. Tamanho do CL foi utilizado o teste de Tukey, pelo programa Prophet. Foi observado diferença no horário da ovulação após a retirada do implante, onde o grupo CT ($72,4 \pm 3,7$ h) ovulou mais cedo ($P > 0,05$) do que dois tratamentos (PGF2 α -D7; $96 \pm 12,8$ h; PGF2 α -D9: $90 \pm 18,2$ h). O tamanho do folículo pré-ovulatório também diferiu nos protocolos sendo maior ($P < 0,05$) no grupo PGF2 α -D7 ($13,07 \pm 1,6$) ; do que no grupo CT ($11,96 \pm 1,5$ mm) . O grau de irrigação na parede do folículo pré-ovulatório foi semelhante ($P > 0,05$) em todos os grupos sendo $3,73 \pm 1,0$, $3,53 \pm 1$ e $2,36 \pm 1,8$ para os grupos PGF2 α -D7, PGF2 α -D9 e CT, respectivamente. A taxa de ovulação também foi semelhante nos grupos PGF2 α -D7 71,4%, PGF2 α -D9 68,2% e CT 66,6%. A concentração de LH, no grupo CT no momento -36 horas, foi maior ($P < 0,05$) do que nos demais grupos. Quando comparado os tratamentos em relação ao tamanho do CL PGF2 α -D7 ($15,47 \pm 3,4$); PGF2 α -D9 ($14,37 \pm 3,2$) e CT ($13,44 \pm 2,7$ mm) e a vascularização PGF2 α -D7 ($4,68 \pm 0,6$); PGF2 α -D9 ($4,68 \pm 0,6$) e CT ($4,71 \pm 0,4$) não houve diferença. Estes resultados sugerem que a PGF2 α tem potencial como indutor de ovulação em protocolos de IATF, embora haja um aumento no intervalo para a ovulação.

Palavras chave: Doppler, perfusão sanguínea, protocolos, LH.

ABSTRACT

PROSTAGLANDIN F₂ α AS AN INDUCER OF OVULATION IN FTAI IN ZEBU COWS

Fernanda Beserra de Almeida¹, Bianca Damiani Marques Silva², Margot Alves Nunes Dode²

¹Veterinary, Brasília-DF, Brazil, ²Researcher, Brasília-DF, Brazil

The objective of this study was to evaluate the use of PGF₂ α in TAI protocols as an inducer of ovulation characterizing follicular blood perfusion in different protocols. Twenty-two zebu cows received an intravaginal device containing 1g P4 (Sincrogest®, Ourofino, Cravinhos-SP) on a random day of estrus cycle (D0) associated with the IM application of 2.0 mg BE (Estrogin, Biofarm, Jaboticabal - SP) which remained until the D8. The animals were then randomly divided into three estrus synchronization protocols, in a crossover model, with a rest interval of 30 days. In the PGF₂ α -D7 group the animals received 500 μ g IM of PGF₂ α (Synchronize, Calbos, Curitiba-PR) in two applications in D7 and D8. In the PGF₂ α -D9 group, 500 μ g applications occurred on days D8 and D9. In the control group (CT) the animals received 500 μ g IM of PGF₂ α in D8, in D9 1mg of BE was applied. The cows were evaluated with Color Doppler ultrasound every 12 hours from D8 to D10, after which the animals were evaluated every 6 hours until ovulation, respecting a maximum period of 120 hours after the removal of the device. To follow the serum LH concentration curve, blood from the caudal vein was collected every 6 hours from D9 to D11, totaling 8 samples. Seven days after ovulation the animals were examined by color Doppler ultrasound for evaluation of luteal blood flow and estimation of CL functionality. To evaluate the follicular and luteal vascularization a subjective classification of Grade 1 to 5 was adopted, which

considered the percentage of circulation in the wall of the evaluated structure. The Kruskal Wallis test was used for statistical comparison of ovulation time, irrigation degree, preovulatory follicle size, CL vascularization and LH concentration. Size of the CL was used the Tukey test, by the Prophet program. Differences in ovulation time were observed after implant withdrawal, where the CT group (72.4 ± 3.7 hours) ovulated earlier ($P > 0.05$) than two treatments (PGF2 α -D7, 96 ± 12.8 h; PGF2 α -D9: 90 ± 18.2 h). The preovulatory follicle size also differed in the protocols being higher ($P < 0.05$) in the PGF2 α -D7 group (13.07 ± 1.6); than in the CT group (11.96 ± 1.5 mm). The degree of irrigation in the wall of the preovulatory follicle was similar ($P > 0.05$) in all groups, being 3.73 ± 1.0 , 3.53 ± 1 and 2.36 ± 1.8 for the PGF2 α groups -D7, PGF2 α -D9 and CT, respectively. The ovulation rate was also similar in the 71.4% PGF2 α -D7, 68.2% PGF2 α -D9 and 66.6% CT groups. The concentration of LH in the CT group at the time -36 hours was higher ($P < 0.05$) than in the other groups. When comparing the treatments in relation to the size of the CL PGF2 α -D7 (15.47 ± 3.4); PGF2 α -D9 (14.37 ± 3.2) and CT (13.44 ± 2.7 mm) and PGF2 α -D7 vascularization (4.68 ± 0.6); PGF2 α -D9 (4.68 ± 0.6) and CT (4.71 ± 0.4) there was no difference. These results suggest that PGF2 α has potential as an inducer of ovulation in IATF protocols, although there is an increase in the interval for ovulation.

Keywords: Doppler, blood perfusion, protocols, LH.

1 INTRODUÇÃO

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2016) com aproximadamente 218 milhões de cabeças, o Brasil tem o maior rebanho comercial do mundo. A raça zebuína (*Bos indicus*) compõe cerca de 80% do rebanho, na qual o Nelore se destaca, com 90% dessa parcela (ABIEC, 2016).

A indústria da carne é um setor que vem tendo destaque no Brasil e a produção crescendo cada vez mais. Das exportações brasileiras a exportação de carne bovina representa 3% do total, com um faturamento de 6 bilhões de reais. Isso representa 30% do PIB (produto interno bruto) do agronegócio ou 6% do PIB do país, tendo um movimento superior a 400 bilhões de reais, com aumento de cerca de 45% nos últimos 5 anos (Gomes et al., 2017). No entanto a baixa eficiência reprodutiva do rebanho nacional ainda é um gargalo para o crescimento sustentável na pecuária de corte (Baruselli, 2016).

Na tentativa de melhorar a produtividade do rebanho nacional, inúmeras biotécnicas reprodutivas estão se destacando, dentre elas a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) a qual elimina a necessidade de observação de estro, possui fácil manejo, merecendo destaque por aumentar a eficiência reprodutiva e a genética da pecuária.

Nesse sentido existe uma série de tratamentos hormonais que permitem a sincronização do estro e a indução da ovulação, eliminando a detecção de estro e determinando o horário da inseminação artificial (Baruselli et al., 2002; Bó et al., 2003). Os indutores de ovulação utilizados no Brasil atualmente para sincronização da ovulação e IATF são os análogos do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), o estradiol 17 β e os ésteres de estradiol (Benzoato, Valerato e Cipionato de estradiol). Porém os mais utilizados são os ésteres de estradiol devido ao seu menor custo e boa eficiência (Meneghetti et al., 2009).

No entanto desde 2008, o uso de estradiol - 17β foi extinto da comunidade europeia por ser considerado um carcinógeno completo (Diretiva 2008/97/CE). Como o Brasil é o maior produtor e líder global de exportação de carne bovina (ABIEC, 2017) é necessário que haja uma preocupação em estudar alternativas que possam substituir o uso de ésteres de estradiol, sem que seja prejudicada a fertilidade dos animais e garantindo segurança alimentar para humanos que ingerem produtos de origem animal evitando assim que os produtos do Brasil sofram embargos dos mercados mais exigentes.

A prostaglandina é uma substância biológica potente com variadas aplicações no controle reprodutivo dos bovinos, sendo sua principal ação na regressão do CL, podendo ser utilizada para sincronização do estro, regressão de corpo lúteo persistente e indução do aborto ou parto (Gabriel et al., 2011). Além dessas atuações sabe-se que a $PGF2\alpha$ possui ação direta sobre a ovulação (Silva & Reeves, 1985; Algire et al., 1992; Bridges & Fortune, 2007). As prostaglandinas $E2$ e $F2\alpha$ começam a aumentar seus níveis no início do processo de ovulação atingindo concentrações máximas no momento da ovulação (Duffy & Stouffer, 2001; Liu et al. 1997; Sirois & Simmons; Richards, 1992), sendo mediadoras de vários eventos periovulatórios (Murdoch & Hansen; Mcpherson, 1993). Além disso, elas parecem ter b um papel crucial na ruptura folicular (Pfeifer et al., 2014).

Pfeifer et al. (2009, 2014, 2016, 2018) e Leonardi et al. (2012) demonstraram em seus estudos que a $PGF2\alpha$ está diretamente ligada ao processo ovulatório em novilhas e vacas, atuando por um mecanismo independente da luteólise. Porém o seu mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido. Esse estudo visa comparar diferentes momentos das aplicações de $PGF2\alpha$ para se obter a sincronização de estro como mais uma alternativa, que possa diminuir o uso dos ésteres de estradiol ou ser utilizado em protocolos baseados em GnRH diminuindo o seu custo em vacas Nelore.

