



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Br 222, Km 04, Bairro Boa Vista, Chapadinha-MA
Telefone (98) 32729902 E-mail: ppgca@ufma.br
Homepage: <http://www.ppgca.ufma.br>



**EFEITO DO ESCORE DO TRATO REPRODUTIVO NA DINÂMICA FOLICULAR E
DOPPLERFLUXOMETRIA ÚTERO-OVARIANA EM NOVILHAS NELORE (*Bos
indicus*)**

ITAMARA GOMES DE FRANÇA

Chapadinha
2016



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Br 222, Km 04, Bairro Boa Vista, Chapadinha-MA
Telefone (98) 32729902 E-mail: ppgca@ufma.br
Homepage: <http://www.ppgca.ufma.br>



ITAMARA GOMES DE FRANÇA

**EFEITO DO ESCORE DO TRATO REPRODUTIVO NA DINÂMICA FOLICULAR E
DOPPLERFLUXOMETRIA ÚTERO-OVARIANA EM NOVILHAS NELORE (*Bos
indicus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof^o. Dr^o. José Ribamar de Souza Torres Júnior

Chapadinha

2016



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Br 222, Km 04, Bairro Boa Vista, Chapadinha-MA
Telefone (98) 32729902 E-mail: ppgca@ufma.br
Homepage: <http://www.ppgca.ufma.br>



França, Itamara Gomes
**Efeito do escore do trato reprodutivo na dinâmica folicular e
dopplerfluxometria útero-ovariana em novilhas nelore (*Bos indicus*)** /Itamara
Gomes de França – Chapadinha, 2016. 70F.

Orientador: Profº Dr. José Ribamar de Souza Torres Junior
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal, 2016.

ITAMARA GOMES DE FRANÇA

**EFEITO DO ESCORE DO TRATO REPRODUTIVO NA DINÂMICA FOLICULAR E
DOPPLERFLUXOMETRIA ÚTERO-OVARIANA EM NOVILHAS NELORE (*Bos
indicus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Aprovada em 31/08/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Ribamar de Souza Torres Júnior (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr José Adalmir Torres de Souza (1º Membro)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Zinaldo Firmino da Silva (2º Membro)
Universidade Federal do Maranhão

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, por sempre me amparar e se mostrar presente em minha vida, especialmente nas horas mais difíceis, renovando minha fé;

Aos meus pais que tanto amo, Edmilson e Raquel pela dedicação, carinho e apoio incondicional em todos os momentos sempre me apoiando, incentivando e me ajudando a enfrentar as mais variadas situações;

A minha irmã e “melhor amiga”, Mara, por estender suas mãos quando precisei, pelo amor e carinho de irmãs que existe entre nós. Você é, sempre foi e continuará sendo minha maninha. Eu amo você!

A minha sobrinho lindo, Miguel, que chegou em minha vida em um dos momentos mais difíceis, e fez todas as dificuldades se tornarem insignificantes sempre que olhei seu rostinho alegre;

Ao meu cunhado, Pedrinho, pela paciência e por sempre estar disposto a ajudar sempre que precisei;

Ao meu orientador, Prof. Torres, que me proporcionou esta oportunidade, pela credibilidade e confiança. Por compartilhar e auxiliar na realização de meus objetivos, pela compreensão em todos os momentos e, principalmente, pela firmeza nas horas necessárias, me conduzindo sempre pelo melhor caminho.

A minha amiga companheira de todas as horas, Hélyda, por estar sempre comigo no momentos de alegria, de tristeza “foram tantos”, a cada “ANOVA” que resolvemos juntas, noites que viramos estudando, às viagens para as fazendas “experimentos, treinamentos”, às festas, e por me aguentar todo esse tempo. “Companheira é companheira”.....

Aos meus amigos Rasgados, Dr. Cícero, Diego Sarmento, Aline, Douglas “Jr”, Joaquim Gente e Joaquim não Gente e Larissa Sarmento, por sempre estarem presentes em minha vida acadêmica e pessoal;

Ao meu amigo Douglas Dadalto por todo apoio no início do mestrado, amizade e principalmente pelas inúmeros vezes que me fazia rir sempre que eu queria chorar;

Aos meus “filhos”, Felipe e Neném por todo carinho, atenção e amor em todos os momentos;

À fazenda Igarapé por me conceder os animais para a realização de meu experimento;

Aos meus amigos do PPGCA Karlyene, Jéssica “Marri é claro”, Ray, Francisca, Tales, Lucas, Jeje e Lêndia, pelo ótimo convívio e pelos bons momentos durante todo o período que estive neste programa;

À CAPES e FAPEMA pelo indispensável apoio financeiro para o meu desenvolvimento científico.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Puberdade em fêmeas bovinas.....	14
2.2 Fatores que influenciam para o início da puberdade	15
2.2.2 <i>Fatores Genéticos</i>	<i>16</i>
2.2.3 <i>Peso e nutrição.....</i>	<i>18</i>
2.3 Hormônios	20
2.4 Escore do trato reprodutivo (ETR) em novilhas.....	20
2.5 Ultrassonografia na avaliação do trato reprodutivo de fêmeas	23
2.6 Ultrassonografia Doppler	24
2.1.1 <i>Doppler Pulsado ou Espectral</i>	<i>25</i>
2.1.2 <i>Color e Power Doppler</i>	<i>26</i>
2.1.3 <i>Índices Doppler.....</i>	<i>27</i>
2.8 Ultrassonografia Doppler na avaliação do trato reprodutivo de fêmeas	29
2.9 Hemodinâmica uterina, ovariana e luteal.....	29
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Local e animais experimentais	33
4.2.1 <i>Caracterização do escore do trato reprodutivo (ETR).....</i>	<i>34</i>
4.2.2 <i>Protocolo de sincronização da ovulação</i>	<i>35</i>
4.2.3 Avaliações Ultrassonográficas em modo-B, Color Doppler e Espectral Doppler	37
4.3 Concentrações plasmáticas de estradiol (E2) e progesterona (P4)	40
4.4 Análise estatística	40
5 RESULTADOS	42
7 SUMÁRIO DE RESULTADOS.....	59
8 CONCLUSÃO	59
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BE	Benzoato de estradiol
CL	Corpo lúteo
E2	Estradiol
ECC	Escore de condição Corporal
eCG	Gonadotrofina Coriônica Equina
EM	Estação de monta
ETR	Escore do trato reprodutivo
FD	Folículo dominante
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IP	Índice de pulsatilidade
IR	Índice de resistência
Kg	Quilograma
mg	Miligrama
mL	Mililitros
ng	Nanograma
P4	Progesterona
pg	Picograma
PGF	Prostaglandina
PS	Velocidade do pulso sistólico
TAMV	Taxa de velocidade máxima
VD	Velocidade diastólica
UI	Unidade internacional
US	Ultrassonografia
USD	Ultrassonografia Doppler

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Diâmetro (mm) do corno uterino e do folículo dominante (média $\pm$ EPM) de novilhas Nelore com escore do trato reprodutivo (ETR) 1,2 e 3 nos dias zero (D0) e dez (D10) do protocolo.	40
Tabela 2.	Características hemodinâmicas (média $\pm$ EPM) do corno uterino e ovário de novilhas Nelore com escore do trato reprodutivo (ETR) 1,2 e 3 nos dias zero (D0) e dez (D10) do protocolo.	43
Tabela 3.	Características hemodinâmicas (média $\pm$ EPM) do corno uterino e ovário de novilhas Nelore com e sem corpo lúteo	44
Tabela 4.	Coeficientes de determinação e significância entre o escore do trato reprodutivo (ETR) e variáveis correlacionadas.	45
Tabela 5.	Coeficientes de determinação e significância entre diâmetro do corno uterino, folículo dominante e variáveis correlacionadas	45
Tabela 6.	Coeficientes de determinação e significância entre variáveis dopplerfluxométricas e variáveis correlacionadas.	46
Tabela 7.	Coeficientes de determinação e significância entre as concentrações plasmáticas de Progesterona (D0), Estradiol (D10) e variáveis correlacionadas.	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Protocolo de sincronização da ovulação e exames ultrassonográficos.	35
Figura 2.	Exemplo de uma imagem obtida em modo de Doppler colorido a partir do ovário (A) e a mesma imagem editada (B).	37
Figura 3.	Exemplo de uma imagem obtida em modo de Doppler Espectral a partir de arteríolas uterinas para obtenção do índice de pulsatilidade (IP), índice de resistência (IP), velocidade do pulso sistólico (VPS), velocidade diastólica final (EDV) e taxa de velocidade máxima e média (TAMV).	37
Figura 4.	Taxa de ovulação de novilhas nelore de acordo com o escore do trato reprodutivo (ETR).	41
Figura 5.	Concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) no dia zero(D0) do protocolo de novilhas Nelore de acordo com o escore do trato reprodutivo (ETR).	47
Figura 6.	Concentrações plasmáticas de estradiol (pg/mL) no dia dez (D10) do protocolo de novilhas Nelore de acordo com o escore do trato reprodutivo (ETR).	47

RESUMO

Objetivou-se com este estudo avaliar o efeito do escore do trato reprodutivo (ETR) na dinâmica folicular e dopplerfluxometria útero-ovariana em novilhas da raça nelore (*Bos indicus*). Utilizou-se 34 fêmeas que foram classificadas em três categorias, de acordo com o ETR: ETR 1 (novilhas com diâmetro dos cornos uterinos <15mm e com folículos de diâmetro <8mm; ETR2 (novilhas com diâmetro dos cornos uterinos ≥ 15mm e folículos ≥8 mm e; ETR3 (novilhas com diâmetro dos cornos uterinos ≥15mm e presença de corpo lúteo (CL). Em seguida, foram sincronizadas com protocolo à base de progestágeno/estradiol/prostaglandina para padronização do *status* folicular e luteínico. O acompanhamento da dinâmica folicular e fluxometria útero-ovariana foram realizadas por ultrassonografia (US) nos modos bidimensional, color doppler e espectral doppler em 3 períodos pré-determinados: Dia 0 (D0; inserção do implante auricular); Dia 10 (D10; detecção folículo pré-ovulatório) e; Dia 18 (D18; determinação da ovulação por meio da detecção do corpo lúteo). O diâmetro uterino apresentou um aumento significativo entre o D0 e D10 em ambas as categorias. A taxa de ovulação foi maior no ETR 3 ($P<0,05$). Não houve efeito de ETR ou dia de exame na área de vascularização e número de pixels no ovário ($P>0,05$). Na fase de dominância folicular (D10), a maior perfusão ocorreu no ETR2, seguida pelos ETRs 1 e 3, respectivamente ($P<0,05$). O IP e o IR uterinos não foram influenciados pelo ETR nem pelo dia do exame ($P>0,05$). Entretanto, quando estes mesmos índices foram avaliados no ovário, nota-se que o RI manifestou efeito significativo do ETR e interação ETR x dia do exame ($P=0,02$). As concentrações plasmáticas de progesterona ao início do experimento (D0) foram maiores no ETR 3 ($P<0,05$) e o estradiol não diferiu significativamente entre as categorias ($P<0,05$) na fase de dominância folicular sincronizada (D10). Conclui-se que o ETR influencia no crescimento folicular, na taxa de ovulação e na vascularização dos cornos uterinos.

Palavras-chave: Bovinos, Puberdade, Fluxo sanguíneo, Doppler.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of the reproductive tract scoring (RTS) on follicular dynamics and utero-ovarian doppleflowmetry in *Bos indicus* heifers of nelore. Were used 34 females cattle the females were classified into three categories, according to RTS: RTS 1 (diameter of the uterine horns <15 mm and diameter of follicles <8 mm; RTS 2 (diameter of the uterine horns $\geq$ 15mm and follicles $\geq$ 8 mm; RTS3 (diameter of the uterine horns $\geq$ 15mm and presence of CL). Then, were synchronized with progestin/estradiol-based protocol, plus prostaglandin, for padronization of the follicular and luteal status. The monitoring of the follicular dynamics and utero-ovarian flowmetry was performed by B-mode, color doppler and spectral doppler ultrasonography during three times: Day 0 (D0; ear implant insertion); Day 10 (D10, detection preovulatory follicles) and; Day 18 (D18; determination of ovulation by detection of corpora lutea). The uterine diameter showed a significant increase between D0 and D10 in both categories. The ovulation rate was higher in the RTS 3 ($P<0.05$). There was no effect of RTS nor of examination day on vascularity and number of pixels of the the ovary ($P>0.05$). In the follicular dominance phase (D10), the higher vascularization occurred in RTS2, followed by RTS 1 and 3, respectively ($P<0.05$). The uterine PI and RI were not affected by RTS nor by the examination day ($P>0.05$). However, when these same rates were evaluated in the ovary, the RI showed significant effect of RTS and RTS x day ($P=0.02$). Progesterone concentrations at the beginning of trial (D0) were higher in the RTS 3 ($P<0.05$) and estradiol did not differ significantly between categories ($P<0.05$) at day of follicular dominance (D10). It was concluded that RTS influences the follicular growth, ovulation rate and vascularization of the uterine horns.

Keywords: Cattle, Puberty, Blood flow, Doppler.

1. INTRODUÇÃO

Em bovinocultura, seleção de fêmeas jovens com base nas características reprodutivas tem grande impacto na eficiência do sistema de produção (RESTLE et al., 1999). As novilhas de reposição são necessárias para manter estável o tamanho do rebanho e permitir o melhoramento de sua base genética (BAGLEY, 1993). Para identificação de fêmeas aptas a serem inseridas na estação monta (EM), deve-se levar em consideração o peso adequado para o acasalamento, a idade e o biotipo, deve-se avaliar características, como desenvolvimento do trato reprodutivo e início de atividade ovariana cíclica (SEMMELMANN et al., 2001).

Devido à variabilidade existente mesmo entre animais padrão genético similar e sob mesmas condições de manejo, não é possível determinar com precisão o momento em que as novilhas atingirão a puberdade (ANDERSON et al., 1991).

Apesar da seleção de novilhas de reposição com base na idade à puberdade ser desejável devido sua associação com a fertilidade e com o tempo de vida produtiva (KASIMANICKAM et al., 2016), o uso do escore do trato reprodutivo (ETR) é um parâmetro mais preciso que possibilita antecipar e direcionar estratégias de manejo específicas ao grau de maturidade de cada novilha (HOLM et al., 2009).

A avaliação do ETR é um método desenvolvido por pesquisadores da Universidade do Colorado - EUA como método indicador da puberdade em novilhas (ANDERSON et al., 1991). Seu registro original, baseado na palpação retal, estimava subjetivamente o escore de acordo com o grau de maturidade do ovário e dos cornos uterinos, predizendo o estado de maturidade das novilhas a serem acasaladas (PATTERSON et al., 1999). Neste modelo, a determinação do ETR era complementada pela mensuração ultrassonográfica de estruturas ovarianas (ANDERSON et al., 1991).