Diante do que foi exposto a hipótese deste estudo é que a $PGF2\alpha$ pode ser utilizada como indutor de ovulação em protocolos convencionais de IATF em substituição aos ésteres de estradiol, dessa forma o objetivo desse trabalho foi avaliar o uso da $PGF2\alpha$ em protocolos de IATF como indutor de ovulação em vacas de corte.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 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. 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 004/2018.

Foram utilizadas 22 vacas zebuínas pluríparas com idade entre 3 e 5 anos com escore corporal 3,5 (em escala de 1-5), criadas em sistema a pasto com água e sal mineral à vontade. 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 participarem do experimento os animais que apresentaram presença de corpo lúteo, útero sadio e sem histórico de enfermidades.

2.2 Delineamento experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 protocolos de sincronização do estro, num modelo *crossover*, com intervalo de 30 dias de descanso.

Os protocolos utilizados foram:

Grupo PGF2 α -D7: em dia aleatório do ciclo estral os animais receberam um dispositivo intravaginal contendo um 1g de progesterona (P4) (Sincrogest®, Ourofino, Cravinhos-SP) associado à aplicação intra muscular (IM) de 2,0 mg de Benzoato de estradiol (BE) (Estrogin, Biofarm, Jaboticabal – SP) sendo este dia considerado D0. No D7 e no D8 os animais receberam 500 μ g IM de PGF2 α (Sincronize, Calbos, Curitiba-PR), no D8 também foram retirados os implantes.

Grupo PGF2 α -D9: no D0 os animais receberam um dispositivo intravaginal contendo um 1g de P4 (Sincrogest®, Ourofino, Cravinhos-SP) associado à aplicação IM de 2,0 mg de BE (Estrogin, Biofarm, Jaboticabal – SP). No D8 e no D9 os animais receberam 500 μ g IM de PGF2 α (Sincronize, Calbos, Curitiba-PR), no D8 também foram retirados os implantes.

Grupo CONTROLE (CT): no D0 os animais receberam um dispositivo intravaginal contendo um 1g de P4 (Sincrogest®, Ourofino, Cravinhos-SP) associado à aplicação IM de 2,0 mg de BE (Estrogin, Biofarm, Jaboticabal – SP). No D8 os animais receberam 500 μ g IM de PGF2 α e foram retirados os implantes, no D9 foi aplicado 1mg de BE.

2.3 Ultrassonografia 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). Todas as investigações ultrassonográficas foram feitas pelo mesmo examinador.

As vacas foram avaliadas com ultrassom Color Doppler a cada 12 horas do momento da retirada do implante no D8 (0 hrs) até o D10 (60 hrs), após esse período a

avaliação ocorreu de 6 em 6 horas até a ovulação ou um prazo máximo de 120 horas após a retirada do dispositivo. 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. Foram mensurados os folículos de maior diâmetro nos ovários, o tamanho do folículo pré-ovulatório foi considerado o tamanho da sua última visualização antes de ovular. O grau de irrigação em tempo real foi avaliado com o modo Doppler, quando obtido o maior diâmetro e melhor circulação do folículo dominante, e foram classificados 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 (figura 2.1).

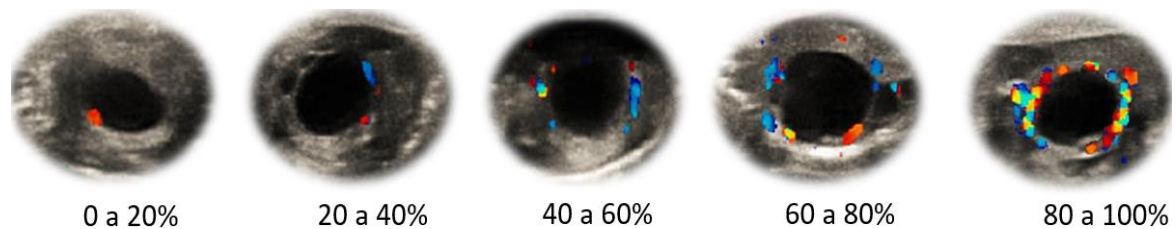


Figura 2.1 - Alteração do fluxo sanguíneo na parede do folículo pré-ovulatório. Quanto mais se aproxima o momento da ovulação mais intenso se torna a vascularização, sendo considerado grau 1 de 0 a 20%, grau 2 de 20 a 40%, grau 3 de 40 a 60%, grau 4 de 60 a 80% e grau 5 de 80 a 100% de detecção de fluxo sanguíneo na parede do folículo.

Sete dias após a ovulação os animais foram examinados por ultrassonografia com modo Doppler colorido para mensuração do diâmetro do corpo lúteo (CL) e avaliação da presença de fluxo sanguíneo luteal.

2.4 Detecção do pico de LH

Para acompanhar a curva da concentração plasmática de LH foi coletado sangue da veia caudal em tubos heparinizados de 10 ml (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ, USA), de 6 em 6 horas a partir do D9 (36 hrs) até D11 (78 hrs), totalizando 8 coletas de 22 animais.

As amostras de sangue foram centrifugadas e o plasma foi retirado e armazenado a -20 °C. A dosagem foi realizada através de testes de radioimunoensaio com coeficiente de variação intra-ensaio de 11,19 ng/ml e inter-ensaio de 11,01 ng/ml.

2.5 Análise estatística

Para comparação estatística do horário da ovulação, grau de irrigação, tamanho do folículo pré-ovulatório, caracterização da vascularização do CL e concentração de LH foi utilizado o teste Kruskal Wallis. Para tamanho do CL foi utilizado o teste Tukey. As avaliações foram realizadas através do programa Prophet 5.0 e o nível de significância considerado foi $P < 0,05$.

3 RESULTADOS

Foi observado diferença no horário da ovulação entre os grupos ($P < 0,05$), no qual o grupo controle ovulou antecipadamente quando comparado aos outros dois tratamentos (Tabela 2.1). A dispersão do momento das ovulações nos diferentes grupos pode ser observada na Figura 2.1.

Com relação ao tamanho médio do folículo pré-ovulatório houve diferença quando comparado os três protocolos, onde os folículos do grupo $\text{PGF2}\alpha\text{-D9}$ apresentaram-se maiores do que o grupo Grupo CT. Porém quando comparado o grau de irrigação na parede do folículo pré-ovulatório no momento da ovulação e a taxa de ovulação não houve diferença. Os resultados estão demonstrados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Resultados referentes ao horário de ovulação, tamanho do folículo pré-ovulatório e taxa de ovulação em diferentes protocolos de IATF em vacas zebuínas.

	Grupo Controle (CT) (n = 21)	Grupo $\text{PGF2}\alpha\text{-D7}$ (n = 21)	Grupo $\text{PGF2}\alpha\text{-D9}$ (n = 22)
Horário de ovulação (média \pmD.P.)	72,4 \pm 3,7 h ^B	96 \pm 12,8 h ^A	90 \pm 18,2 h ^A
Diâmetro do folículo pré-ovulatório (média \pmD.P.)	11,96 \pm 1,5 mm ^A	13,07 \pm 1,6 mm ^{AB}	13,42 \pm 1,8 mm ^B
Taxa de ovulação	66,6%	71,4%	68,2%

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

A caracterização da perfusão sanguínea dos folículos pré-ovulatórios foi semelhante entre os grupos, na primeira hora de avaliação os folículos apresentavam diâmetros semelhantes (9,55mm grupo Controle; 9,3mm grupo PGF2 α -D7 e 9,8 mm no grupo PGF2 α -D9) apresentando irrigação grau 1, conforme o desenvolvimento no diâmetro e aproximação hora da ovulação foi havendo uma mudança no fluxo sanguíneo com um aumento mais acentuado na circulação próximo a ovulação (Figuras: 2.1,2.2 e 2.3).

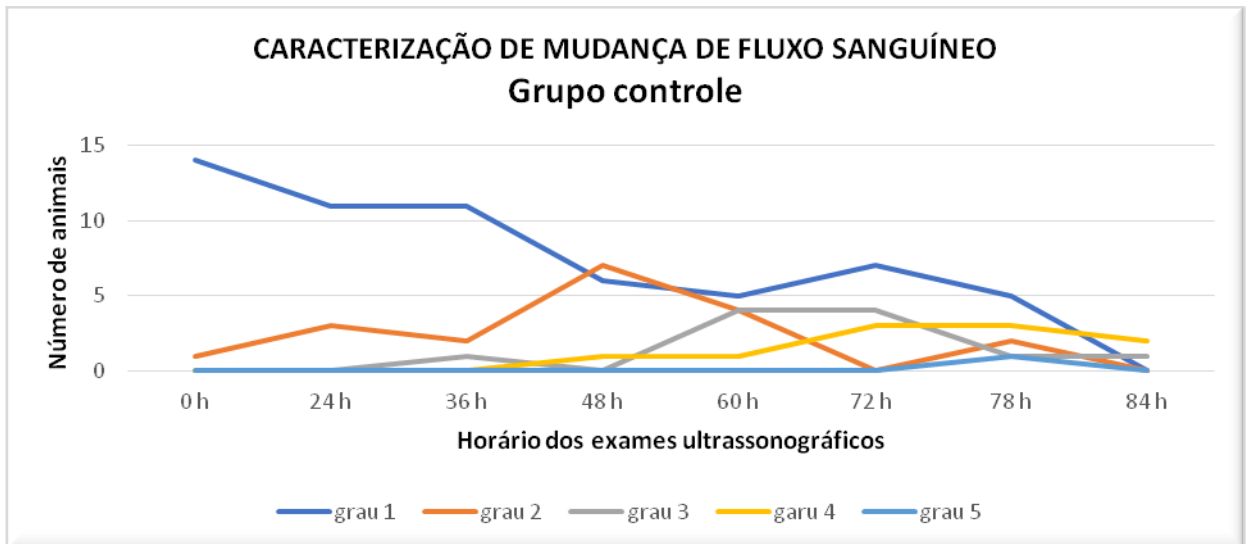


Figura 2.2. Caracterização da mudança de fluxo sanguíneo no grupo Controle de acordo com o horário dos exames ultrassonográficos

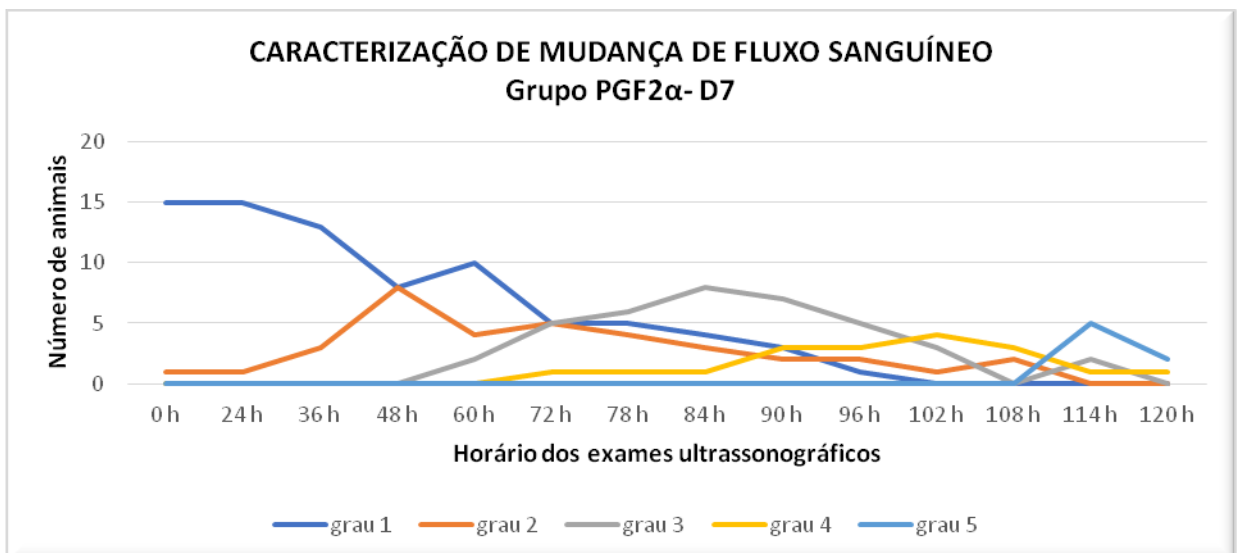


Figura 2.3. Caracterização da mudança de fluxo sanguíneo no grupo PGF2 α – D7 de acordo com o horário dos exames ultrassonográficos

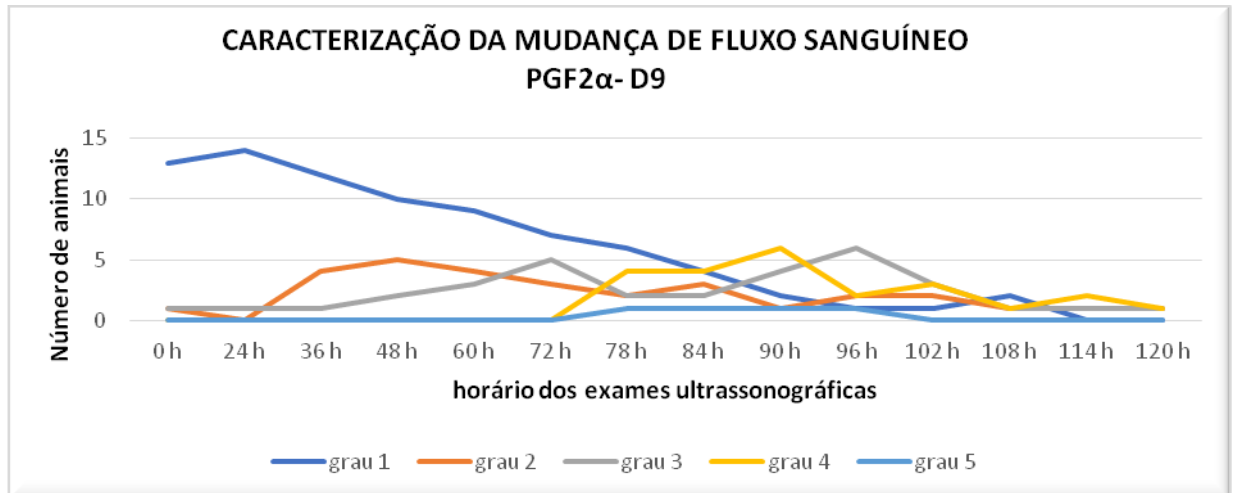


Figura 2.4. Caracterização da mudança de fluxo sanguíneo no grupo PGF2 α –D9 de acordo com o horário dos exames ultrassonográficos

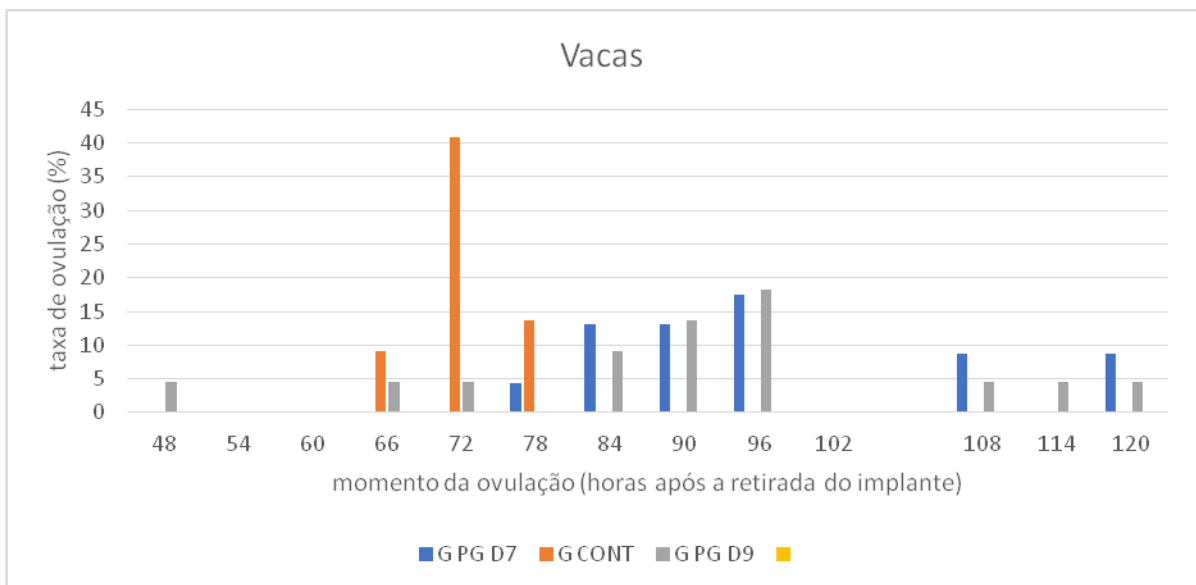


Figura 2.5. Distribuição e porcentagem das vacas que ovularam após a retirada do implante intravaginal de progesterona nos grupos PGF2 α -D7, PGF2 α -D9 e CONTROLE.

Para avaliar as concentrações séricas de LH o gráfico foi montado de acordo com a hora da ovulação, sendo considerado o momento da ovulação zero hora e os momentos coletados, anteriores a ovulação, como negativos (Figura 2.2). O grupo Controle teve diferença no momento -36 horas, com aumento da concentração de LH no sangue em relação aos grupos PGF2 α -D7 e PGF2 α -D9.