A utilização da ultrassonografia (US) em modo bidimensional (modo-B) associado à palpação retal tem como função identificar e medir estruturas ovarianas com maior exatidão em relação à palpação retal e reduzir a probabilidade de erros sobre o desenvolvimento reprodutivo em novilhas de corte (ROSENKRANS; HARDIN, 2003).

A US Doppler adiciona informações do fluxo sanguíneo sobrepostas a uma imagem ultrassonográfica em modo-B, possibilitando coletar informações anatômicas e funcionais do local de interesse (GINTHER e UTT, 2004). A US Doppler para a

avaliação da vascularização é uma técnica que possibilita o maior conhecimento da condição anatomofisiológica dos órgãos genitais, em todas as fases do ciclo estral (MIYAMOTO et al., 2006). Esta técnica permite avaliar a presença, a direção e a qualidade do fluxo sanguíneo mais rapidamente do que qualquer outra técnica não invasiva Carvalho et al. (2008), permitindo avanços na investigação de condições fisiológicas e patológicas do trato reprodutivo (HERZOG; BOLLWEIN, 2007).

Neste sentido, justifica-se buscar subsídios sobre a aplicabilidade da tecnologia Doppler como técnica auxiliar na determinação da puberdade e a maturidade sexual de novilhas zebuínas com a expectativa de desenvolver características a serem utilizadas como critérios de seleção de novilhas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Puberdade em fêmeas bovinas

A recria de novilhas é um componente de grande importância dentro de um sistema de produção em bovinos de corte, sendo a idade à puberdade o principal fator que determina a competência da fêmea em sua primeira estação reprodutiva (DAY; ANDERSON, 1998).

Em novilhas, a puberdade pode ser definida como momento em que ocorre a primeira ovulação (LANNA, 1997). A partir desse momento, a fêmea adquire capacidade de expressar seu potencial reprodutivo. A puberdade, no entanto, não deve ser interpretada como um evento isolado, sendo caracterizada como a etapa final de inúmeras alterações fisiológicas e morfológicas que culminam com a capacidade de conceber e manter a gestação. Tanto o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos quanto da estrutura corpórea são necessários para permitir uma eficiente procriação, sendo estes fatores determinados fundamentalmente pela interação entre a genética e o ambiente. (KINDER et al., 1995).

Moran et al. (1989) propuseram que a puberdade das novilhas é atingida quando seu primeiro estro é seguido de uma fase luteínica normal. Já a maturidade sexual, é quando o animal atinge a fertilidade funcional, fisiológica e comportamental. Segundo Pineda (2003) a idade à puberdade de uma novilha é convenientemente definida como a idade em que aparece sinais visuais de estro pela primeira vez.

O aumento do nível e da frequência de LH em novilhas pré-púberes é um acontecimento determinante que leva ao aparecimento de puberdade (EVANS et al., 1992). No período peri-puberal, que precede a ovulação, a sensibilidade da secreção de LH ao feedback negativo diminui, permitindo o aumento da frequência de pulsos de LH, estimulando o desenvolvimento do folículo e a secreção de estrógenos, e este aumento dos níveis circulantes de estrógeno resulta no pico pré-ovulatório de LH (SCHILLO et al., 1992).

Segundo Day e Anderson (1998) o aumento na secreção de LH pela hipófise em consequência do aumento da liberação de GnRH pelo hipotálamo, vai gerar o estímulo necessário para a ocorrência da puberdade. O estradiol (E2) é um importante regulador do eixo hipotalâmico-hipofisiário-gonadal, sendo o fator responsável pela indução de uma onda pré ovulatória de LH, ao aumentar a sensibilidade da hipófise anterior ao GnRH, promovendo a sua liberação na corrente circulatória (DAY; ANDERSON, 1998).

Esse aumento na frequência de pulsos de LH é denominado período peri-puberal, e dura aproximadamente os 50 dias que precedem à puberdade nas novilhas (DAY et al., 1984, 1987).

De acordo com Honaramooz et al. (2004), o padrão de desenvolvimento dos órgãos reprodutivos de novilhas pré-púberes se deve às variações nas concentrações de gonadotrofinas, no crescimento folicular e, possivelmente, na produção de estrógeno, determinando a diferença na velocidade de crescimento dos tecidos.

2.2 Fatores que influenciam para o início da puberdade

Vários fatores têm sido mostrados influenciando a fertilidade da novilha. Entre os fatores genéticos incluídos estão: raça, idade e peso (ou ganho) a puberdade e indicadores da fertilidade (LANNA, 2004; EMERICK et al., 2009).

2.2.1 Idade

Um dos principais fatores envolvidos no início da puberdade é a idade, que caracteriza a precocidade sexual dos bovinos, e é um importante referencial nos programas de melhoramento genético (BERGMANN et al., 1996).

As novilhas possuem idade elevada ao primeiro parto, e a antecipação desta está diretamente ligada à eficiência e à lucratividade da produção de carne bovina (MARTIN et al., 1992). Segundo Pereira et al. (2002), a idade média ao primeiro parto em rebanhos do estado de São Paulo encontra-se ao redor de 34 meses de idade, correspondendo a uma idade à concepção em torno de 24 – 25 meses.

Trabalhos na literatura têm demonstrado a vantagem em iniciar mais cedo a vida reprodutiva das novilhas. Segundo Martin et al. (1992), o desempenho reprodutivo das fêmeas depende da idade em que essas parem pela primeira vez, e novilhas que parem mais cedo têm maior vida produtiva que as fêmeas mais tardias. Entre as vantagens de emprenhar as novilhas mais jovens estão: menor tempo para obter retorno do investimento, longevidade da matriz, aumento do número de bezerras e seleção mais rápida das fêmeas por reduzir o intervalo entre gerações (SHORT et al., 1994; MATTOS et al., 1984).

A idade ao primeiro parto é uma característica que pode ser utilizada como critério de seleção, por estar relacionada com a puberdade dos animais e a obtenção desta característica não implica em custo para o sistema. Gressler et al. (1998) encontraram que a herdabilidade para data ao primeiro parto de novilhas Nelore é de 0,11, enquanto Mac Neil et al. (1984) verificaram que a herdabilidade para idade à puberdade é relativamente alta (0,61). A média das estimativas de herdabilidade para a antecipação da idade à primeira cria de fêmeas Nelore expostas ao touro aos 14 meses foi de 0,19, sugerindo a possibilidade de resposta à seleção para esse critério (PEREIRA et al., 2001). Dessa forma, a antecipação da idade reprodutiva das fêmeas pode ser obtida ao selecionar as novilhas para menor idade ao primeiro parto, uma vez que a identificação da idade à puberdade apresenta dificuldades práticas para a aplicação em criações extensivas (BERGMANN, 1993).

Para que o primeiro parto ocorra aos dois anos de idade, é necessário usar uma combinação que envolva o aspecto nutricional, peso ideal e seleção para puberdade precoce (TRAN et al., 1988), o que é um grande desafio para a pecuária brasileira.

2.2.2 Fatores Genéticos

Existem importantes diferenças na fisiologia e no comportamento reprodutivo entre *Bos taurus* e *Bos indicus*, entre elas a idade a puberdade. Em novilhas taurinas a puberdade geralmente acontece entre 10 - 15 meses e 270 – 350 kg de peso corpóreo, com o parto estimado para 24 - 26 meses de idade (FERRELL, 1982). Nos zebuínos a puberdade acontece em idade mais avançada e com maior peso em relação ao peso adulto (DOBSON et al., 1986), variando em torno de 22 a 36 meses (SOUZA et al., 1995), refletindo na idade à primeira cria, que nesses animais pode ser aos 44 - 48 meses de idade (NOGUEIRA, 2004). De acordo com Martin et al. (1992) e Bagley (1993), fêmeas de raças que apresentam porte maior quando adultas apresentam puberdade mais tardiamente do que fêmeas de raças que apresentam menor porte quando adultas.

Novilhas cruzadas (*Bos taurus* x *Bos indicus*) apresentaram puberdade mais velhas e mais pesadas que novilhas taurinas (PERRY et al., 1991), porém mais novas que novilhas zebuínas (RESTLE et al., 1999). Segundo Galina et al. (1989), o efeito aditivo do cruzamento entre raças pode ser visto na idade da primeira ovulação, que decresceu de 22 para 15 meses de idade em fêmeas Zebu cruzadas com machos *Bos taurus*. A puberdade precoce em animais oriundos de cruzamentos entre o Zebu e *Bos taurus* pode ser atribuída à heterose entre as raças (MARSON et al., 2001; RESTLE et al., 1999).

Trabalhando com fêmeas da raça Nelore, Meirelles (2004) obteve estimativa média de herdabilidade para a probabilidade de prenhez precoce igual a 0,32 e Eler et al. (2002) consideram que a utilização da idade à primeira prenhez de novilhas, como critério de seleção, tem apresentado boas estimativas de herdabilidade (0,57). A genética dos animais associada ao nível nutricional alto (outono/inverno pós desmama) é eficaz em determinar a eficiência das novilhas em ficarem prenhes aos 14 meses de idade. Segundo Rocha et al. (2002), novilhas cruzadas com maior grau de sangue zebuino (3/8 Nelore – Hereford) apresentaram menor eficiência em engravidarem quando comparadas a novilhas com maior percentual taurino (Hereford e 1/4 Nelore – Hereford) em estação de monta de 77 dias (41,8% vs. 66,2%, respectivamente). Da mesma forma, Patterson et al. (1991) trabalhando com fêmeas *Bos taurus* e *Bos taurus* x *Bos indicus*, observaram maior proporção de novilhas púberes no início da estação de monta (93,0% vs. 67,0%, respectivamente) e maiores taxas de prenhez após 45 dias de estação de monta (89,0% vs. 71,0%,

respectivamente) para novilhas *Bos taurus*. Restle et al. (1999), mostraram que independente da idade (12, 18, 24 ou 28 meses) fêmeas Nelore apresentam menor porcentagem de puberdade (0% vs. 7,2%; 16,7% vs. 50,6%; 25,0% vs. 68,2%; 70,0% vs. 100%) quando comparadas às novilhas cruzadas (*Bos taurus* x *Bos indicus*).

2.2.3 Peso e nutrição

No Brasil a recria é realizada basicamente em sistemas com pastagens. Isto determina que o desenvolvimento corporal fique dependente das condições climáticas, apresentando períodos com bons ganhos de peso e outros com crescimento lento ou mesmo perda de peso, tendo como consequência direta idade tardia à puberdade e maior idade à primeira cria.

A restrição alimentar atrasa o início da puberdade por suprimir a pulsatilidade de LH que é necessária para o crescimento dos folículos ovarianos até o estágio pré-ovulatório (YELICH et al., 1996). Além de reduzir a secreção de LH, a restrição da ingestão de alimentos também diminuiu as concentrações de IGF-1 resultando em menor produção de estradiol e não ovulação (YELICH et al., 1996). A realimentação de animais em anestro nutricional modifica o sinal metabólico, restabelecendo a secreção pulsátil de LH, aumentando o diâmetro do folículo dominante, e permitindo a ovulação (WETTEMANN et al., 2000).

Geralmente raças de maior porte são mais tardias e mais pesadas quando atingem a puberdade (MARTIN et al., 1992). Segundo Hess (2002), novilhas de corte precisam atingir cerca de 60 a 65% do peso vivo da idade adulta para alcançarem a puberdade. Novilhas de reposição devem ser desmamadas com o maior peso possível, de acordo com os padrões da raça sem, entretanto, tornarem-se obesas visto que o excesso de tecido adiposo em novilhas durante a fase pré-desmama pode resultar em redução do desempenho subsequente desses animais (BAGLEY, 1993). Em vários experimentos foi detectado efeito do ganho de peso pós-desmame sobre a idade à puberdade. Foi demonstrado que aumentar a taxa de ganho de peso das novilhas durante o período pós-desmame antecipa a puberdade (BUSKIRK et al., 1995; HALL et al., 1995; LAMMERS et al., 1999; QUINTANS et al., 2004), além de trazer outros resultados positivos como aumento das taxas de concepção na primeira cobertura (FLECK et al., 1980; BUSKIRK et al., 1995), aumento na produção de leite

(FERRELL.,1982; BUSKIRK et al.,1995), e aumento no peso dos bezerros ao desmame (FERREL, 1982). Já a diminuição do ganho de peso teve como resultado atraso da puberdade (QUINTANS et al., 2004). Gasser et al. (2006), relataram que fêmeas *Bos taurus* desmamadas precocemente (73 ± 3 dias), alimentadas com dieta de alto concentrado e ganhos de $1,27 \pm 0,05$ kg/dia, tornaram-se púberes mais novas e mais leves (262 ± 10 dias e 327 ± 17 kg) do que novilhas controle que receberam dieta com baixo nível de concentrado e com ganhos de $0,85 \pm 0,05$ kg/dia (368 ± 10 dias e 403 ± 23 kg). Segundo os autores, os mecanismos pelo qual a boa nutrição permite puberdade precoce é o aumento na secreção de LH, aumentando o desenvolvimento folicular, e diminuindo a retro alimentação negativa do estradiol na secreção de LH (DAY et al.,1987).

Laster et al. (1972) observaram que novilhas que ficaram gestantes aos 15 meses de idade eram mais pesadas do que aquelas que não conceberam, na mesma idade. Cunningham et al. (1981) mostraram que novilhas mais pesadas ou que tiveram ganho de peso maior após a desmama tiveram maiores taxas de concepção aos dois anos, do que novilhas mais leves ou de crescimento mais lento. No Brasil, Semmelmann et al. (2001), avaliando o crescimento e desempenho reprodutivo de 480 bezerras Nelore dos 7,5 meses até o acasalamento aos 17/18 meses de idade, sob diferentes sistemas de suplementação nutricional no período mais seco do ano (entre os meses de maio e outubro), observaram que novilhas prenhes no final da EM, eram novilhas mais pesadas tanto no início quanto no fim da EM.

Sob o ponto de vista nutricional, o cruzamento do Zebu com raças taurinas aumenta a demanda energética, podendo limitar a produtividade. A idade da primeira ovulação em animais oriundos de cruzamento entre raças (5/8 Charolês e 3/8 Zebu) e alimentados com forragens de baixa qualidade foi a mesma, quando comparado a fêmeas Zebu mantidas sob o mesmo regime alimentar (ALENCAR et al., 1987). Portanto, o ganho de peso adequado é necessário para que novilhas atinjam a puberdade e apresentem ciclos estrais normais. A subnutrição, tanto quanto a superalimentação influenciam significativamente no estabelecimento da puberdade em novilhas. A subnutrição dos animais em fase de crescimento determina atraso na puberdade, baixas taxas de concepção, subdesenvolvimento da glândula mamária e redução na produção leiteira (PATTERSON et al.,1992).