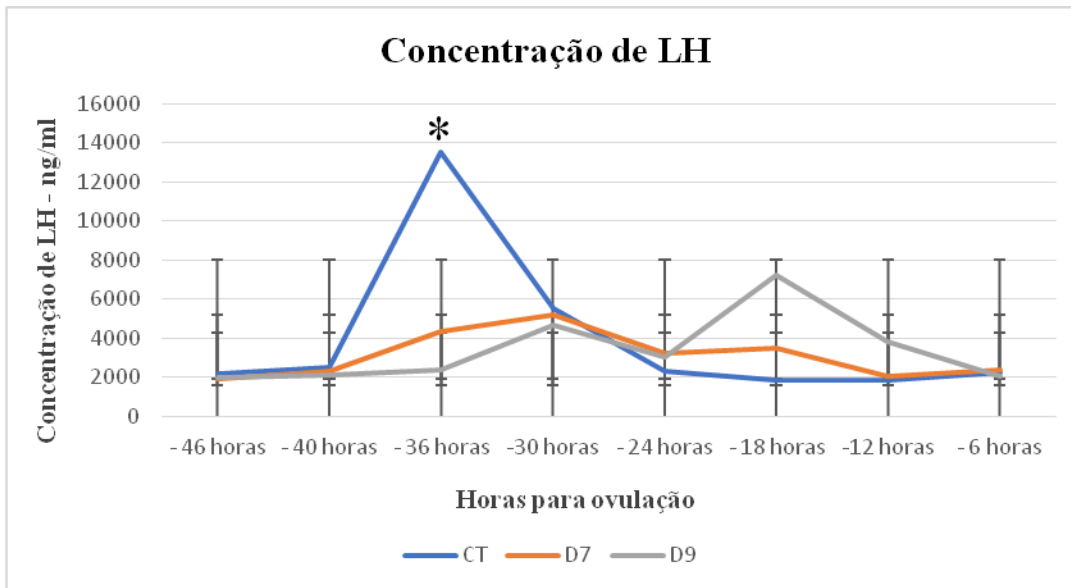


Figura 2.6 - Concentrações séricas de LH nas horas que antecedem a ovulação nos grupos PGF2 α - D7, PGF2 α -D9 e CONTROLE.

Com relação ao tamanho do CL e sua vascularização, não houve diferença ($P>0,05$) quando comparado os tratamentos. Os resultados estão demonstrados na tabela 2.2.

Tabela 2.2. Resultados referentes ao diâmetro do CL e o grau de irrigação nos diferentes protocolos de IATF.

	Grupo Controle (CT)	Grupo PGF2α-D7	Grupo PGF2α-D9
Tamanho CL (média \pmD.P.)	13,44 \pm 2,7mm	15,47 \pm 3,4mm	14,37 \pm 3,2mm
Grau de irrigação (média \pmD.P.)	4,71 \pm 0,4	4,68 \pm 0,6	4,68 \pm 0,6

4 DISCUSSÃO

No presente estudo, diferentemente dos demais foram feitas duas aplicações de 500 μ g de PGF2 α IM em momento diferentes, grupo PGF2 α – D7 no dia 7 e no dia 8 do protocolo e no grupo PGF2 α – D9 no dia 8 e dia 9 em vacas zebuínas. No grupo PGF2 α – D7 a dose luteolítica da PGF2 α foi injetada um dia antes da remoção do implante de progesterona, para que fosse possível diferenciar a ação luteolítica do efeito da ovulação (Castro et al., 2018) e o grupo PGF2 α – D9 foi realizado no dia 8 e dia 9 baseado em trabalhos prévios de Pfeifer et al. (2014)

A hipótese de que a PGF2 α pode ser utilizada como indutor de ovulação em protocolos convencionais de IATF foi comprovada neste estudo. Estes resultados são semelhantes a estudos relatados anteriormente onde foi demonstrado que a PGF2 α usada como indutor de ovulação fornece taxas de gestação em novilhas e vacas amamentando semelhante (~50%) a indutores de ovulação baseados em estradiol (Pfeifer et al., 2014).

Para que se tenha uma taxa de fertilidade satisfatória na IATF as ovulações devem ocorrer de forma sincronizada (menor intervalo entre as ovulações) na maioria dos animais tratados, com menor número de falhas (Pfeifer et al., 2014). Neste trabalho o intervalo entre a retirada do implante de P4 e a ovulação foi em média 72 horas no grupo Controle, corroborando com outros estudos que demonstraram um intervalo semelhante entre a retirada do implante e a ovulação (média 74 horas) (Martinez et al., 2005; Carvalho et al., 2008; Pfeifer et al., 2014). Em um estudo em que não utilizou indutor de ovulação em novilhas, as ovulações ocorreram em média 83 horas após a retirada do implante (Pfeifer et al., 2014). No presente estudo, os grupos PGF2 α -D7 e PGF2 α -D9 ovularam mais tarde,

96±12,8h e 90±18,2h (respectivamente), resultados semelhantes aos obtidos por Leonardi et al. (2012) que demonstraram que novilhas pré-púberes ovularam cerca de 94 horas após o tratamento com cloprostenol e por Castro et al. (2018) em que vacas tratadas com PGF2 α ovularam com uma média de 96 horas. Intervalos esses que poderiam prejudicar a taxa de gestação, no entanto, Martinez et al. (2000) mesmo utilizando BE ou GnRH como indutores de ovulação, tiveram uma variação grande de ocorrência das ovulações entre 72 e 108 horas após a retirada do implante de P4 e as taxas de gestação não foram afetadas por esse intervalo (~ 73% de gestação).

Mesmo tendo um intervalo maior para as ovulações a porcentagem de animais que ovularam em um intervalo de 24 horas (72-96 horas após a retirada do implante de progesterona) foi de 80% no grupo PGF2 α -D7 e 66,6% no grupo PGF2 α -D9, esses resultados são relevantes visto que um dos fatores chave para o sucesso da IATF é a ocorrência de um maior número de ovulações em um menor espaço de tempo (Saacke, 2008). Ajustando o horário da inseminação em protocolos que utilizam PGF2 α como indutor de ovulação as taxas de prenhez podem atingir porcentagens semelhantes aos protocolos convencionais de IATF.

Com relação ao intervalo entre o aumento na concentração de LH e a ovulação não houve diferença entre os grupos (grupo PGF2 α -D7, média 29 horas; grupo PGF2 α -D9, média 28 horas; grupo Controle, média 28 horas). Outros trabalhos também demonstraram uma média entre o pico de LH e a ovulação entre 28 e 30 horas (Duffy & Stouffer, 2001). No grupo Controle pode observar a evidência no aumento de LH e, por conseguinte, o horário de ovulação dos animais ser menos disperso. Já nos grupos PGF2 α -D7 e PGF2 α -D9 não foi possível observar a amplitude no pico de LH, pela dispersão nos horários do pico de LH e consequentemente no horário de ovulação. O intervalo entre a aplicação do BE no grupo controle e o pico de LH foi em média de 20 horas. Ferraz et al. (2009) em seu trabalho obteve uma média entre a aplicação do BE e o pico de 28,20 horas. Lammoglia et al. (1998) obtiveram um intervalo de 24 horas em vacas *Bos taurus taurus*.

No que diz respeito ao diâmetro dos folículos pré-ovulatórios entre os grupos (PGF2 α -D7 13,07±1,6; PGF2 α -D9 13,42±1,8; CT 11,96±1,5mm), o grupo PGF2 α -D9 mostra folículos com diâmetros maiores do que os demais, essa diferença pode estar relacionada a cada indutor de ovulação. Segundo Lammoglia et al. (1998) a administração de BE ou ECP resulta na ovulação devido a indução sincronizada do pico de LH. Porém pode ser que o mecanismo de ação da PGF2 α como indutor de ovulação permita que o folículo cresça por um período maior quando comparado com BE (Pfeifer et al., 2014).

Vários estudos tem buscado compreender o mecanismo pelo qual a prostaglandina atua para induzir a ovulação (Bridges & Fortune, 2007; Murdoch; Hansen & Mcpherson, 1993;; Randel et al., 1996; Naor et al., 2007). Diversos autores sugerem que a PGF promove a ovulação por mecanismos distintos diferentes do efeito indireto da indução de luteólise (Leonardi et al., 2012; Pfeifer et al. 2009, 2014). Randel et al. (1996) demonstraram em vacas em anestro um aumento na liberação de LH 6 horas após o tratamento com análogo de PGF. Alguns autores sugerem que a PGF tem um efeito direto na hipófise anterior aumentando a capacidade de resposta ao GnRH o que melhora a liberação de LH (Randel et al. 1996; Weems et al., 2006) culminando com a ovulação. Todavia, a atuação da prostaglandina na liberação de LH é controversa. Embora a PGF cause ovulação em vacas em anestro (Cruz et al., 1997) e em ovelhas (Davies et al., 2006) a liberação de LH só foi associada em vacas. Naor et al. (2007) demonstraram que a PGF inibe a secreção de LH pelas células hipofisárias em camundongos. Essas considerações demonstram a necessidade de mais estudos para que o mecanismo de ação que leva a PGF a induzir a ovulação seja elucidado. Além do efeito central, a PGF possui uma função local, ou seja, no próprio ovário. As prostaglandinas PGE e PGF2 α produzidas pelas células da granulosa estão intimamente ligadas ao processo ovulatório (Bridges & Fortune, 2003; Evans et al., 1983; Murdoch et al., 1993). Considerando essas funções, a ovulação induzida pela PGF pode ter um efeito sobre a sensibilização dos receptores de GnRH na hipófise (Randel et al., 1996) ou por ação direta nas células alvo dos folículos pré-ovulatórios (Pfeifer et al., 2018).

Pfeifer et al. (2016) utilizando PGF2 α como indutor de ovulação em vacas de leite observou uma associação entre a vascularização folicular e tempo para ovular. O que pode ser observado também no presente estudo (figuras 2.1, 2.2 e 2.3) em que o crescimento do fluxo sanguíneo nos diferentes protocolos apresentou um aumento mais acentuado na circulação próximo a ovulação.