2.3 Hormônios

Quanto às concentrações hormonais, a dosagem da concentração de progesterona, está associada com a idade à puberdade, como descrito por Honaramooz et al. (1999). Nesta medida, se define que a primeira vez que o nível plasmático de progesterona excede 1,0 ng/ml, ocorre a primeira ovulação, indicativo da puberdade da novilha. Este critério foi bem estabelecido em vacas e novilhas *Bos taurus* cíclicas e que tinham corpo lúteo funcional produzindo concentração plasmática de progesterona acima de 1 ng/ml (MILVAE e HANSEL, 1983; HOFFMANN e SCHÜLLER, 2002). Entretanto, a glândula adrenal também é capaz de produzir quantidade significativa de progesterona quando estimulada por elevada concentração de ACTH (WILLARD et al., 2005). O comportamento mais irrequieto e agressivo principalmente em manejos mais intensivos, como colheita de sangue, é observado em animais *Bos indicus* (FORDYCE et al., 1988; VOISINET et al., 1997; MONTEIRO et al., 2009) e isso pode ser um fator que contribui para o aumento da concentração de P4 circulante em novilhas *Bos indicus* pré-púberes, porque esse tipo de comportamento vai aumentar a secreção e a concentração de ACTH e cortisol circulante (CURLEY et al., 2008). Resultados semelhantes foram relatados em novilhas cruzadas Brahman (COOKE ARTHINGTON, 2009) e Nelore pré-púberes (CLARO JUNIOR et al., 2010). Embora, no exame por US o corpo lúteo estava ausente, algumas novilhas apresentaram níveis de progesterona plasmático acima de 1 ng/ml (CLARO JUNIOR et al., 2010). Esses autores concluíram que apenas utilizar a avaliação da concentração plasmática de progesterona para determinar o início da puberdade em novilhas *Bos indicus*, pode resultar numa falsa interpretação de puberdade em novilhas pré-púberes e que a avaliação do “status” de puberdade deve sempre estar associada com a avaliação ovariana através de US.

2.4 Escore do trato reprodutivo (ETR) em novilhas

Para identificar e acasalar novilhas precocemente é necessário fazer o uso de recursos para a obtenção de resultados satisfatórios (NUNEZ-DOMINGUEZ et al., 1991). Dentre estes, se destaca considerar o peso corpóreo, as condições de manejo no pré e pós-desmame, na pré-concepção, o manejo alimentar, e também fatores

diretamente ligados ao trato reprodutivo, tais como mensurações dos cornos uterinos, ovários e dosagem de progesterona (P4).

Na perspectiva de padronizar a metodologia de avaliação de novilhas de corte, Anderson et al. (1991) desenvolveram um método para definir o Escore do Trato Reprodutivo (Quadro1).

Quadro 1- Descrição do Escore do Trato Reprodutivo (ETR) em novilhas de corte

ETR	Cornos uterinos	Ovário			
		Comprimento	Altura	Largura	Folículos
		------(mm)-----			
1	Imaturo <20 mm de diâmetro, sem tônus	15	10	8	Ausente
2	20-25 mm de diâmetro, sem tônus	18	12	10	8 mm
3	25-30 mm de diâmetro, leve tônus	22	15	10	8-10 mm
4	30 mm de diâmetro, bom tônus	30	16	12	>10 mm
5	>30 mm de diâmetro, bom tônus	>32	20	15	>10 mm, com corpo lúteo

Fonte: Anderson et al. (1991)

Este método envolve a palpação dos cornos uterinos e estruturas ovarianas pelo reto e é pontuado de 1 a 5. A partir destas informações, Patterson et al. (1999) definiram que novilhas classificadas entre os escores 1, 2 e 3 seriam consideradas pré-púberes e aquelas classificadas entre 4 e 5 seriam consideradas púberes, estas últimas apenas diferindo quanto ao estágio do ciclo estral em que se encontram no momento da realização do exame (fase folicular vs luteínica).

Patterson et al. (1999) associaram as características de cada escore de trato reprodutivo com o modelo conceitual desenvolvido por Day e Anderson (1998) para o início da puberdade. O ETR 1 é atribuído a novilhas com útero e ovários pequenos desprovidos de estruturas significativas, sem apresentar tônus, novilhas com ETR 1 provavelmente estão mais distantes da puberdade, se caracterizam pela baixa frequência de pulsos de LH, devido ao fato de que o hipotálamo e a hipófise ainda são altamente sensíveis ao feedback negativo do estrogênio. Novilhas com ETR 2 estão mais perto da puberdade que aquelas de ETR 1, devido principalmente aos maiores

cornos uterinos e ovários. Novilhas com ETR 3 são consideradas muito próximas à ciclicidade ovariana baseado em maior tônus uterino e folículos palpáveis. Pontuações de trato reprodutivo 2 e 3 são associados com a peri puberdade, fase que é caracterizada pela diminuição do feedback negativo de estrogênio, provocando aumentos na frequência de pulsos de LH, crescimento folicular e secreção de estradiol. O declínio do feedback negativo de estrogênio e aumento da secreção de LH resulta em aumento significativo no crescimento folicular e elevada concentração de estradiol, sendo suficiente para induzir o estro e o pico pré-ovulatório de LH. Novilhas com ETR 4 são consideradas cíclicas, indicado pelo tônus e tamanho do útero, consolidação da curvatura dos cornos uterinos e presença de um folículo pré-ovulatório. Novilhas com ETR 5 são semelhantes a novilhas com ETR 4, exceto pela presença de corpo lúteo.

Anderson et al. (1991) recomendaram o uso do ETR como uma forma de determinar o estágio de desenvolvimento reprodutivo antes da estação de acasalamento; como indicador das exigências nutricionais das novilhas antes da estação de acasalamento permitindo um manejo nutricional diferenciado para aquelas novilhas que menor ETR; e como ferramenta de seleção para idade a puberdade, representando uma medida de variação genética da idade a puberdade dentro de uma população (HOLM et al., 2009). O ETR pode ser útil também, na determinação do protocolo de sincronização de estros mais adequado a ser adotado (PATTERSON et al., 1999).

O ETR, como um método de seleção tem sido correlacionado também com a taxa de prenhez em programas de sincronização de estro, e tem uma herdabilidade estimada em 0,32 (ANDERSON et al., 1991). Holm et al. (2009) avaliaram o valor do ETR como preditor de resultados de fertilidade e produção de novilhas, concluindo que apesar de ser uma medida subjetiva, justificou mais claramente a variação dos resultados de fertilidade do que medidas objetivas como peso corporal e idade.

Montanholi et al. (2004) observaram que após a estação de monta, houve uma maior taxa de prenhez nas novilhas que apresentavam maiores ETRs, bem como uma maior concentração de partos no início da estação de parição.

Segundo Rosenkrans e Hardin (2003) o ETR apresenta alta repetibilidade para o mesmo avaliador e moderada entre avaliadores, quando se compara a palpação retal vs US para identificação do estado puberal em novilhas. Essas medidas foram semelhantes, porém a palpação retal foi menos específica para diferenciar animais

púberes de não púberes, em relação à US. Esses mesmos autores recomendam que, quando somente palpação retal é usada, o ETR seja feito como forma de triagem do *status* reprodutivo do rebanho.

A avaliação do ETR realizada previamente à temporada reprodutiva, evita que animais com baixo potencial reprodutivo sejam utilizados, o que poderia acarretar em maiores custos com manejo da reprodução (ROSENKRANS e HARDIN, 2003).

Em estudo de Dahlen et al. (2003), após uma avaliação prévia, aproximadamente 40 dias antes do início da temporada de reprodução, foram removidas do grupo experimental todas as novilhas com ETR igual a 1. Com isto, foi observada uma elevação na porcentagem de estros, conforme aumentava o escore do trato reprodutivo das novilhas, até alcançar pontuação igual a 4 (26, 38, 63 e 50% de estros, para ETRs 2, 3, 4 e 5, respectivamente).

O ETR é um método que apresenta uma sensibilidade de aproximadamente 82%, onde com 18% de falsos negativos, algumas novilhas examinadas podem ser classificadas como pré-púberes, quando na verdade são púberes (ROSENKRANS e HARDIN, 2003). Essa taxa é devida ao fato da incapacidade de identificar corpo lúteo cavitário por palpação retal, o que pode ser reduzido associando a ultrassonografia à palpação retal e assim poder servir como ferramenta de descarte de novilhas não púberes.

2.5 Ultrassonografia na avaliação do trato reprodutivo de fêmeas

A palpação retal é a técnica mais utilizada para a avaliação do sistema genital de bovinos, porém possui limitações como método de avaliação ou diagnóstico de corpo lúteo (FERREIRA, 2010). O uso da US nos estudos de reprodução bovina revolucionou o conhecimento da fisiologia reprodutiva (BARROS e VISINTIN, 2001). As pesquisas geradas com o uso das imagens de ultrassom esclareceram a complexidade do processo reprodutivo nas fêmeas bovinas, como a dinâmica do desenvolvimento folicular, a formação do corpo lúteo e o desenvolvimento fetal (VASCONCELOS e SANTOS, 2006).

O diagnóstico ultrassonográfico é uma forma pouco invasiva, de acesso visual da cérvix, útero e ovários, para a avaliação do trato reprodutivo da fêmea bovina (KASTELIC et al., 1988).

Segundo Pierson e Ginther (1987), a US bidimensional convencional tendeu a superestimar em mais ou menos um folículo, o número de folículos maiores que 2mm em diâmetro por ovário, em relação à técnica do *slice* (dissecção realizada através de cortes). Neste contexto a US demonstra ser uma técnica segura para estimar a população folicular ovariana maior ou igual a 2 mm, e detectar CLs maduros e suas cavidades.

2.6 Ultrassonografia Doppler

A ultrassonografia bidimensional convencional (modo-B ou escala de cinza) tem sido amplamente utilizada na reprodução bovina, com a finalidade de obter informações funcionais e estruturais do tecido avaliado. A US Doppler, por sua vez, adiciona informações sobre o fluxo sanguíneo, possibilitando avaliar a hemodinâmica do local de interesse (GINTHER e UTT, 2004). Esta ferramenta de avaliação não fornece apenas informações atuais da estrutura, como também pode ser capaz de prever condições futuras, como o potencial de dominância de um folículo ou ainda sua capacidade ovulatória (GINTHER, 2007).

A tecnologia Doppler se baseia na mudança de frequências, que consiste na diferença entre a frequência que transmite as ondas ultrassônicas do aparelho ao tecido e o eco recebido pelo transdutor derivado do movimento dos vasos, ou seja, movimento das células vermelhas que aumentam ou diminuem em direção ao transdutor (GINTHER et al., 2004).

Esta tecnologia vem sendo utilizada para diversas áreas e funções. O Doppler vem sendo empregado em humanos mais rotineiramente do que em animais. Em animais, a tecnologia Doppler vem sendo utilizada há menos tempo, porém já existem trabalhos que discutem a avaliação da vascularização ovariana (ACOSTA et al. 2002, 2003, 2005; MIYAMOTO et al., 2005) e da avaliação da circulação sanguínea distribuída pelo útero durante os diferentes estágios do ciclo estral e durante a gestação (BOLLWEIN et al., 2000, 2002). Estudos relacionados ao Doppler descreveram técnicas de diagnóstico de cistos, avaliação da função do CL, avaliação precoce de diagnóstico de gestação, diagnósticos precisos de morte fetal e melhor avaliação de respostas superovulatórias (MATSUI e MIYAMOTO, 2009).

Atualmente existem três tipos de Doppler, sendo eles o Pulsado ou Espectral, o Color Doppler e o Power Doppler, cada um com sua finalidade (SZATMARI et al., 2001).

2.1.1 Doppler Pulsado ou Espectral

No modo espectral, avaliam-se as variações de fluxo sanguíneo através de gráficos. Estes gráficos, também chamados de *spectrum*, fornecem ao operador, diferentes valores de velocidades de fluxo. No gráfico, a linha de base horizontal representa o fluxo zero, o fluxo em direção ao transdutor é representado acima da linha de base e abaixo desta linha é demonstrado o fluxo em direção oposta (FINN-BODNER e HUDSON, 1998; SZATMÁRI et al., 2001).

No modo Doppler Espectral, a avaliação hemodinâmica do útero pode ser feita a partir dos grandes vasos, como as artérias uterinas (BOLLWEIN et al.; 1998), ou a partir de vasos menores, localizados no endométrio, mesométrio e miométrio, por meio de avaliações subjetiva ou objetiva, que disponibilizam informações específicas da área avaliada (SILVA et al., 2005), possibilitando o cálculo de valores exatos de velocidades de fluxo sanguíneo e índices Doppler vasculares e teciduais (GINTHER e MATTHEW, 2004).

A análise quantitativa da onda espectral é baseada na mensuração das velocidades do fluxo sanguíneo de uma artéria específica: velocidade de pico sistólico (PS), velocidade diastólica final (VD) e velocidade máxima média (TAVM). O valor máximo ao longo do gráfico espectral é representado pelo PS, a velocidade final de um ciclo cardíaco é representada pelo VD e a média de todas as velocidades máximas de um ciclo cardíaco é indicada pelo TAVM (GINTHER, 2007).

A adequada mensuração das velocidades de fluxo sanguíneo é dependente da correta angulação entre o transdutor e o respectivo vaso (ângulo de insonação). Alterações no ângulo de insonação podem ter efeitos drásticos sobre os valores absolutos das velocidades de fluxo sanguíneo de um vaso (GINTHER, 2007).

A pouca utilização do modo espectral na avaliação ovariana em bovinos é devida à dificuldade de contenção do animal e principalmente pelo pequeno tamanho dos vasos, além da necessidade de ajuste do ângulo de avaliação entre os vasos e o transdutor (ACOSTA e MYIAMOTO, 2004). Desta forma, para o cálculo da velocidade

sanguínea do trato reprodutivo é mais utilizado a mensuração dos índices Doppler, pois são mais fidedignos para o cálculo da velocidade sanguínea em vasos pequenos ou tortuosos.

2.1.2 Color e Power Doppler

Através do modo Doppler colorido ou Color Doppler é possível estimar a perfusão sanguínea tecidual em tempo real, considerando a percentagem de tecido com *pixels* coloridos durante o exame (GINTHER e MATTHEW, 2004). Sendo este modo representado por mais de uma coloração em sua imagem que não representa necessariamente o sangue arterial ou venoso e sim o fluxo que está indo em direção ao transdutor ou em direção contrária.

No modo Color Doppler, a diferença Doppler é transmitida ao monitor em forma de cores. Se esta diferença for positiva, ou seja, quando o fluxo sanguíneo ocorre em direção do transdutor, o mesmo é representado pela cor vermelha. Se ela for negativa, quando o fluxo ocorre em direção contrária ao transdutor, este é representado pela cor azul. Essas tonalidades de cores podem ser mais ou menos intensas, dependendo da intensidade e amplitude do fluxo sanguíneo (HERZOG e BOLLWEIN, 2007). A cor vermelha varia do vermelho escuro para o laranja e amarelo, enquanto a porção azul parte do azul escuro para azul esverdeado. Um deslocamento do centro da barra (demarcação entre vermelho e azul) para as extremidades (superior e inferior) representa aumento na velocidade do fluxo. Ou seja, na US Doppler, a legenda de cores expressa a velocidade do fluxo sanguíneo dentro do vaso. Cores mais claras representam fluxo mais rápido enquanto tonalidades mais escuras representam fluxo mais lento (GINTHER, 2007). Sendo que a onda emitida pelo transdutor pode ser programada pelo operador e o melhor ângulo utilizado para obtenção de uma melhor imagem Doppler encontra-se entre 30° e 60° (GINTHER et al., 2004).

Diferente da avaliação espectral, o Color Doppler é um método mais simplificado, consumindo menor tempo de exame, sendo a preferida pelos profissionais que atuam no campo. Na avaliação Doppler é possível também utilizar o modo Power Doppler, onde apenas uma cor é apresentada e as variações nos sinais de Doppler se apresentam como diferenças na intensidade dos pontos coloridos (GINTHER et al., 2007).

No Power Doppler a imagem é semelhante ao modo Color, no entanto observa-se somente uma cor (laranja) e seu sombreamento dentro da caixa de cor (SZATMÁRI et al., 2001). O brilho colorido está relacionado ao número de células sanguíneas em movimento e não à velocidade (NYLAND e MATTOON, 2005). Esta técnica não traz nenhuma informação sobre a direção ou velocidade do fluxo sanguíneo quando comparado à técnica de imagem do Doppler colorido, sendo utilizado para detectar vasos finos ou com fluxo muito lento (SZATMÁRI et al., 2001).

De acordo com Ginther (2007), a principal diferença entre o Color e o Power é o modo como a imagem é formada, enquanto o primeiro avalia a velocidade, o segundo utiliza a intensidade da estrutura em deslocamento. O modo Power apresenta como principal vantagem uma maior sensibilidade a fluxos sanguíneos discretos. Adicionalmente, imagens coloridas pelo Power são menos afetadas por artefatos (GINTHER, 2007). Desta forma, recomenda-se a utilização do Doppler modo Power Doppler para a avaliação de vasos de pequeno diâmetro e baixo fluxo sanguíneo, como os presentes no trato reprodutivo (FERREIRA et al., 2011).

2.1.3 Índices Doppler

Informações sobre a impedância vascular não podem ser obtidas apenas pela velocidade absoluta, por isso foram desenvolvidos os índices Doppler (NOVELLAS et al., 2007). Esses índices comparam o fluxo durante a sístole e a diástole, sendo razões das velocidades obtidas do espectro Doppler (NOVELLAS et al., 2007; CARVALHO, 2009). Por isso, ao contrário da análise isolada da velocidade, os índices têm como vantagem a independência da correção do ângulo, sendo usados para avaliação de vasos muito pequenos e tortuosos em que é difícil a correção do ângulo (NELSON e PRETORIOS, 1988). Desta forma, os índices de resistência (IR) e o de pulsatilidade (IP) Doppler são uma alternativa para minimizar os erros de mensuração das velocidades do fluxo sanguíneo, por não dependerem do ângulo de insonação (GINTHER e UTT, 2004).

Os IR e IP são gerados pelas equações $[(PSV-EDV)/PSV]$ e $[(PSV-EDV)/TAMV]$, respectivamente, e são especialmente úteis em mensurações de fluxo sanguíneo de vasos de pequeno calibre e tortuosos, que não permitem a estimação dos valores reais do fluxo sanguíneo (SILVA, 2010).

O IR e o IP arterial apresentam correlação negativa com a perfusão vascular do tecido irrigado pelo mesmo, ou seja, quanto menor IR e IP maior será a perfusão vascular no tecido suprido por aquele vaso (GINTHER, 2007). Os valores de IR e IP podem variar de 0 a 4, onde 0 indica ausência de alteração e 4 alteração máxima (GINTHER e MATTHEW, 2004).

Silva et al. (2005) relatam que os valores do IR e IP podem ser utilizados para a avaliação do trato reprodutivo, pois não são influenciados pela angulação da probe em relação ao vaso. Devido à grande tortuosidade das artérias presentes no útero e ovários, não é possível determinar seus respectivos ângulos de insonação (SILVA et al., 2005).

O aumento na velocidade diastólica leva a um correspondente aumento do fluxo sanguíneo e redução dos IR e IR (RIESEN et al., 2002). Portanto, a baixa resistividade de fluxo sugere alto metabolismo e altas resistências sugerem baixo metabolismo. Já IR aumentados reduzem o fluxo diastólico. Dependendo da alteração que está ocasionando o aumento da resistência, pode-se encontrar até ausência de fluxo diastólico ou a chamada diástole zero (CARVALHO, 2009).

A vantagem do IR é sua alta sensibilidade para diferenciar traçados anormais, porque o denominador nunca se torna zero, permitindo sempre a obtenção de um valor para este índice. O IP tem como vantagem o fato de levar em conta a velocidade média, que reflete o que ocorre durante todo o ciclo cardíaco, e não em apenas um momento específico como o IR (NELSON e PRETORIUS, 1988).

Os índices Doppler também podem ser utilizados para avaliação dos vasos em tumores, sendo encontrados aumentos significativos do IR e do IP em nódulos malignos da tireoide humana em relação aos nódulos benignos e aos vasos sanguíneos normais (ZHOU et al., 2012).

Embora esses índices sejam úteis, é importante ter em mente que essas medidas são influenciadas não apenas pela resistência ao fluxo nos vasos periféricos, mas por muitos outros fatores, inclusive a frequência cardíaca, pressão sanguínea, comprimento e elasticidade dos vasos, bem como, pela compressão orgânica extrínseca (MERRITT, 1999).

Além disso, o uso de alguns fármacos como sedativos, anestésicos e medicamentos cardiovasculares podem atuar no sistema vascular alterando sua resistência (CARVALHO, 2009). Estudos em humanos também mostram que os índices podem variar de acordo com a idade, sendo encontrado IR mais elevado em

crianças e idosos (GRANATA et al. 2009). Portanto, a interpretação deve considerar sempre todas essas variáveis (CARVALHO, 2009).

2.8 Ultrassonografia Doppler na avaliação do trato reprodutivo de fêmeas

A US Doppler tem sido aplicada para avaliação do trato reprodutivo de grandes animais, pois permite a realização de um exame em tempo real e de maneira não invasiva da perfusão sanguínea uterina e ovariana (BOLWEIN et al., 2003; GINTHER et al., 2007).

É de grande importância o estudo da hemodinâmica do trato reprodutivo de fêmeas, sendo o sistema vascular responsável pelas trocas de nutrientes, gases, hormônios, fatores de crescimento e excreções entre tecidos e órgãos (FABER e THORNBURG, 1983). Herzog e Bollwein (2007) relataram o uso da US Doppler colorido como ferramenta para investigação do fluxo sanguíneo genital. Por meio dessa técnica, a perfusão sanguínea dos ovários e do útero pode ser acessada, sendo as imagens avaliadas subjetivamente ou objetivamente (GINTHER, 2007).

Pareja et al. (2010) relataram a possibilidade do mapeamento com Doppler colorido do sítio ovariano podendo observar e estimar quantitativamente as mudanças da vascularização intraovariana. Miyamoto et al. (2006) descreveram a importância da utilização da US Doppler para identificar o fluxo sanguíneo local, proporcionando uma estimativa facilmente obtida do *status* folicular, do corpo lúteo e do conceito.

A dinâmica folicular, ovulação, formação do CL, bem como a preparação do endométrio para a gestação são dependentes do estabelecimento de vascularização adequada para uma melhor produção hormonal durante as diferentes fases do ciclo estral (PINTO, 2009).

Neste contexto, a US Doppler tem se mostrado como um método inovador, ainda pouco usado e mais sensível na avaliação da vascularização do trato reprodutivo de fêmeas bovinas.

2.9 Hemodinâmica uterina, ovariana e luteal

É sabido que uma pobre perfusão uterina pode ser a causa de infertilidade em fêmeas, estudos realizados em mulheres demonstraram que uma baixa perfusão

uterina durante a fase luteínica está associada com uma baixa taxa de concepção (BOLLWEIN et al., 1997). Estudos visando verificar a influência da perfusão uterina em programas de fertilização *in vitro* e transferência de embriões em mulheres observaram um feito negativo no sucesso dessas técnicas em mulheres que apresentavam uma perfusão uterina reduzida (CACCIROTE et al., 1996; STEER et al., 1992).

Bollwein et al. (1997) afim de demonstrar a diferença na perfusão uterina durante o ciclo estral em éguas observaram que o fluxo sanguíneo na artéria uterina direita ou esquerda não diferiram durante a ovulação, sendo o fluxo arterial uterino independente do ovário que ocorre a ovulação. Verificaram também, que a perfusão vascular na artéria uterina se mantém constante durante o ciclo estral, assim como em outras espécies domésticas (FORD et al., 1979).

As mudanças na hemodinâmica ovariana estão diretamente ligadas aos processos de transformação folicular durante os diferentes momentos do ciclo estral, incluindo crescimento folicular, ovulação, luteogênese e luteólise (COLLINS et al., 1991; BRANNSTROM et al., 1998; ACOSTA et al., 2002).

O desenvolvimento do folículo ovariano está intimamente relacionado com o desenvolvimento de uma rede vascular na camada da teca, que fornece nutrientes, hormônios e oxigênio para suportar o crescimento folicular e a esteroidogênese. Já na camada granulosa, não há vasos sanguíneos, os metabolitos alcançam o ambiente intra folicular por difusão (VIANA et al., 2013).

Em cadelas, foi observada uma mudança no padrão vascular ovariano durante as fases do ciclo estral, com um aumento gradual da perfusão ovariana durante o proestro (KÖSTER et al., 2001). Estes mesmo autores observaram que no período pré-ovulatório, houve um aumento marcante da intensidade da cor e da velocidade de fluxo sanguíneo intraovariano, com um declínio nos IR e IP. Durante a ovulação e no início da fase luteal, a perfusão observada foi máxima.

Mudanças no fluxo sanguíneo e na sua intensidade promovem alterações diretas na biossíntese de E2 e P4 (MURDOCH et al., 1986; ACOSTA et al., 2002). No CL, também é essencial uma boa vascularização, pois esta fornece substrato para a biossíntese de P4 e hormônios esteróides pelas células luteínicas. Dessa forma, a circulação sanguínea é vital para que o CL mantenha suas propriedades funcionais (BOLLWEIN et al., 2002).

Segundo Wiltbank (1994) o fluxo sanguíneo para o CL é maior do que para qualquer outro tecido no corpo. No diestro, de 65 a 95% do fluxo sanguíneo do ovário é destinado ao CL. Um estudo recente com éguas caracterizou a relação entre a perfusão sanguínea com o desenvolvimento (estrutural e funcional) do CL (GINTHER et al., 2007).

Não existe uma relação entre o diâmetro luteínico e as mudanças do fluxo sanguíneo da artéria ovariana ipsilateral ao CL, sugerindo que o processo de neovascularização não está associado às dimensões do CL (BOLLWEIN et al, 2002). Durante o desenvolvimento inicial do corpo lúteo, o fluxo sanguíneo aumenta paralelamente ao aumento da concentração circulante de progesterona, sendo então a vascularização associada ao potencial em produzir progesterona (ACOSTA et al., 2003).

Considerando a íntima relação entre a perfusão vascular do CL e as concentrações séricas de P4, a US Doppler pode ser utilizada no momento da seleção da receptora para a avaliação da funcionalidade do CL. Mattioli et al. (2001) conseguiram, em seus estudos, relacionar o diâmetro do folículo ovariano, concentrações de estrógeno intra foliculares e a área de fluxo sanguíneo, indicando a possibilidade de associação entre a US modo B, modo Doppler colorido e as concentrações hormonais.

Alterações estruturais e funcionais que ocorrem no folículo podem estar associadas com um aumento local de fluxo sanguíneo no folículo pré-ovulatório que levaria à maior suprimento de gonadotrofinas e outros fatores hormonais necessários para a maturação folicular (ACOSTA et al., 2003; ACOSTA; MIYAMOTO, 2004). Miyamoto et al. (2006) confirmaram que as mudanças estruturais e funcionais causadas pelo LH em folículos maduros estão associadas ao aumento do fluxo sanguíneo na parede dos folículos.

Ginther (1992) e Christensen (2011) relataram um aumento do estradiol no início do diestro em éguas, que pode coincidir com a elevação da irrigação uterina neste mesmo momento. Diferentemente do observado em éguas, em vacas houve uma correlação positiva do E2 com o fluxo sanguíneo da artéria uterina ao longo do ciclo estral (BOLLWEIN et al., 2000), enquanto em ovelhas não foi encontrada correlação deste hormônio com a perfusão vascular do útero (ROMAN-PONCE et al., 1983; SPRAGUE et al., 2009).

Em éguas, assim como em outras espécies, o útero sofre alterações fisiológicas ao longo do ciclo estral, sendo o estágio deste diretamente relacionado à perfusão vascular uterina (BOLLWEIN et al., 1998; 2002). Estas alterações são reguladas pelos hormônios esteroidais (estradiol e progesterona) e por uma rede de complexas interações entre fatores de crescimento locais, secretados pelo epitélio e estroma uterinos (ROMAN-PONCE et al.; 1983; BOLLWEIN et al.; 2002; SAGSOZ e SARUHAN, 2011). O E2 é um hormônio esteroide que, conhecidamente, apresenta efeito vasodilatador (FORD, 1982; GINTHER, 1992).

Quando estudadas as concentrações plasmáticas da P4, estas não se correlacionaram à perfusão vascular uterina ao longo do ciclo estral tanto em éguas quanto em vacas (BOLLWEIN et al., 2000; 2002). Já na mulher existe uma alta correlação positiva da P4 com a irrigação uterina, apenas durante o diestro (RAINE-FENNING et al., 2004). Ao analisar a relação existente entre os hormônios esteroidais, em ovelhas, vacas e porcas houve uma alta correlação do fluxo sanguíneo uterino com a relação E2/P4 (FORD, 1982; ROMAN-PONCE et al., 1983; SPRAGUE et al., 2009).