Apesar de não se saber ao certo o mecanismo de ação da PGF, aparentemente qualquer análogo de PGF2 α tem potencial para induzir a ovulação. Vários análogos comerciais foram associados a eventos perioovulatórios em bovinos (Cruz et al., 1997; Gabriel et al., 2011; Leonardi et al., 2012; Pfeifer et al., 2009, 2014), bubalinos (Neglia et al., 2008, 2012) e ovinos (Davies et al., 2006). Pfeifer et al. (2014) utilizando análogos de PGF D-cloprostenol e Cloprostenol sódico obtiveram resultados positivos como indutores de ovulação. No presente estudo foi utilizado Cloprostenol sódico no qual 69,8% (30 de 43) dos animais ovularam, taxa semelhante a do grupo Controle 66,6 %.

Os resultados apresentados utilizando PGF como indutor de ovulação demonstram a possibilidade de mais uma alternativa que pode ser utilizada em programas de IATF. Essa alternativa é interessante porque a prostaglandina não possui restrições comerciais, diferentemente dos ésteres de estradiol (estradiol- 17 β) que desde de 2008 foi proibido pela comunidade europeia por ter sido considerado um agente carcinogênico pelo Comitê sobre Medidas Veterinárias Relacionadas com a Ciência para Saúde Pública (SCVPH). No Brasil, embora não tenha sido proibido o uso de ésteres de estradiol na reprodução animal, dependendo da fórmula e do produto comercial o período de carência no leite e na carne pode chegar a 30 dias (Pfeifer et al., 2014). Embora o protocolo utilizado nesse estudo não tenha abolido completamente o uso do estradiol, utilizou-se uma dose a menos desse hormônio sem diminuir a taxa de ovulação, resultando em cerca de 8 dias a menos do período de carência o que seria um custo efetivo para o produtor (Pfeifer et al., 2014).

5 CONCLUSÃO

Estes resultados sugerem que a $PGF2\alpha$ tem potencial como indutor de ovulação em protocolos de IATF, embora haja um aumento no intervalo para a ovulação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Perfil da Pecuária Anual. **Relatório Anual 2016**, 2016.

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Perfil da Pecuária no Brasil. **Relatório Anual** p. 1–49, 2017.

ALGIRE, J. E.; SRIKANDAKUMAR, A.; GUILBAULT, L. A.; DOWNEY, B. R. Preovulatory changes in follicular prostaglandins and their role in ovulation in cattle. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 56, p. 67–69, 1992.

BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; CARVALHO, N.A.T.; MADUREIRA, E.H.; CAMPOS FILHO, E.P. Effect of different treatments for timed artificial insemination on the reproductive efficiency in lactating beef cows. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.26, p. 218-221, 2002.

BARUSELLI, P. S. IATF supera dez milhões de procedimentos e amplia o mercado de trabalho. **Revista CFMV**, v.69, p. 57–60, 2016.

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.

BRIDGES, P.J.; FORTUNE, J.E. Progesterone mediates gonadotrophin induced secretion of prostaglandins E and F_{2a} (PGE, PGF) by follicular cells from bovine preovulatory follicles [Abstract]. **Biology of Reproduction**, v. 68 (Suppl 1), p. 47, 2003.

BRIDGES, P.J.; FORTUNE, J. E. Regulation, action and transport of prostaglandins during the periovulatory period in cattle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 263, p. 1-9, 2007.

CARVALHO, J.B.; CARVALHO, N.A.; 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.

CASTRO, N. A. et al. Use of prostaglandin F_{2α} as ovulatory stimulus for synchronizing dairy cattle. **Research in Veterinary Science**, v. 118, n. May 2017, p. 151–154, 2018.

DIRETIVA 2008/97/CE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 19 de Novembro de 2008 que altera a Directiva 96/22/CE do Conselho relativa à proibição de utilização de certas substâncias com efeitos hormonais ou tireostáticos e de substâncias β -agonistas em produção animal. 2008.

CRUZ, L. C.; DO VALLE, E. R.; KESLER, D. J. Effect of prostaglandin F₂ alpha-and gonadotropin releasing hormone-induced luteinizing hormone releases on ovulation and corpus luteum function of beef cows. **Animal reproduction science**, v. 49, n. 2–3, p. 135–42, 5 Des 1997.

DAVIES, K. L. et al. Does injection of prostaglandin F₂ a (PGF₂ a) cause ovulation in anestrous Western White Face ewes ? **Theriogenology**, v. 66, p. 251–259, 2006.

DUFFY, D. M.; STOUFFER, R. L. The ovulatory gonadotrophin surge stimulates cyclooxygenase expression and prostaglandin production by the monkey follicle. **Molecular Human Reproduction**, v. 7, n. 8, p. 731–9, 2001.

EVANS, G. et al. Production of prostaglandins by porcine preovulatory follicular tissues and their roles in intrafollicular function. **Biology of Reproduction**, v. 28, n. 2, p. 322–328, 1983.

FERRAZ, H.T. et al . Pico Pré-Ovulatório De Lh Em Fêmeas Nelore. **Archivos de zootecnia**, v. 58, n. 224, p. 757–760, 2009

FORTUNE, J. E. et al. The periovulatory period in cattle: progesterone, prostaglandins, oxytocin and ADAMTS proteases. **Animal reproduction / Colegio Brasileiro de Reproducao Animal**, v. 6, n. 1, p. 60–71, 2009.

GABRIEL, H.G.; WALLENHORST, S.; DIETRICH, E.; HOLTZ, W. The effect of prostaglandin F(2alpha) administration at the time of insemination on the pregnancy rate of dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 123, p.1-4, 2011.

GOMES, R. DA C.; FEIJÓ, G. L. D.; CHIARI, L. Evolução e Qualidade da Pecuária Brasileira. **Embrapa**, p. 4, 2017.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Efetivos e produção pecuária. **Produção da pecuária municipal**, v.44, p. 7-12, 2016.

LAMMOGLIA, M. A. et al. Induced and Synchronized Estrus in Cattle: Dose Titration of Estradiol Benzoate in Peripubertal Heifers and Postpartum Cows after Treatment with an Intravaginal Progesterone-Releasing Insert and Prostaglandin F₂ α . **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 6, p. 1662–1670, 1998.

LEONARDI, C.E.P.; PFEIFER, L.F.M.; RUBIN, M.I.B.; SINGH, J.; MAPLETOFT, R.J.; PESSOA, G.A.; BAINYA, A.M.; SILVA, C.A.M. Prostaglandin F₂ α promotes ovulation in prepubertal heifers. **Theriogenology**, v. 78, p. 1578–1582, 2012.

LIU, J. et al. Prostaglandin G/H synthase-2 is expressed in bovine preovulatory follicles after the endogenous surge of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1524–31, 1997.

MARTINEZ, M.F. et al. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. **Theriogenology**, v.54, p.757-769, 2000.

MARTÍNEZ, M. F. et al. 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, n. 1–2, p. 37–52, 2005.

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.

MURDOCH, W.J.; HANSEN, T.R.; MCPHERSON, L.A. A review – role of eicosanoids in vertebrate ovulation. **Prostaglandins**, v. 46, p. 85–115, 1993.

NEGLIA, G. et al. Effect of prostaglandin F_{2α} at the time of AI on progesterone levels and pregnancy rate in synchronized Italian Mediterranean buffaloes. **Theriogenology**, v. 69, n. 8, p. 953–960, 2008.

NEGLIA, G. et al. Efficacy of PGF_{2α} on pre-ovulatory follicle and corpus luteum blood flow. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 1, p. 26–31, 2012.

NAOR, Z. et al. Reciprocal cross talk between gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and prostaglandin receptors regulates GnRH receptor expression and differential gonadotropin secretion. **Molecular Endocrinology**, v. 21, p. 524–537, 2007.

PFEIFER, L.F.; SIQUIRA, L.G.; MAPLETOFT, R.J.; KASTELIC, J.P.; ADAMS, G.P.; COLAZO, M.G. Effects of exogenous progesterone and cloprostenol on ovarian follicular development and first ovulation in prepubertal heifers. **Theriogenology**, v. 72, p. 1054–1064, 2009.

PFEIFER, L. F. M.; LEONARDI, C. E. P.; CASTRO, N. A.; VIANA, J. H. M., SIQUEIRA, L. G. B.; CASTILHO, E. M.; SINGH, J.; KRUSSER, R. H., RUBIN, M. I. B. The use of PGF_{2α} as ovulatory stimulus for timed artificial insemination in cattle. **Theriogenology**, v. 81, p. 689-695, 2014.

PFEIFER, L. F. M. et al. Prostaglandin F_{2α} or estradiol benzoate to induce ovulation in timed artificially inseminated dairy cows. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 51, n. 6, p. 738–744, 2016.

PFEIFER, L. F. M. et al. Different protocols using PGF_{2α} as ovulation inducer in Nelore cows subjected to estradiol-progesterone timed AI based protocols. **Theriogenology**, v. 120, p. 56–60, 2018.

RANDEL, R. D. et al. Exogenous PGF_{2α} enhanced GnRH-induced LH release in postpartum cows. **Theriogenology**, n. 95, p. 643–654, 1996.

SAACKE, R. G. Insemination factors related to timed AI in cattle. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 479–484, 2008

SILVA, M.; REEVES, J. J. Indomethacin inhibition of ovulation in the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 75, p. 547–549, 1985.