Em um estudo realizado por Bollwein et al. (2002), não foi verificada relação entre as concentrações plasmáticas de estrógeno e a variação no índice de resistência vascular no útero durante todo o ciclo estral. Dessa forma, não somente o estrógeno mas outros fatores estão relacionados com a regulação do fluxo vascular uterino.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar o efeito do escore do trato reprodutivo (ETR) na dinâmica folicular e dopplerfluxometria útero-ovariana em novilhas Nelore (*Bos indicus*) submetidas a protocolo de sincronização de estro e ovulação.

3.2 Objetivos específicos

- Estudar o desenvolvimento folicular e a vascularização do trato reprodutivo de novilhas;
- Correlacionar o escore do trato reprodutivo (ETR) com as variáveis dopplerfluxométricas e com as concentrações de P4 e E2;
- Estabelecer um padrão de escore do trato reprodutivo (ETR) baseado em ultrassonografia bidimensional convencional e Doppler.

5. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e animais experimentais

O experimento foi realizado nas instalações da Fazenda Igarapé, situada no Km 33, da estrada MA 122, no município de Igarapé Grande, mesorregião do Centro Maranhense e micro-região do Médio Mearim, localizado no Estado do Maranhão, a 4°33'19" de latitude sul e 44°51'14" de longitude oeste. Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Aw, clima tropical com estação seca, temperatura média 32°C e precipitação pluviométrica anual de 1649 mm.

Foram utilizadas 36 novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*), com idade entre 18 e 22 meses ($20,2 \pm 0,1$) meses, escore de condição corporal (ECC) igual a três (3 ± 0) em uma escala de um a cinco pontos, conforme metodologia descrita por Machado et al. (2008), e peso entre 252 e 341 ($299 \pm 3,56$) kg. Os animais foram mantidos em condições semelhantes de alimentação (pastagem de *Brachiaria brizantha*), em um sistema de lotação rotacionada com água e sal mineral *ad libitum*.

4.2. Delineamento experimental

4.2.1 Caracterização do escore do trato reprodutivo (ETR)

A avaliação do ETR foi realizada por meio de ultrassonografia em modo bidimensional (modo-B) com um transdutor transretal linear de 7,5 MHz (Mindray®, Modelo Z5Vet, Digital Ultrasonic Diagnostic Imaging System, Brasil). O diâmetro dos cornos uterinos, o diâmetro do maior folículo e/ou a presença de corpo lúteo foram tomados como parâmetros de avaliação. A metodologia utilizada foi adaptada para novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) à partir do manuscrito de Gutierrez et al. (2014), com escores de 1 a 3, conforme descrito no Quadro 2.

Quadro 2. Descrição dos escores do trato reprodutivo (ETR) com base nas características uterinas e ovarianas.

ETR	Cornos uterinos (diâmetro) [†]	Estruturas ovarianas
1	<15 mm	Folículos <8,0 mm
2	≥15 mm	Folículos ≥8,0 mm
3	≥15 mm	Corpo Lúteo presente

Adaptado de Gutierrez et al. (2014)

[†] Diâmetro do corno uterino na região da bifurcação intercornual

Para a confirmação do ETR as novilhas foram submetidas a dois exames ultrassonográficos no período pré-experimental e categorizadas conforme segue:

- **ETR 1** (n=11) novilhas que apresentaram ETR 1 nos dois exames realizados;
- **ETR 2** (n =13), novilhas que apresentaram ETR 2 em pelo menos um dos exames realizados;
- **ETR 3** (n=10), novilhas que apresentaram ETR 3 em pelo menos um dos exames realizados.

4.2.2 Protocolo de sincronização da ovulação

Conforme ilustrado na Figura 1, após a definição do ETR, as fêmeas de cada categoria foram sincronizadas para homogeneização do *status* folicular e luteínico. No dia Zero (D0) todas as fêmeas receberam um implante auricular novo contendo 3 mg de Norgestomet (Crestar[®], MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil) + 2 mg de benzoato de estradiol (BE, I.M., Ric- BE[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil) + 25 mg de Cloprostenol (PGF2α, I.M. Sincrocio[®]; Ourofino, São Paulo, Brasil). No dia 8 (D8), foram removidos os implantes auriculares e administrados 25 mg de Cloprostenol + 300UI de gonadotrofina coriônica eqüina (i.m.; eCG; SincroeCG[®]; Ourofino, Brasil), seguidos pela administração de 1 mg de benzoato de estradiol (BE, I.M., Ric- BE[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil) 24 horas depois (D9). Neste protocolo, o intervalo estimado entre a

remoção dos implantes e o pico das ovulações foi de ± 70 horas (SÁ-FILHO et al., 2012).

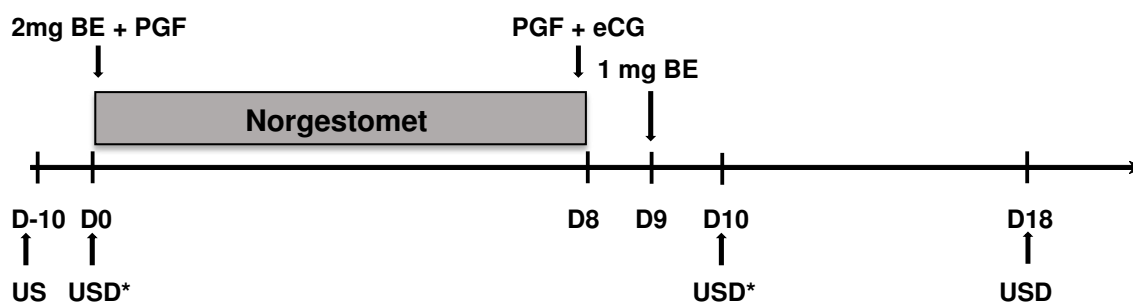


Figura 1: Protocolo de sincronização da ovulação e exames ultrassonográficos.

Legenda: D-10=primeiro exame ultrassonográfico para a determinação do ETR; D0=confirmação do ETR e inserção do implante auricular de Norgestomet; D18=confirmação da ovulação por meio da presença de corpo lúteo; US=ultrassonografia em modo-B; USD=ultrassonografia em modo Doppler; * colheita de sangue para dosagem de hormonal; BE=benzoato de estradiol; PGF= 25mg de Cloprostenol; eCG= 300UI de gonadotrofina coriônica equina.

4.2.3 Avaliações Ultrassonográficas em modo-B, Color Doppler e Espectral Doppler

Conforme ilustrado na Figura 1, foram realizados exames ultrassonográficos pontuais, de acordo com os objetivos da pesquisa. Previamente ao início do experimento, ambos os ovários e cornos uterinos foram submetidos a dois exames ultrassonográficos transretais em modo-B, com intervalo de dez dias (D-10 e D0) para caracterização do ETR. As ultrassonografias em modo Color e Espectral Doppler foram realizadas pela primeira vez no dia da inserção dos implantes auriculares (D0) e, em seguida, juntamente com exame em modo-B, nos dias estimados para detecção de folículos pré-ovulatórios (D10) e corpos lúteos (CL; D18). A ovulação foi considerada como o aparecimento de um CL no D18, no mesmo ovário onde o folículo dominante havia sido detectado no D10.

A hemodinâmica útero-ovariana foi avaliada com auxílio de um aparelho de ultrassom (Mindray®, Modelo Z5Vet, Digital Ultrasonic Diagnostic Imaging System, Brasil) equipado com transdutor multifrequencial linear transretal regulado para operar em 8,0 MHz.

Inicialmente foi realizada a contenção mecânica da fêmea e remoção das fezes do reto do animal. Posteriormente foi realizada sedação com 1mL de acepromazina 1% IM (Acepran®, UNIVET, Brasil).

O aparelho foi ajustado em modo bidimensional (modo-B; escala de cinza), para identificar e mensurar as dimensões do útero, ovário e suas estruturas. Em seguida, foram acionados respectivamente os modos Color Doppler e Espectral Doppler para determinar respectivamente a área de perfusão sanguínea na qual a direção do fluxo sanguíneo é indicada pelos sinais nas cores vermelha ou azul, além do perfil velocimétrico. Dentre as possíveis configurações do aparelho, foram selecionados previamente alguns padrões de ganhos de cor, frequência, ângulo de insonação e número de ciclos cardíacos. A frequência utilizada foi de 7,5 MHz, com um ganho de cor de 44-50%, o ângulo de insonação foi ajustado para 60° e número de ciclos foi ajustado para formar 3 ciclos completos. Estas configurações foram mantidas constantes em todos os exames.

Objetivando análises posteriores, cada sessão de digitalização foi gravada no próprio aparelho, sendo utilizada a imagem que evidenciou maior área de perfusão sanguínea e com melhor qualidade. Para isso, foi realizado o escaneamento contínuo em tempo real durante 1 min, em corte transversal por toda extensão dos cornos uterinos e ovários (adaptado de FERREIRA et al., 2008) e, por meio do recurso “cineloop”, foi escolhida melhor imagem.

Inicialmente, as imagens foram submetidas a avaliações subjetivas visuais por seis avaliadores experientes e não experientes, para predizer a área de vascularização em cores proporcionalmente à área total de cada estrutura avaliada (0 a 100%).

As avaliações objetivas foram realizadas com base na intensidade em número de pixels coloridos nas imagens, como descrito para éguas e novilhas (SILVA et al., 2005; GINTHER, 2007; ARAUJO, 2014; GINTHER, 2009). A aferição da quantidade de pixels coloridos das imagens foi realizada com o auxílio de um programa de edição de imagem (Adobe Photoshop CS5), que forneceu em escala de pixels a extensão da vascularização dos cornos uterinos, ovários e CL (SILVA e GINTHER, 2010) (Figura 2).

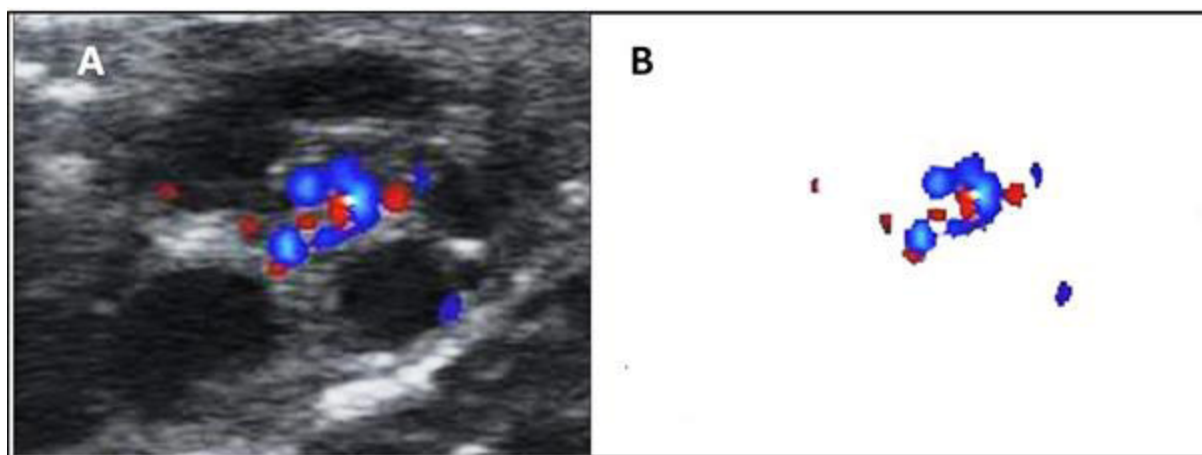


Figura 2. Exemplo de uma imagem obtida em modo de Doppler colorido a partir do ovário (A) e a mesma imagem editada (B).

O modo Doppler espectral foi utilizado para monitorar a hemodinâmica útero-ovaria, por meio da aferição dos valores dopplerfluxométricos das arteríolas e vênulas uterinas e ovarianas, evidenciando uma sequência de gráficos espectrais com ciclos distintos e simétricos da sístole e diástole cardíaca (no mínimo três ciclos). Um ciclo cardíaco foi escolhido para medir os índices de resistência (IR), índice de pulsatilidade (IP), velocidade do pulso sistólico (cm/s) (VPS) e velocidade diastólica final (cm/s) (VDF) (Figura 3).

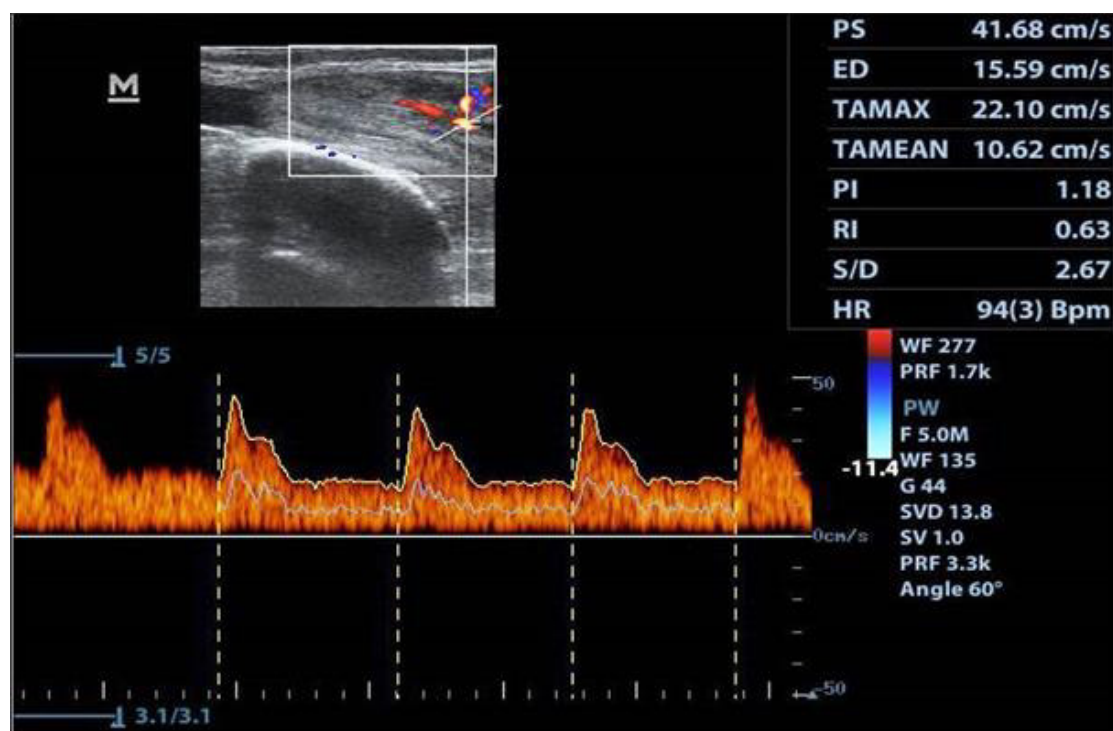


Figura 3. Exemplo de uma imagem obtida em modo de Doppler Espectral a partir de arteríolas uterinas para obtenção do índice de pulsatilidade (IP), índice de resistência (IR), velocidade do pulso sistólico (VPS) e velocidade diastólica final (VDF).).

4.3 Concentrações plasmáticas de estradiol (E2) e progesterona (P4)

Para determinação da concentração plasmática dos hormônios esteroides, P4 e E2, amostras de sangue foram coletadas por meio de punção da artéria ou veia coccígeas diretamente em tubos de vácuo de 10mL sem anticoagulante (Vacutainer®, Becton-Dickinson & Company) em temperatura ambiente após cada avaliação ultrassonográfica. Imediatamente após as colheitas, cada amostra foi centrifugada (3000g por 10 minutos; Centrífuga Excelsa Baby, Fanem®), e o soro obtido foi separado e estocado em tubos esterilizados e identificados a uma temperatura de -20°C. As análises foram realizadas pela técnica de ELISA utilizando-se kits comerciais para determinação de progesterona e estradiol porem fase sólida (Progesterone ELISA e 17beta-Estradiol ELISA, IBL International), no Laboratório de Farmacologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFMA, São Luís, Maranhão, Brasil.

4.4 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada com auxílio do software Statistical Analysis System for Windows SAS® (versão 9.3. SAS Inst. Inc., Cary, NY). A normalidade dos resíduos para cada variável foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk (aplicativo PROC UNIVARIATE do SAS). As variáveis dependentes contínuas foram expressas em média e erro-padrão da média (média $\pm$ EPM) e analisadas por ANOVA usando o aplicativo PROC GLIMMIX do SAS, sendo ajustadas para distribuição normal. As variáveis de distribuição não-normal foram analisadas pelo teste de Wilcoxon (PROC NPAR1WAY WILCOXON do SAS). A taxa de ovulação foi analisada por regressão logística com modelo ajustado para distribuição binomial (PROC GLIMMIX). Foram também determinados os coeficientes de correlação de Pearson (paramétricas) e Spearman (não-paramétricas) entre as variáveis de acordo com a normalidade de cada resposta, segundo Sampaio (2002) (PROC CORR do SAS). As variáveis classificatórias consideradas no modelo estatístico para verificação dos efeitos e interações foram: ETR, dia do exame, e animal. O nível de significância adotado para rejeitar H0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância

menor que 0,05, se considerou que houve efeito das variáveis classificatórias e das suas interações.

5 RESULTADOS

Na Tabela 1 estão apresentadas às médias e respectivos erros padrão (EPM) dos diâmetros do corno uterino e do FD no início do protocolo (D0) e no momento estimado para a IATF (D10). O diâmetro do corno uterino apresentou efeito de ETR nos dois momentos (D0 e D10) ($P < 0,0001$), com diâmetro significativamente menor ($P < 0,05$) no grupo ETR1 em comparação aos grupos ETR2 e ETR3 que não diferiram entre si ($P > 0,05$), como já era esperado, pois nestas duas categorias foram alocados animais com cornos uterinos ≥ 15 mm. Foi observado também efeito de dia ($P = 0,001$), sendo que entre o D0 e o D10 houve um aumento significativo do diâmetro uterino. Não houve interação entre tratamento e dia do protocolo, demonstrando que o diâmetro dos cornos uterino aumentou proporcionalmente em ambos os grupos.

O ETR influenciou diretamente no diâmetro do FD no D10, o qual foi significativamente maior nos ETRs 2 e 3 ($P < 0,0001$), não havendo efeito de dia do exame ou interação.

Tabela 1 – Diâmetro (mm) do corno uterino e do folículo dominante (média $\pm$ EPM) de novilhas Nelore com escore do trato reprodutivo (ETR) 1,2 e 3 nos dias zero (D0) e dez (D10) do protocolo.

Variável resposta	Dia zero			Dia dez			Efeitos (valor de P)		
	ETR 1	ETR 2	ETR 3	ETR1	ETR2	ETR3	ETR	DIA	ETR X DIA
<i>n</i>	<i>n=11</i>	<i>n=13</i>	<i>n=10</i>	<i>n=11</i>	<i>n=13</i>	<i>n=10</i>			
Corno uterino (mm)	12,50 $\pm$ 0,60 ^b	15,71 $\pm$ 0,72 ^a	16,33 $\pm$ 0,66 ^a	15,39 $\pm$ 0,62 ^b	17,36 $\pm$ 0,49 ^a	18,13 $\pm$ 0,66 ^a	<0,0001	0,001	0,60
Folículo dominante (mm)	7,54 $\pm$ 0,4 ^b	9,88 $\pm$ 0,36 ^a	8,64 $\pm$ 0,63 ^{ab}	7,18 $\pm$ 0,37 ^b	8,97 $\pm$ 0,24 ^a	9,18 $\pm$ 0,57 ^a	<0,0001	0,37	0,23

Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste Duncan ao nível de 5% de significância.

Legenda: ETR= escore do trato reprodutivo

O ETR 3 apresentou taxa de ovulação significativamente maior ($P<0,05$) do que os ETRs 1 e 2, que não diferiram entre si (Figura 4).

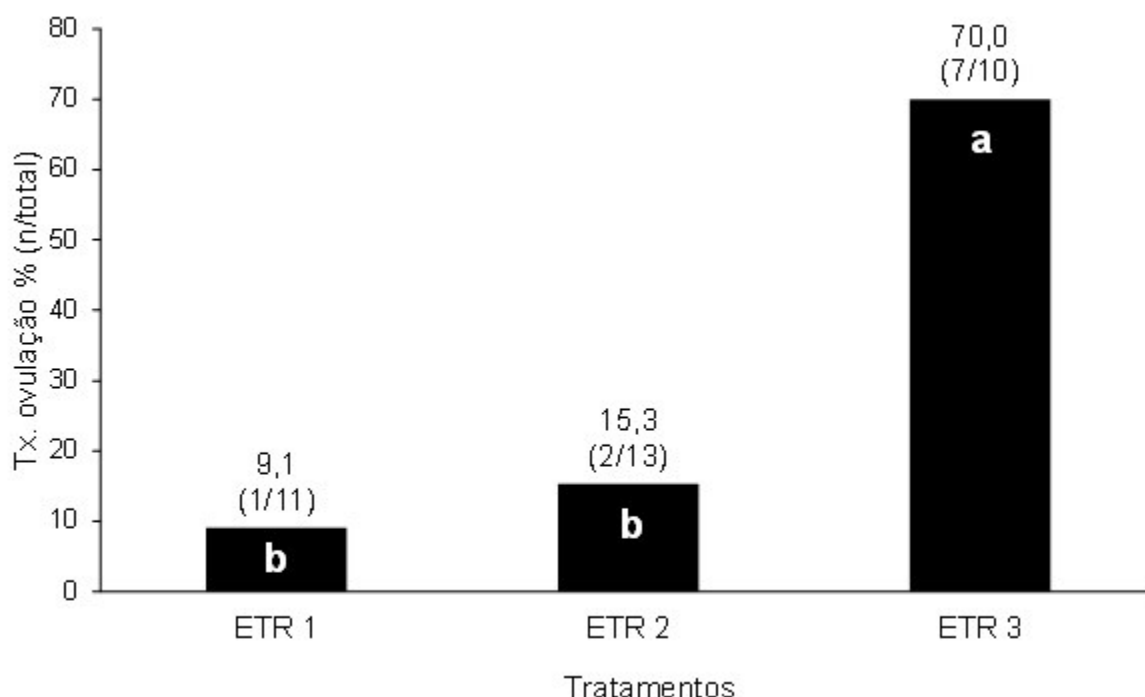


Figura 4. Taxa de ovulação de novilhas nelore de acordo com o escore do trato reprodutivo (ETR). ^{a,b} $P(<0,05)$.

Tanto a avaliação subjetiva da área de vascularização do corno uterino (%) quanto o número de pixels apontaram efeito de ETR, de dia do exame e interação tratamento x dia ($P<0,05$), não tendo sido observada uniformidade na resposta entre ETRs nos diferentes dias, já que no D0, o ETR3 e ETR2 foram respectivamente maiores do que o ETR1 ($P<0,05$) e, no D10, a vascularização maior ocorreu no ETR2, seguida pelos ETRs 1 e 3, respectivamente (Tabela 2).

A área de vascularização do ovário não diferiu entre os ETRs independente do dia (D0 vs D10) ou do método de avaliação (subjetivo ou objetivo) ($P>0,05$). O pulso sistólico (PS) do corno uterino e do ovário não diferiu entre ETRs ($P>0,05$), mas o PS corno uterino foi maior no D10 em todas as categorias.

A velocidade diastólica do corno uterino no D0 não diferiu entre o ETR3 e os demais grupos, mas, o ETR1 foi menor que o ETR2 ($P<0,05$). No D10 os tratamentos não diferiram entre si ($P>0,05$). A velocidade diastólica do ovário não apresentou efeito de tratamento e/ou dia ($P>0,05$).

Os índices de pulsatilidade (PI) e de resistência (RI) não foram influenciados pelo ETR nem pelo dia do exame ($P>0,05$). Entretanto, quando estes mesmos índices foram avaliados no ovário, nota-se que o RI manifestou efeito significativo do ETR e interação ETR x dia do exame ($P=0,02$).

Tabela 2 – Características hemodinâmicas (média $\pm$ EPM) do corno uterino e ovário de novilhas Nelore com escore do trato reprodutivo (ET) 1,2 e 3 nos dias zero (D0) e dez (D10) do protocolo.

Variável resposta	Dia zero			Dia dez			Efeitos (valor de P)		
	ETR 1	ETR 2	ETR 3	ETR 1	ERT 2	ETR 3	ETR	DIA	ETR X DIA
<i>N</i>	<i>n=11</i>	<i>n=13</i>	<i>n=10</i>	<i>n=11</i>	<i>n=13</i>	<i>n=10</i>			
Vascularização UT	7,4 $\pm$ 1,2 ^b	15,5 $\pm$ 1,6 ^a	16,5 $\pm$ 3,7 ^a	28,4 $\pm$ 3,5 ^{ab}	35,6 $\pm$ 3,9 ^a	23,2 $\pm$ 3,5 ^b	0,03	<0,0001	0,04
Vascularização OV	9,8 $\pm$ 1,6	7,3 $\pm$ 1,0	11,5 $\pm$ 3,3	9,9 $\pm$ 1,3	8,8 $\pm$ 1,4	12,4 $\pm$ 2,6	0,14	0,57	0,93
Pixels UT	639,8 $\pm$ 108,5 ^b	2028,1 $\pm$ 276 ^a	2146 $\pm$ 584,8 ^a	4264 $\pm$ 733,2 ^{ab}	5358,7 $\pm$ 552,6 ^a	3402,9 $\pm$ 531, 9 ^b	0,03	<0,0001	0,06
Pixels OV	818,6 $\pm$ 175,0	717,1 $\pm$ 151,8	1170,9 $\pm$ 329,3	779 $\pm$ 90,5	873,4 $\pm$ 130,2	1047,3 $\pm$ 195,4	0,17	0,94	0,73
Pulso sistólico UT	18,6 $\pm$ 2,6	25,7 $\pm$ 3,0	25,8 $\pm$ 4,0	32,7 $\pm$ 3,2	32,1 $\pm$ 3,1	30,2 $\pm$ 3,8	0,57	0,003	0,31
Pulso sistólico OV	17,7 $\pm$ 3,6	25,7 $\pm$ 3,8	21,5 $\pm$ 6,0	13,0 $\pm$ 3,1	18,4 $\pm$ 3,5	20,4 $\pm$ 2,0	0,18	0,15	0,72
Velocidade diastólica UT	7,6 $\pm$ 1,4 ^b	13,5 $\pm$ 1,9 ^a	12,5 $\pm$ 2,3 ^{ab}	15,9 $\pm$ 1,8	17,0 $\pm$ 2,4	15,2 $\pm$ 2,4	0,26	0,007	0,37
Velocidade diastólica OV	14,4 $\pm$ 3,0	14,5 $\pm$ 2,7	11,2 $\pm$ 4,6	9,1 $\pm$ 2,1	12,4 $\pm$ 2,6	11,4 $\pm$ 1,8	0,73	0,31	0,65
Índice pulsatilidade UT	0,9 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,41	0,8 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,1	0,78	0,44	0,87
Índice pulsatilidade OV	0,2 $\pm$ 0,1 ^b	0,9 $\pm$ 0,3 ^a	0,6 $\pm$ 0,4 ^{ab}	0,6 $\pm$ 0,3 ^b	0,5 $\pm$ 0,1 ^{ab}	0,8 $\pm$ 0,2 ^a	0,37	0,99	0,23
Índice resistência UT	0,5 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,8	0,6 $\pm$ 0,0	0,57	0,81	0,38
Índice resistência OV	0,1 $\pm$ 0,0 ^b	0,5 $\pm$ 0,1 ^a	0,2 $\pm$ 0,1 ^{ab}	0,3 $\pm$ 0,1 ^b	0,3 $\pm$ 0,1 ^{ab}	0,5 $\pm$ 0,1 ^a	0,02	0,29	0,02

Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste Duncan ao nível de 5% de significância

Legenda: ETR= escore do trato reprodutivo; UT =útero; OV= ovário

A Tabela 3 demonstra os valores dos parâmetros de velocidade e fluxo sanguíneo com base na presença do CL.

A presença do CL influenciou significativamente ($P<0,05$) nos valores de velocidade diastólica final do ovário e nos índices de pulsatilidade e resistência do útero e tendeu a influenciar nos valores destes mesmos índices no ovário. As mesmas apresentaram maiores valores nos animais sem CL.

Tabela 3 – Características hemodinâmicas (média $\pm$ EPM) do corno uterino e ovário de novilhas Nelore com e sem corpo lúteo.