SIROIS, J.; SIMMONS, D. L.; RICHARDS, J. S. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding a novel isoform of prostaglandin endoperoxide H synthase in rat preovulatory follicles. Induction in vivo and in vitro. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 16, p. 11586–92, 5 Jun 1992.

WEEMS, C.W.; WEEMS, Y.S.; RANDEL, R.D. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 206-228, 2006.

ZOR, U. et al. Further studies of stimulation of anterior pituitary cyclic adenosine 3',5'-monophosphate formation by hypothalamic extract and prostaglandins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 245, n. 11, p. 2883–2888, 1970.

CAPÍTULO 3

INFLUÊNCIA DA IRRIGAÇÃO DO FOLÍCULO PRÉ-OVULATÓRIO NA TAXA DE PRENHEZ

RESUMO

INFLUÊNCIA DA IRRIGAÇÃO DO FOLÍCULO PRÉ-OVULATÓRIO NA TAXA DE PREENHEZ

Fernanda Beserra de Almeida¹, Bianca Damiani Marques Silva², Margot Alves Nunes Dode²
¹Médica Veterinária, Brasília-DF, Brasil, ²Pesquisadora, Brasília-DF, Brasil,

O objetivo desse estudo foi avaliar se há influência da irrigação do folículo pré-ovulatório no momento da IATF na taxa de prenhez. O experimento foi realizado em duas fazendas distintas, Fazenda Grande (Guapó) e Fazenda Vale do Ouro (Palmeiras), localizadas no centro do Estado de Goiás. Foram utilizadas 209 vacas nelore que receberam em um dia aleatório do ciclo estral um dispositivo intravaginal impregnado com 1g de progesterona (PRIMER®, Tecnopec, São Paulo -SP), administrado 2 mg de BE (RIC-BE, Tecnopec, São Paulo – SP) IM e 250µg IM de PGF2α(Sincrocio®, Ouro Fino Saúde Animal Ltda, Cravinhos-SP, Brasil), sendo considerado este dia D0. No D8 foi retirado o dispositivo intravaginal, aplicado 300 UI de eCG (FOLLIGON®, MSD Saúde Animal, São Paulo, SP) IM, 500 µg de PGF2α IM (Sincrocio®, Ouro Fino Saúde Animal Ltda, Cravinhos-SP, Brasil) e 1mg de CE IM (SincroCP, Ouro Fino Saúde Animal Ltda, Cravinhos-SP, Brasil), 48 horas após a retirada do dispositivo as vacas foram inseminadas com sêmen congelado. No momento da inseminação os animais foram avaliados quanto ao tamanho do folículo e seu grau de irrigação. Os folículos 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, na qual foram feitas avaliações bidimensional e Doppler em todos os exames. A circulação sanguínea foi avaliada em tempo real, quando obtido o maior diâmetro e melhor circulação do folículo dominante, e classificadas em graus de 1 a 5. Trinta dias após a inseminação artificial o diagnóstico de gestação foi realizado. A média do diâmetro do folículo dominante entre as vacas prenhes e vazias foi avaliada pelo teste de Mann-Whitney. A comparação estatística do diâmetro do folículo dominante nos diferentes graus de irrigação no momento da inseminação artificial foi obtida pelo teste Kruskal-Wallis. Para porcentagem de prenhez foi realizado o teste Qui Quadrado. Quando a taxa de prenhez foi avaliada considerando a irrigação os animais que apresentaram grau 4 (60 a 80% de fluxo sanguíneo na parede do folículo) apresentaram maior taxa de gestação (72,5%) do que os Grau 1, (43,9%); Grau 2, (38,9%) Grau 3 (57,7%) e Grau 5 (60%). Com relação à média do diâmetro folicular das vacas que ficaram prenhes apenas as que apresentaram grau 2 de irrigação ($9,25 \pm 1,42$) tiveram diferença ($P < 0,05$) em relação aos demais grupos, Grau 1 ($10,46 \pm 2,13$) Grau 2 ($9,25 \pm 1,42$); Grau 3 ($10,10 \pm 1,76$); Grau 4 ($11,20 \pm 1,70$); Grau 5 ($12,18 \pm 1,24$). Foi observada diferença ($p < 0,05$) no diâmetro do folículo dominante quando comparadas vacas vazias e vacas prenhes (vazia, $9,11 \pm 2,89$ e prenhe, $10,33 \pm 2,20$). A taxa de prenhez total foi 54,6%, diferente ($P < 0,05$) da taxa dos animais do grupo grau 4 (72,5%). De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho pode-se concluir que a irrigação do folículo no momento da IA afeta a taxa de prenhez.

Palavras chaves: ovulação, prenhez, grau de irrigação, sincronização da ovulação, taxa de gestação.

ABSTRACT

INFLUENCE OF IRRIGATION FOLLICLE PREEVULATORY IN PREGNANCY RATE

Fernanda Beserra de Almeida¹, Bianca Damiani Marques Silva², Margot Alves Nunes Dode² ¹Veterinary, Brasília-DF, Brazil, ²Reseacher, Brasília-DF, Brazil,

The objective of this study was to evaluate if there is influence of irrigation on the preovulatory follicle at the time of the TAI on the pregnancy rate. The experiment was carried out in two distinct farms, Fazenda Grande (Guapó) and Fazenda Vale do Ouro (Palmeiras), located in the center of the State of Goiás, where 209 nellor cows received on a random day of the estrous cycle an intravaginal device impregnated with 1g progesterone (PRIMER®, Tecnopec, São Paulo -SP), administered 2 mg of BE (RIC-BE, Tecnopec, São Paulo - SP) IM and 250µg of PGF2α (Sincrocio®, Ouro Fino Saúde Animal Ltda, Cravinhos SP, Brazil), being considered this day D0. In D8 was removed the intravaginal device, applied 300 UI of eCG (FOLLIGON®, MSD Saúde Animal, São Paulo, SP) IM, 500 µg l of PGF2α IM (Sincrocio®, Ouro Fino Saúde Animal Ltda, Cravinhos-SP, Brazil) and 1mg of CE IM(SincroCP, Ouro Fino Saúde Animal Ltda, Cravinhos-SP, Brazil), 48 hours after removal of the device the cows were inseminated with frozen semen. At the time of insemination animals were evaluated for the size of the follicle and its degree of irrigation. The follicles were evaluated by transrectal ultrasonography using a two-dimensional Doppler ultrasound (MyLab TM 30GoldVET, Esaote S.p.A., Firenze, Italy) equipped with a multi-frequency linear transducer, in which two-dimensional and Doppler evaluation were performed in all examinations. The blood circulation was evaluated in real time, when the largest diameter and better circulation of the dominant follicle was obtained, and classified in degrees from 1 to 5. Thirty days after artificial insemination, the diagnosis of gestation was

performed. The mean of the dominant follicle diameter between pregnant and not pregnant cows was evaluated by the Mann-Whitney test. The statistical comparison of the diameter of the dominant follicle in the different degrees of irrigation at the time of artificial insemination was done by the Kruskal-Wallis test. The Qui Quadrado test was performed for pregnancy rate. When comparing the degree of irrigation with the pregnancy rate (Grade 1, 43.9%^A, Grade 2, 38.9%^A, Grade 3, 57.7%^B, Grade 4, 72.5%^C and Grade 5, 60%^B) animals that presented grade 4 (60 to 80% of blood flow detection in the wall of the follicle) obtained higher rates of gestation. Regarding the mean of the follicular diameter of the cows that were pregnant, only those that presented grade 2 of irrigation had difference (Grade 1, 10.46 ± 2.13 ^A, Grade 2, 9.25 ± 1.42 ^B, Grade 3, 10.10 ± 1.76 ^A, Grade 4, 11.20 ± 1.70 ^A, Grade 5, 12.18 ± 1.24 ^A). A difference was observed in the diameter of the dominant follicle when compared not pregnant and pregnant cows (not pregnant, 9.11 ± 2.89 ^A and pregnant, 10.33 ± 2.20 ^B). The total pregnancy rate was 54.6%, different ($P < 0.05$) of animals from degree 4 group (72.5%). According to results in this work can be concluded that there is influence of irrigation on pregnancy rate.

Keywords: ovulation, pregnancy, degree of irrigation, synchrony of ovulation, pregnancy rate.

1 INTRODUÇÃO

A indústria da carne é um setor que vem tomando destaque no Brasil e a produção crescendo cada vez mais. Das exportações brasileiras a exportação de carne bovina representa 3% do total, com um faturamento de 6 bilhões de reais. Isso representa 30% do PIB (produto interno bruto) do agronegócio ou 6% do PIB do país, tendo um movimento superior a 400 bilhões de reais, com aumento de cerca de 45% nos últimos 5 anos (Gomes et al., 2017). No entanto a baixa eficiência reprodutiva do rebanho nacional ainda é um gargalo para o crescimento sustentável na pecuária de corte (Baruselli, 2016). Em vacas de corte considerando um total de 78 milhões de fêmeas em idade reprodutiva, a produção de bezerros é de apenas 57,6 milhões ao ano (ANUALPEC, 2014). Na tentativa de melhorar a produtividade do rebanho nacional, inúmeras biotécnicas reprodutivas estão sendo utilizadas, dentre elas a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) a qual elimina a necessidade de observação de estro, possui fácil manejo, merecendo destaque por aumentar a eficiência reprodutiva e a genética na pecuária.