Variável resposta	Corpo Lúteo		Valor de P
	Com CL	Sem CL	
Vascularização UT	19,1 $\pm$ 2,2	19,3 $\pm$ 1,4	0,07
Vascularização OV	11,4 $\pm$ 2,6	9,3 $\pm$ 0,6	0,80
Pixels UT	2272,7 $\pm$ 346,5	2695,6 $\pm$ 234,8	0,64
Pixels OV	888,7 $\pm$ 198	833,7 $\pm$ 61,5	0,56
Pulso sistólico UT	22,2 $\pm$ 2,9	27,4 $\pm$ 1,2	0,09
Pulso sistólico OV	13,9 $\pm$ 3,6	17,5 $\pm$ 1,3	0,08
Velocidade diastólica UT	12,3 $\pm$ 1,4	13,7 $\pm$ 0,9	0,57
Velocidade diastólica OV	7,6 $\pm$ 2,6	11,7 $\pm$ 0,9	0,01
Índice de pulsatilidade UT	0,7 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,0	0,02
Índice de pulsatilidade OV	0,5 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,0	0,06
Índice de resistência UT	0,3 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	0,006
Índice de resistência OV	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,0	0,07

($P<0,05$)

Legenda: UT = útero; OV= ovário

Nas tabelas 4 a 7 estão apresentadas as correlações significativas ($P<0,05$). Com base no coeficiente de determinação (r^2), as correlações estão classificadas como moderada ($r^2 = 0,50-0,69$), alta ($r^2 = 0,70-0,89$) e muito alta ($r^2 = 0,90-1,00$) (MUKAKA, 2012). As variáveis não correlacionadas não foram apresentadas.

Tabela 4. Coeficientes de determinação e significância entre o escore do trato reprodutivo (ETR) e variáveis correlacionadas.

Correlações entre variáveis	r²	P
ETR x Ø corno uterino	0,56	0,0005
ETR x Ø folículo dominante	0,49	0,0029
ETR x taxa de ovulação (%)	0,51	0,0019
ETR x pixels UT	0,50	0,0022

Legenda: ETR= escore do trato reprodutivo; UT=útero; Ø=diâmetro

Tabela 5. Coeficientes de determinação e significância entre diâmetro do corno uterino, folículo dominante e variáveis correlacionadas.

Correlações entre variáveis	r²	P
Ø Corno uterino x ETR	0,56	0,0005
Ø Corno uterino x vascularização UT	0,58	0,0020
Ø Corno uterino x pixels UT	0,57	0,0004
Ø Folículo dominante x ETR	0,49	0,0029
Ø Folículo dominante x taxa de ovulação	0,50	0,0022
Ø Folículo dominante x vascularização CL	0,63	0,0479

Legenda: ETR= escore do trato reprodutivo; UT= útero; CL= corpo lúteo; Ø=diâmetro

De modo geral, as correlações entre as variáveis área de vascularização e número de pixels foram altamente significativas, apresentando valores de r variando de 0,87 a 0,89 e valores de p entre <0,0001 e 0,0010, evidenciando que as duas formas de avaliação da perfusão sanguínea são eficientes e podem ser usadas como método de avaliação.

Tabela 6. Coeficientes de determinação e significância entre variáveis dopplerfluxométricas e variáveis correlacionadas.

Correlações entre variáveis	r²	P
Vascularização UT x pixels UT	0,89	<0,0001
Vascularização UT x pixels do CL	0,65	0,0409
Vascularização OV x pixels OV	0,87	<0,0001
Vascularização do CL x pixels do CL	0,87	0,0010
Pixels ut x ETR	0,50	0,0022
Pixels UT x Ø corno uterino	0,57	0,0004
Pixels x pixels CL	0,69	0,0251
Índice de pulsatilidade CL x taxa de ovulação	-0,73	0,0154
Índice de pulsatilidade CL x velocidade diastólica CL	-0,79	0,0065
Índice de resistência UT x velocidade diastólica UT	-0,49	0,0041
Índice de resistência CL x taxa de ovulação	-0,69	0,0396
Índice de resistência CL x velocidade diastólica CL	-0,71	0,0293

Legenda: ETR= escore do trato reprodutivo; UT= útero; OV= ovário; CL= corpo lúteo; Ø=diâmetro

Tabela 7. Coeficientes de determinação e significância entre as concentrações plasmáticas de Progesterona (D0), Estradiol (D10) e variáveis correlacionadas.

Correlações entre varáveis	r²	p
Progesterona x ETR	0,44	0,0093
Progesterona x estradiol	0,41	0,0156
Estradiol x vascularização OV	0,40	0,0018
Estradiol x pixels OV	0,40	0,0183

Legenda: ETR= escore do trato reprodutivo; OV= ovário

Foi observado que as novilhas com ETR3 apresentaram concentrações de progesterona (P4) no dia zero (D0) significativamente maiores que as novilhas dos ETR2 e ETR1 com médias $13,50 \pm 4,6$ vs $2,71 \pm 0,83$ vs $1,78 \pm 0,47$ respectivamente ($P < 0,05$, Figura 5).

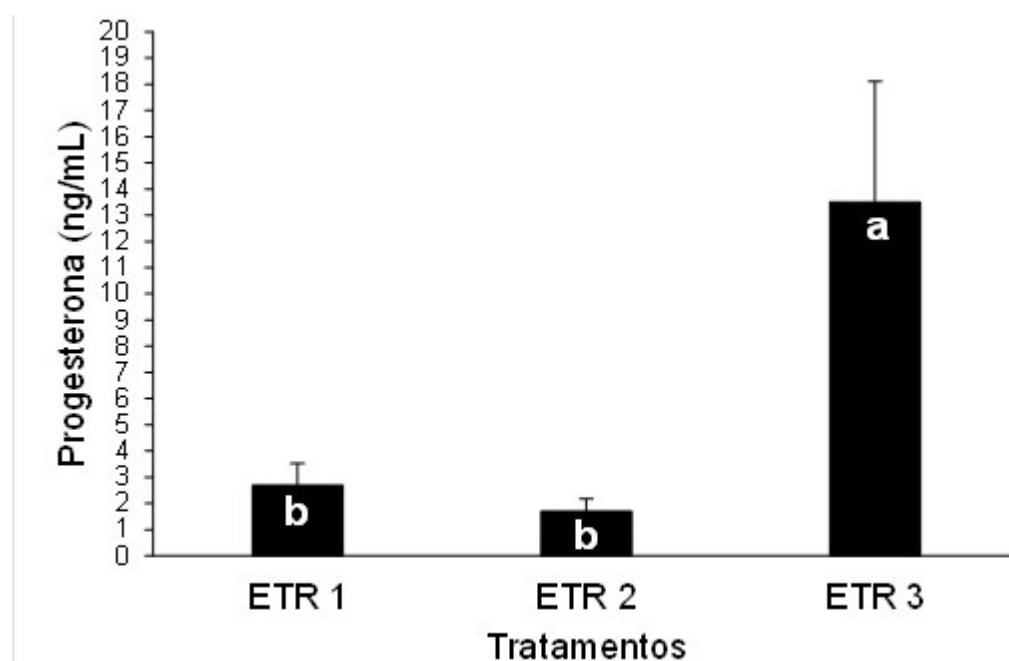


Figura 5– Concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) no dia zero (D0) do protocolo de novilhas Nelore de acordo com o escore do trato reprodutivo (ETR). ^{a,b} $P(<0,05)$.

As concentrações de estradiol (E2) no dia dez (D10) foram similares entre os ETRs, apresentando médias de $242,1 \pm 30,73$ vs $212,46 \pm 29,65$ vs $221,09 \pm 27,74$ para ETR3, ETR2 e ETR1 respectivamente ($P>0,05$; Figura 6).

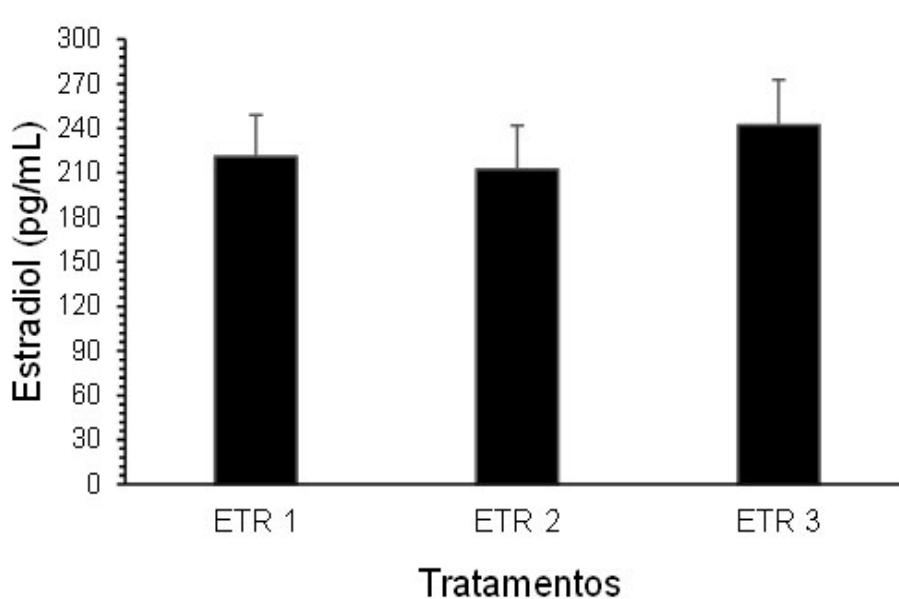


Figura 6– Concentrações plasmáticas de estradiol (pg/mL) no dia dez (D10) do protocolo de novilhas Nelore de acordo com o escore do trato reprodutivo (ETR). $P(>0,05)$.

6. DISCUSSÃO

A proposta apresentada para avaliação do ETR com uso da ultrassonografia convencional e Doppler demonstrou importante contribuição na detecção do grau de maturidade sexual de novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*).

O aumento observado no diâmetro dos cornos uterinos entre o início do protocolo de sincronização (D0) e o momento estimado para a IATF (D10) nas três categorias foi significativo e pode ter ocorrido em função da exposição à fonte de progestágeno do implante por oito dias. Bagley et al. (1996), observaram efeito semelhante em novilhas pré-púberes expostas a um progestágeno por dez dias e detectaram que nos dias nove e onze o peso uterino foi maior no tratamento Norgestomet do que nas novilhas controle. Estes autores concluíram que o rápido aumento no peso uterino após a remoção do Norgestomet foi provavelmente resultado do aumento nas concentrações de estradiol.

Em um estudo recente realizado no Brasil, novilhas *Bos indicus* tratadas com o progestágeno acetato de melengestrol (MGA) antes do início da estação reprodutiva, apresentaram maior taxa de serviço durante os primeiros dez dias após o fim do tratamento, e uma maior taxa de ciclicidade no meio da estação reprodutiva em comparação aos animais não tratados (MARTINS et al., 2015). Além disso, Sá Filho et al. (2008) relacionaram o desenvolvimento uterino de novilhas Nelore com a puberdade, e reportaram que este efeito sobre o desenvolvimento do trato reprodutivo foi decorrente da estimulação exercida pelo aumento das concentrações de E2 e P4 durante o período pós-púbere. Sales et al. (2008) avaliaram o efeito do tratamento com P4, associado à administração de Cipionato de estradiol no dia da retirada do dispositivo de P4, na indução de ciclicidade em novilhas cruzadas (*Bos taurus* x *Bos indicus*) pré-púberes. Verificou-se aumento na taxa de ciclicidade e no diâmetro uterino dos grupos tratados o que não foi observado nas novilhas do grupo controle. Desta forma estes resultados sugerem que, tanto a exposição ao E2 quanto à P4, são importantes no desenvolvimento uterino.

Em relação ao crescimento folicular observado no ETR 3 no dia D10 e a maior taxa de ovulação também observada no ETR3, foi provavelmente devido a

maturidade sexual deste grupo que era composto por novilhas já com atividade cíclica ao início do experimento. Vários estudos já demonstraram que os fatores mais determinantes para a ocorrência do crescimento folicular e a ovulação são sensibilidade hipotalâmica ao feedback negativo do E2, estoque hipofisário de LH e receptores ovarianos para LH e FSH (responsividade a gonadotrofinas), que são diretamente influenciados pelo status de maturidade sexual da fêmea (KINDER, 1987; SCHILLO et al., 1992; CARDOSO e NOGUEIRA, 2007). Os resultados das pesquisas de Rodrigues et al. (2002) permitem concluir que a reversão do feedback negativo ao E2 depende da maturação cronológica do eixo hipotalâmico-hipofisário, independentemente da concentração de E2. Conforme se aproxima a puberdade o efeito do feedback inibitório do E2 na secreção de LH diminui, permitindo um aumento na frequência e amplitude dos pulsos de LH (DAY et al., 1984).

Segundo Brown et al. (1988), os resultados obtidos com a suplementação à base de progestágenos não dependem da forma de administração e do tipo de progestágeno utilizado. Esses autores não observaram diferenças entre os tratamentos com MGA por via oral, misturado ao alimento, ou norgestomet (Syncromate- B), na forma de implante subcutâneo. Contudo, as porcentagens de aparecimento de estros e prenhez parecem ser maiores quando se utilizam novilhas já cíclicas em comparação àquelas ainda pré-púberes (TIBARY et al., 1992; TANAKA et al., 1995). Ainda, Chelikani et al. (2003) destacaram que, no caso de novilhas pré-púberes, outros fatores, como a idade e o peso ao momento do tratamento, exercem um importante efeito para que estes animais atinjam a puberdade.

A maior vascularização uterina nos ETR 2 e ETR 3 no D0, pode ter ocorrido em função dos cornos uterinos serem mais desenvolvidos, com maior diâmetro, promovendo um possível maior desenvolvimento vascular nestas categorias.

O crescimento cíclico do endométrio depende da proliferação capilar e do aumento no fluxo sanguíneo causado por vasodilatação e alterações na permeabilidade vascular (GIUDICE, 1996). Essas mudanças são reguladas pelo E2 e P4 através da ativação de seus receptores (LECCE et al., 2001), essenciais para o desenvolvimento da vascularização uterina durante a angiogênese (HERYANTO; LIPSON; ROGERS, 2003).

O efeito estimulatório dos hormônios E2, P4 e eCG, presentes no protocolo de sincronização da ovulação pode ter levado a um significativo aumento da vascularização uterina nas 3 categorias de ETR entre o D0 e o D10, principalmente do ETR 1, que era inferior aos demais no dia zero (D0), e aumentou chegando a um patamar de similaridade em relação ao ETR2 e ETR3 no D10. Wen et al. (2009) demonstraram que a P4 poderia estimular a secreção do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) das células epiteliais do endométrio e, subsequentemente, aumentar a vascularização subendometrial e o fluxo sanguíneo. Concluindo que a progesterona aumenta a receptividade do útero para o embrião através da indução da angiogênese endometrial. E o estradiol age como vasodilatador importante na artéria uterina (FORD,1982;GREISS e ANDERSON,1970), assim alguns trabalhos correlacionam o aumento no fluxo sanguíneo uterino com os níveis de estrógeno durante o estro em bovinos (BOLLWEIN et al., 2000; FORD, 1981; CHENAULT, 1981) e após a administração de estrógeno em vacas (ROMAN-PONCE et al., 1978). Honnens et al. (2008) mostraram em um estudo com vacas submetidas ao tratamento, superovulatório com gonadotrofinas que consistia na administração PGF2 α (657,5 mg cloprostenol) e GnRH (10 mg Buserelina 48h após (D0). No dia 10, os animais apresentam um aumento no volume de fluxo sanguíneo e uma relevante diminuição no IP de pulsatilidade da artéria uterina.