Visto que para realizar IATF é necessário ter gastos com hormônios, sêmen de qualidade, adoção de instrumentos (bainhas, botijão de nitrogênio, aplicador, descongelador de sêmen) e mão de obra qualificada para que esses animais sejam inseminados em um curto espaço de tempo e que nem sempre os resultados são imediatos e satisfatórios, principalmente quando comparados a monta natural (prenhes/ inseminação artificial variam de 40 a 60%) (Pfeifer et al., 2015), torna um entrave para o produtor implantar essa biotecnologia em sua propriedade.

Sabendo-se que o sucesso da IATF depende da sincronização da IA com o horário da ovulação, vários estudos têm sido realizados para determinar o melhor momento para inseminar e obter melhores taxas de concepção. Uma forma de determinar o momento mais adequado para inseminar é fazendo o acompanhamento da hemodinâmica folicular

utilizando a ferramenta Doppler, pois se sabe que o pico máximo de perfusão do folículo precede a ovulação (Meneghetti et al., 2009) em 12 horas (Scaliante et al., 2015) e que há uma clara diferença na vascularização da parede de folículos pré-ovulatórios em comparação com a de folículos anovulatórios (Acosta et al., 2003). Com o acompanhamento da circulação do folículo no momento da IATF pode ser possível relacionar a perfusão sanguínea folicular com a taxa de prenhez, no qual folículos com maiores hemodinâmicas no momento da IA serão aqueles que vão obter maiores taxas de prenhez, independente do diâmetro folicular. A ultrassonografia doppler pode ser uma ferramenta importante para melhorar índices de programas de IATF e para validação de protocolos de sincronização.

O objetivo desse estudo é avaliar a perfusão sanguínea do folículo pré-ovulatório no momento da IATF.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e amostra

2.1.1 Fazenda Grande

Foram utilizadas 135 vacas da raça nelore (*Bos taurus indicus*) apresentando escore de condição corporal 2 – 3 (em escala de 1-5). Esse estudo foi conduzido na Fazenda Grande localizada no Município de Guapó, no centro do Estado de Goiás, com coordenadas 16° 49' 56" S 49° 32' 18" W.

2.1.2 Fazenda Vale do Ouro

Outra parte do experimento foi realizada na mesma época na fazenda Vale do Ouro, localizada no município de Palmeiras de Goiás, com coordenadas 16°48'18"S 49°55'33"W.

Nessa fazenda foram utilizadas 74 vacas da raça nelore (*Bos taurus indicus*) apresentando escore de condição corporal 2 – 3 (em escala de 1-5).

Todos os animais com cria ao pé foram mantidos em pastagem de braquiária com sal mineral e água a vontade durante todo o experimento.

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 002/2019

2.2 Delineamento experimental

Foram utilizados um total de 209 animais em um protocolo de IATF que consistia em um dispositivo intravaginal impregnado com 1g de progesterona (PRIMER®, Tecnopec, São Paulo -SP), administrado 2 ml de BE (RIC-BE, Tecnopec, São Paulo – SP) IM e 250µg IM de PGF2α (Sincrocio®, Ouro Fino Saúde Animal Ltda, Cravinhos-SP, Brasil) no D0. No D8 foi retirado o dispositivo intravaginal, aplicado 300 UI de eCG (gonadotrofina coriônica equina, FOLLIGON®, MSD Saúde Animal, São Paulo, SP) IM, 500 µg ml IM de PGF2α (Sincrocio®, Ouro Fino Saúde Animal Ltda, Cravinhos-SP, Brasil) e 1mg IM de CE (SincroCP, Ouro Fino Saúde Animal Ltda, Cravinhos-SP, Brasil), 48 horas após a retirada do dispositivo as vacas foram inseminadas com sêmen congelado.

2.3 Ultrassonografia e avaliação do fluxo sanguíneo

No momento da inseminação os animais foram avaliados quanto ao diâmetro do folículo e seu grau de irrigação. Os folículos 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, na qual foram feitas avaliação bidimensional e Doppler em todos os exames. Utilizou-se a abordagem de exibição de fluxo colorido em cima da imagem modo B, pois nessa abordagem a avaliação é feita em tempo real e de julgamento subjetivo do operador, sendo considerada uma avaliação confiável dos sinais coloridos (Ginther, 2007) tornando essa técnica facilmente aplicada no campo.

A circulação sanguínea foi avaliada em tempo real, quando obtido o maior diâmetro e melhor circulação do folículo dominante, e classificada em graus de 1 a 5, no qual grau 1 compreende detecção da 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.

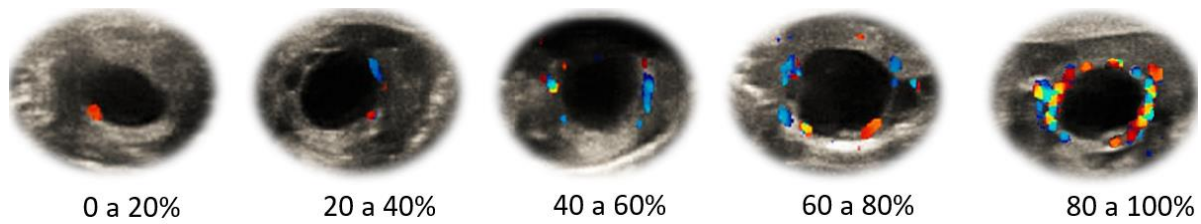


Figura 3.1 - Alteração do fluxo sanguíneo na parede do folículo pré-ovulatório. Quanto mais se aproxima o momento da ovulação mais intenso se torna a vascularização, sendo considerado grau 1 de ao 20%, grau 2 de 20 a 40%, grau 3 de 40 a 60%, grau 4 de 60^a 80% e grau 5 de 80 a 100% de detecção de fluxo sanguíneo na parede do folículo.

Trinta dias após a inseminação artificial o diagnóstico de gestação foi realizado, visualização da vesícula embrionária e detecção do embrião foram os critérios positivos para determinar a prenhez.

2.4 Análise estatística

A média do diâmetro do folículo dominante entre as vacas prenhez e vazias foi avaliada pelo teste de Mann-Whitney. Os animais foram divididos em grupos de acordo com o grau de irrigação do folículo pré-ovulatório no momento da IA, a comparação estatística do diâmetro do folículo dominante nos diferentes graus de irrigação foi obtida pelo teste Kruskal-Wallis e para porcentagem de prenhez foi realizado o teste Qui Quadrado, com auxílio do programa Prophet 5.0. Foi considerado grau de significância $P < 0,05$.

3 RESULTADOS

Quando comparado a taxa de prenhez entre os diferentes graus de irrigação, pode-se observar que os animais que apresentaram grau 4 obtiveram maiores taxas de gestação. Com relação à média do diâmetro folicular das vacas que ficaram prenhes apenas as que apresentaram grau 2 de irrigação tiveram diferença estatística. Dados esses expressos na tabela 3.1.

Tabela 3.1 Resultados referentes a taxa de prenhez e diâmetro folicular no momento da IATF de acordo com o grau de irrigação.

Grau de irrigação	Número de animais	Diâmetro folicular (média±D.P.)	Prenhez (%)
1	78	10,46±2,13 ^A	43,9 ^A
2	36	9,25±1,42 ^B	38,9 ^A
3	45	10,10±1,76 ^A	57,7 ^B
4	40	11,20±1,70 ^A	72,5 ^C
5	10	12,18±1,24 ^A	60 ^B

Grau 1 compreende detecção da 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.

^{A,B,C} valores com letras diferentes são significativamente diferente (p<0,05)

O diâmetro do folículo dominante foi menor nas vacas vazias quando comparado as vacas prenhes.

Tabela 3.2 Comparação da média do diâmetro do folículo dominante no momento da IATF entre vacas prenhes e vazias.

	Número de animais	Diâmetro folicular (média±D.P.)	Porcentagem
Prenhe	108	10,33 ± 2,20 mm ^A	54,6%
Vazia	101	9,11 ± 2,89 mm ^B	45,4,%

^{A,B} valores com letras diferentes são significativamente diferente (p<0,05)

4 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo estão de acordo com a hipótese levantada inicialmente de que a maior taxa de prenhez irá ocorrer em folículos que possuem maior perfusão sanguínea no momento da IATF, independente do seu tamanho.

O grupo de animais que obteve maiores taxas de prenhez (72,5%) foi o que apresentou grau 4, ou seja, 60 a 80% de irrigação sanguínea na parede do folículo no momento da IATF. Dados esses corroboram com estudos de Acosta et al. (2003) onde demonstraram que a vascularização folicular e a velocidade do fluxo sanguíneo podem ser usadas para identificar folículos saudáveis, bem como prever a proximidade da ovulação. Existe uma relação positiva entre o fluxo sanguíneo na parede do folículo e a concentração plasmática de estradiol e LH no período periovulatório em vacas. Acosta & Miyamoto (2004) demonstraram que o primeiro aumento detectável na concentração de estradiol plasmático coincidiu com o aumento na vascularização na parede do folículo. No entanto, os mecanismos que levam a hiperemia induzida pelo LH ainda são desconhecidos. O LH não tem um efeito vascular direto (Varga et al., 1985), Acosta et al. (1999) postularam um papel mediador de substâncias vasoativas que são liberadas durante a estimulação do LH no folículo pré-ovulatório bovino. Substâncias vasoativas estas que desempenham papéis importantes na ovulação bem como no início do desenvolvimento do CL, pois modulam a secreção local de prostaglandinas e hormônios esteroides (Acosta et al., 1999,2000; Kobayashi et al., 2002).

Como pode-se observar, os animais que apresentaram grau 1 (43,9%), grau 2 (38,9%), e grau 3 (57,7%) obtiveram taxas de prenhez significativas também não podendo esses animais serem desprezados da inseminação artificial. No momento da avaliação os folículos ainda teriam cerca de 24 horas para a ovulação, tendo tempo para ocorrer aumento do diâmetro e da circulação sanguínea. Esses animais poderiam ter a inseminação artificial

adiada por algumas horas levando em consideração que vão demorar um pouco mais para atingirem circulação total e posteriormente ovularem, podendo aumentar a taxa de concepção.

Com relação aos graus 4 e 5 que seriam considerados os graus ideais para inseminar os animais, pois se sabe que há maiores taxas de prenhez se a inseminação é realizada próxima a ovulação e que o pico máximo de perfusão do folículo precede à ovulação (Meneghetti et al., 2009), no presente estudo o grau 5, aquele que tem de 80 a 100% de detecção de fluxo sanguíneo na parede do folículo, apresentou 60% de taxa de prenhez, a menor taxa identificada em relação ao grupo grau 4, isso se deve ao momento da ovulação, pois folículos que atingem grau 5 ovulam cerca de 12 horas após (Scalante et al., 2015), ou seja, os folículos avaliados no momento da IA com grau 5 ovularam antes da hora estimada, não tendo tempo portanto para que o espermatozoide chegasse ao sítio de fecundação e ocorresse a capacitação, provavelmente encontrando folículos já envelhecidos.

Utilizando a ferramenta Color Doppler no momento da inseminação é possível saber em qual estágio de desenvolvimento o folículo se encontra. Os folículos que apresentam irrigação grau 1 (0 a 20% de fluxo sanguíneo na parede do folículo) no momento da inseminação ainda estão em início de desenvolvimento quando deveriam estar mais avançados. Por outro lado, os folículos que apresentam grau 5 (80 a 100% de fluxo sanguíneo na parede do folículo) já estão com seu desenvolvimento muito avançado o que também prejudica as taxas de prenhez, pois esses folículos provavelmente irão ovular antes do momento previsto, o que não reflete em boa taxa de concepção. Diante dessas informações, a visualização da vascularização de folículos pré-ovulatórios utilizando o ultrassom Color Doppler no momento da inseminação seria uma importante ferramenta para validar protocolos de IATF e a possibilidade de ser usado em rebanhos leiteiros.

Quando comparado o diâmetro dos folículos apenas das vacas prenhes separados por grau de irrigação (tabela 3.1) o que pode ser observado é que não houve diferença entre os diâmetros foliculares, exceto o grupo grau 2 e os animais que tiveram maiores taxas de prenhez apresentaram irrigação 4, demonstrando ser mais confiável avaliar a vascularização folicular do que o diâmetro para determinar o momento mais próximo da ovulação. Isso ocorre pelo fato de o crescimento do fluxo sanguíneo na parede do folículo aumentar em um ritmo bem maior próximo ao pico de LH do que o diâmetro folicular no período pré-ovulatório, pois o folículo nesse estágio já está com um tamanho médio próximo do tamanho ovulatório (Ginther, 2007). Segundo Scalante et al. (2015) independente do protocolo a ser utilizado, todos os folículos que atingem circulação grau 5 chegam a ovular com uma média de 12 horas.

Embora o protocolo de sincronização da ovulação utilizado nesse estudo seja um método eficaz e bem estabelecido, existe uma grande variação com relação ao tamanho dos folículos no final do protocolo (Bo et al., 2003). Isso se dá devido ao intervalo de tempo (3 a 6 dias) sobre o qual ocorre o desenvolvimento de uma nova onda folicular (Bo et al., 2003; Kim et al., 2005; Martinez et al., 2005). Portanto, no momento da IATF, a vida útil do folículo pré-ovulatório pode se estender de 4 a 7 dias (da emergência da onda até a IATF), explicando essa variação no tamanho dos folículos no momento da inseminação. Com base nessas informações é necessário que haja intervalos diferentes entre a remoção da fonte de progesterona e a IATF com base no tamanho folicular, pois folículos menores ovulam mais tarde quando comparado a folículos maiores, havendo uma melhor sincronia entre o momento da ovulação e a IATF, melhorando assim a probabilidade de prenhez (Pfeifer et al, 2015).

Quando se avalia apenas o diâmetro do folículo dominante no momento da inseminação, pode-se observar que animais que apresentaram folículos de maior diâmetro tiveram maiores taxas de prenhez (tabela 3.2). Porém, é uma taxa de gestação pequena (54,6%) ($P < 0,05$) em relação a taxa de gestação dos animais do grupo irrigação grau 4 (72,5%), ou seja, do grupo que os animais no momento da IA possuíam irrigação em 60 a 80% da parede dos folículos pré-ovulatórios. Observa-se que é mais fidedigno avaliar o grau de irrigação para prever o momento da ovulação do que apenas o diâmetro do folículo e pode-se afirmar que essa avaliação pode trazer resultados melhores para taxa de prenhez.

Embora estudos anteriores tenham correlacionado perfusão folicular com o momento da ovulação de folículo pré-ovulatórios (Acosta et al., 2003; Pfeifer et al., 2016; Scaliante et al., 2015) este é o primeiro relato a demonstrar que folículos que apresentam irrigação sanguínea entre 60 e 80 % de sua parede tem maior probabilidade de gerar prenhez (72,5%).

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho pode-se concluir que há influência da irrigação na taxa de prenhez. A avaliação da circulação do folículo no momento da inseminação pode ser mais precisa do que a avaliação do diâmetro folicular para obter maiores taxas de prenhez.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, T. J. et al. Evidence for a local edothelin-angiotensin-atrial natriuretic peptide systemin bovine mature follicles in vitro: effects on steroid hormones and prostaglandin secretion. **Biology Reproduction**, v. 61, n. 6, p. 1419–1425, 1999.

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.

ANUALPEC. **Anuário da pecuária Brasileira**. FNP. 364p, 2014.

BARUSELLI, P. S. IATF supera dez milhões de procedimentos e amplia o mercado de trabalho. **Revista CFMV**, v.69, p. 57–60, 2016.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTÍNEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3–4, p. 307–326, 2003.

GOMES, R. DA C.; FEIJÓ, G. L. D.; CHIARI, L. Evolução e Qualidade da Pecuária Brasileira. Nota técnica, **Embrapa**, p. 4, 2017.

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

KIM, U. H. et al. Follicular wave emergence, luteal function and synchrony of ovulation following GnRH or estradiol benzoate in a CIDR-treated, lactating Holstein cows. **Theriogenology**, v. 63, n. 1, p. 260–268, 2005.

- KOBAYASHI, S. I. et al. Intraluteal release of angiotensin II and progesterone in vivo during corpora lutea development in the cow: effect of vasoactive peptides. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 1, p. 174–179, 2002.
- MARTÍNEZ, M. F. et al. 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, n. 1–2, p. 37–52, 2005.
- MENEGHETTI, M. et al. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 179–189, 2009.
- PFEIFER, L. F. M. et al. Timed artificial insemination in blocks: a new alternative to improve fertility in lactating beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 163, p. 89–96, 2015.
- PFEIFER, L. F. M. et al. Prostaglandin F₂ α or estradiol benzoate to induce ovulation in timed artificially inseminated dairy cows. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 51, n. 6, p. 738–744, 2016.
- VARGA, B.; STARK, E. Study ovarian of the luteinizing blood hormone-Induced the estrous of sciences increase cycle of during in the rat flow. **Biology of Reproduction**, p. 480–488, 1985.
- SCALIANTE, J.R. et al. Blood perfusion in preovulatory follicle in Nelore cows under FTAI protocols. **Animal Reproduction**, v. 12, n. 3, p. 598, 2015.

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sabendo-se que a Comunidade Europeia extinguiu o uso do 17β estradiol e seus ésteres por serem considerados carcinógenos completos e que o Brasil é o maior produtor e líder global de exportação de carne bovina é necessário o estudo de alternativas que possam substituir o uso desses ésteres nos protocolos convencionais de IATF. Diante disso, o objetivo do primeiro trabalho foi avaliar a substituição do benzoato de estradiol pela $PGF2\alpha$ como indutor de ovulação em protocolos de IATF. Os resultados sugerem que a $PGF2\alpha$ tem potencial como indutor de ovulação em protocolos de IATF, embora haja um aumento no intervalo para a ovulação.

Sabendo-se que o sucesso da IATF depende da sincronização da IA com o horário da ovulação, vários estudos têm sido realizados para determinar o melhor momento para inseminar e obter melhores taxas de concepção. Com base nessa informação o objetivo desse estudo foi avaliar se há influência da irrigação do folículo pré-ovulatório no momento da IATF na taxa de prenhez, podendo-se concluir que é mais fidedigno avaliar o grau de irrigação para prever o momento da ovulação do que apenas o diâmetro do folículo e podendo afirmar que essa avaliação pode trazer resultados melhores para taxa de prenhez.