Um aumento do fluxo de sangue uterino após a estimulação hormonal folicular tem sido demonstrado também em pacientes de FIV na medicina humana (BASSIL et al., 1995; CACCIATORE; TIITINEN, 1996).

As velocidades de fluxo sanguíneo (pulso sistólico e velocidade diastólica) uterinos aumentaram significativamente no D10 nas três categorias de ETR, em nosso experimento. Segundo Bollwein et al. (2016), o fluxo de sangue uterino apresenta um padrão característico em vacas, e os valores máximos de velocidade ocorrem durante o pró-estro e estro, assim como ocorreu em nosso estudo. Existe uma correlação entre as alterações na velocidade do fluxo sanguíneo e a concentração de E2 e P4 no plasma, no entanto, estas correlações são moderadas. Esta constatação indica que não apenas hormônios esteróides sexuais, mas também

outros fatores estão envolvidos na regulação do fluxo sanguíneo uterino. No entanto, estes fatores ainda não foram completamente identificados (BOLLWEIN et al., 2016).

Os índices Doppler (IR e IP) arteriais apresentam uma correlação negativa com a perfusão vascular do tecido irrigado pela artéria em questão (GINTHER, 2007). Desta forma, uma diminuição de pelo menos um dos índices Doppler era esperada nos momentos de aumento significativo na perfusão sanguínea do útero, o que não foi observado neste estudo, pois mesmo durante os momentos em que aumentos na perfusão sanguínea do útero foram detectados, os índices Doppler mantiveram-se inalterados.

Em nosso estudo também não foram observadas mudanças no padrão vascular ovariano em nenhuma das fases do ciclo estral nas categorias estudadas. Resultados diferentes foram encontrados por Köster et al. (2001), em cadelas, que observaram mudança no padrão vascular ovariano durante as fases do ciclo estral, com aumento gradual da perfusão ovariana e velocidade de fluxo sanguíneo no pró-estro, e consequente declínio nos IP e IR. Em éguas, a vascularização folicular é máxima 24 horas antes da ovulação espontânea ou induzida com hCG, e uma diminuição abrupta da perfusão sanguínea folicular ocorre durante as quatro últimas horas que antecedem a ovulação (GASTAL et al., 2006).

Quanto aos índices Doppler ovarianos, houve efeito de ETR e interação ETRxDIA no IR, sendo que no D0 os ETRs 1 e 3 foram semelhantes. Este resultado não se repetiu no D10, tendo ocorrido aumento deste índice somente no ETR3, o que indica baixa perfusão sanguínea. Esta mudança no padrão de perfusão sanguínea pode estar associada à ausência do CL no ETR3 neste dia, pois os animais deste grupo se encontravam na fase lútea no D0, enquanto que no D10 estavam na fase folicular com presença apenas de folículo pré-ovulatório. De acordo com Schurz et al. (1993), a diminuição no IR arterial é determinada pela neovascularização ao redor do folículo dominante e, subsequentemente do corpo lúteo, e pela vasodilatação induzida pelo estradiol nas artérias ovarianas. Sladkevicius et al. (1993) que estudaram a circulação uterina e ovariana no ciclo normal de mulheres, verificaram que no ovário dominante, ou seja, o que possui o folículo com maior crescimento, o IP diminui após a ruptura folicular, sendo significativamente mais baixo na fase luteínica do que na fase folicular. Índices de

resistência mais baixos são vistos nas artérias uterinas de de mulheres na fase luteínica (GOSWAMY et al., 1988; GOSWAMY e STEPTOE.,1988; DAL et al., 2005).

No trabalho desenvolvido por Koster et al.(2001), em cadelas Beagle, a ovulação e o início da fase luteínica em cadelas são caracterizadas por alta velocidade de fluxo sanguíneo da artéria intraovariana e baixos valores do IP e IR, e a perfusão máxima reflete o período de alta produção de progesterona. Entretanto, a regressão lútea é acompanhada por um declínio gradual do suprimento sanguíneo com alto IP e IR. Adicionalmente não foram observados efeitos de tratamento, dia ou interação, em relação aos valores de IP.

A presença do CL influenciou nos IR e IP uterinos, estes, foram maiores nos animais sem CL, indicando menor perfusão sanguínea. Quando o CL está presente o fluxo sanguíneo é destinado a ele, deixando as demais áreas menos vascularizadas (WILTBANK, 1994). Desta forma, também se observou maior velocidade diastólica ovariana nos animais sem CL, pois o fluxo sanguíneo do ovário, avaliado isoladamente, é reduzido na presença do CL. Portanto, estas mudanças cíclicas que ocorrem no aporte sanguíneo do ovário e CL, durante o diestro, devem ser principalmente determinadas por mudanças na resistência vascular ovariana devido ao crescimento e regressão dos capilares luteais (BOLLWEIN et al., 2002).

As correlações observadas entre ETR e diâmetro uterino e do folículo dominante já eram esperadas, pois os mesmos foram os parâmetros utilizados como um método indicador para determinar o ETR, ou seja quanto maior o diâmetro destas estruturas naturalmente maior tende a ser o ETR.

A taxa de ovulação também foi moderadamente correlacionado com o ETR, ou seja as novilhas com maior ETR, consideradas púberes apresentaram maior taxa de ovulação. Segundo Patterson, et al. (1999), novilhas com menor escore do trato reprodutivo são consideradas impúberes, escore intermediário pré-púberes, e com o escore máximo púberes. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Anderson et al. (1991) e Peres et al. (2007) sobre a taxa de prenhez, mostram que novilhas com melhor escore do aparelho reprodutor apresentaram maiores taxas de prenhez ao final da EM. Da mesma forma Montanholi et al. (2004), trabalhando com novilhas, verificaram que animais com escore do aparelho reprodutivo < 3 (escala de 1 a 5), tiveram taxas de prenhez, cerca de 10% a 20% menores que animais com

escores maiores. Esses resultados em conjunto mostram que tanto o diâmetro folicular quanto o diâmetro uterino apresentam relação com a fertilidade das novilhas.

Outro fator positivamente correlacionado com a taxa de ovulação é o diâmetro do folículo dominante, ou seja, a melhor resposta ovulatória foi a dos folículos de maior diâmetro. Resultados semelhantes aos encontrados por Butter et al. (2011), quando estudaram esse fator em novilhas de corte sincronizadas para IATF e observaram que as novilhas que ovularam apresentavam folículos de maior diâmetro em relação as que não ovularam, sugerindo que o sucesso dos protocolos de sincronização depende do crescimento e desenvolvimento do folículo dominante.

A utilização de gonadotrofinas em tratamentos superovulatórios como o FSH e hCG ou eCG aumentam o estradiol folicular (PRICE et al., 1999). Sá Filho et al. (2010) reportaram que novilhas tratadas com eCG obtiveram maior diâmetro do folicular, maior taxa de ovulação, diâmetro do CL e taxa de prenhez à IATF, demonstrando a eficácia da utilização da eCG em programas de IATF.

Em nosso estudo as novilhas com maior diâmetro folicular formaram CLs mais vascularizados. Moura et al. (2001) observaram que novilhas receptoras de embriões que possuíam maior diâmetro folicular, apresentaram também CLs de maior tamanho e com maior capacidade de secretar P4. Da mesma maneira, Vasconcelos et al. (2001) concluíram que vacas que ovularam folículos menores apresentaram fertilidade comprometida provavelmente pelo menor CL que levou à menor concentração de P4 que é fundamental para o desenvolvimento embrionário. Durante o desenvolvimento inicial do corpo lúteo, o fluxo sanguíneo aumenta paralelamente ao aumento da concentração circulante de P4, sendo então a vascularização associada ao potencial em produzir progesterona (ACOSTA et al., 2003).

A alta correlação apresentada entre a área de vascularização e o número absoluto de pixels das estruturas validou estas duas técnicas, demonstrando que a perfusão sanguínea dos ovários e do útero podem ser avaliadas tanto subjetivamente quanto objetivamente, como já descrito em éguas e novilhas (SILVA et al., 2005; GINTHER, 2007). Foi observada, ainda, uma correlação negativa entre os índices Doppler do CL com a taxa de ovulação, sendo que os IR e IP mais baixos do foram observados no grupo de animais com maior taxa de ovulação, estes

menores índices refletem em uma maior vascularização destas estruturas. Como dito anteriormente, a redução nos índices Doppler de um vaso sanguíneo indica um aumento no fluxo sanguíneo em direção ao tecido/órgão irrigado pelo mesmo (GINTHER e UTT, 2004; GINTHER, 2007).

A concentração sérica de P4 no plasma sanguíneo dos animais confirmou a acurácia do exame ultrassonográfico como método de avaliação do *status* puberal e identificação do ETR em novilhas. A concentração de P4, está associada com a idade à puberdade, como descrito por Honaramooz et al. (1999), os quais definiram que a primeira vez que o nível plasmático de P4 excede 1,0 ng/mL, caracteriza-se que ocorreu a primeira ovulação, indicativo da puberdade da novilha.

Em nossa pesquisa, as concentrações de P4 foram significativamente maiores nas novilhas com ETR 3, as quais apresentaram 100% de amostras com P4 > 1 ng/mL. Já nos ETRs 1 e 2, o percentual de fêmeas com P4 > 1 ng/mL foi respectivamente de 72,7 e 61,5%, muito embora, não tenha sido observado CL em nenhum dos exames realizados. Este achado pode ter decorrido da produção de P4 pela glândula adrenal, que também é capaz de produzir quantidades significativas deste hormônio quando estimulada por elevados níveis de ACTH que é um dos principais componentes ativadores do eixo adrenocorticotrófico estresse-mediado (WILLARD et al., 2005). O comportamento mais arreadio principalmente em manejos mais intensivos e estressantes, tal qual ocorre durante colheita de sangue, é frequentemente observado em animais *Bos indicus* Monteiro et al. (2009), podendo contribuir para o aumento da P4 plasmática em novilhas *Bos indicus* pré-púberes (CURLEY et al., 2008).

Outra possibilidade a ser discutida é a acurácia do teste utilizado para as dosagens hormonais, que foi o Ensaio Imunoenzimático (ELISA). Este teste, tem se mostrado eficiente em caracterizar as concentrações de hormônios esteróides (QUEIROZ, 2011; FISCHER, 2013). Contudo, Relave et al. (2007), avaliando as concentração de P4 em éguas pelos métodos Radioimunoensaio (RIA) e ELISA, encontraram níveis significativamente mais baixos de P4 no método RIA em comparação com o método ELISA. Apesar desta diferença entre estes métodos a alta correlação entre os mesmos validou a confiabilidade dos resultados, segundo os autores. Ainda, o método ELISA apresentou sensibilidade de 86% e

especificidade de 79% em relação ao exame ultrassonográfico para detecção de função luteal (P4) em vacas *Bos taurus* leiteiras (BROES e LEBLANC, 2014).

Resultados semelhantes aos de nosso estudo também foram relatados em novilhas Brahman (COOKE e ARTHINGTON, 2009) e Nelore (CLARO JUNIOR et al., 2010) pré-púberes, as quais apresentaram níveis de P4 acima de 1 ng/mL, mesmo não tendo apresentado CL ao exame ultrassonográfico.

A despeito do maior crescimento folicular e da maior taxa de ovulação no ETR 3, os níveis plasmáticos de E2 no D10 foram similares nos três ETRs. Isto provavelmente ocorreu em função às concentrações residuais de E2 devidas à administração do Benzoato de Estradiol no dia nove do protocolo (D9). Acreditamos que a suplementação exógena com 1 mg de benzoato de estradiol no protocolo de sincronização se sobrepôs à produção endógena, considerando que a meia-vida plasmática deste fármaco pode ser de até 70–114 horas após administração (ROURKE et al., 2000; VYNCKIER et al., 1990), fazendo com que as concentrações de E2 fossem similares nas diferentes categorias.

A maior taxa de ovulação encontrada no ETR3 já era esperada, pois, em animais cíclicos, o aumento da concentração de estradiol durante a fase folicular induz ao pico pré-ovulatório de LH (YOUNGQUIST e THRELFALL, 2007) e consequente ovulação (SALES et al., 2012). Por outro lado, em animais pré-púberes, com ETR 1 e 2, o estradiol circulante exerce *feedback* negativo sobre a liberação de gonadotrofinas (SCHILLO et al., 1991). Em um manuscrito clássico, Day et al. (1987) comprovaram a hipótese de que o declínio do *feedback* negativo exercido pelo estradiol na secreção de LH durante o período peripuberal em novilhas resulta de um declínio na concentração de receptores de estradiol no hipotálamo e na hipófise. Segundo os mesmos autores, o aumento na secreção de LH, estimula o aumento na produção folicular de estradiol, aumento no crescimento uterino peripuberal, primeira ovulação e elevação imediata nas concentrações de P4.

Neste sentido, reforça-se a importância de determinar do *status* puberal por meio da avaliação do escore do trato reprodutivo em novilhas, objetivando a tomada de decisões sobre a melhor técnica de manejo a ser adota e a melhoria na eficiência reprodutiva do rebanho. Ressalta-se ainda, a necessidade de estudos adicionais em outras raças ou categorias animais que possam contribuir com conhecimento sobre

o padrão de vascularização sanguínea do trato reprodutivo de fêmeas bovinas e sua relação com o desenvolvimento.

7 SUMÁRIO DE RESULTADOS

- Houve correlação do ETR com crescimento folicular e taxa de ovulação sincronizada em novilhas da raça Nelore.
- Houve correlação do ETR com desenvolvimento e vascularização dos cornos uterinos.
- Houve correlação entre as concentrações de P4 ao início do tratamento com Norgestomet e as concentrações de estradiol no dia da IATF.
- O fluxo sanguíneo uterino foi maior na fase de dominância folicular, após sincronização da ovulação.

8 CONCLUSÃO

O ETR influencia no crescimento folicular, na taxa de ovulação e na vascularização dos cornos uterinos em novilhas Nelore (*Bos indicus*).

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, T.J.; YOSHIZAWA, N.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F(2 alpha) injection in the cow. **Biology of reproduction**, v. 66, p. 651–658, 2002.

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

ACOSTA, T.J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal reproduction science**, v. 82-83:127-40, 2004.

ACOSTA, T.J.; HAYASHI, K.G.; MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Changes in follicular vascularity during the first follicular wave in lactating cows. **Journal of Reproduction and Development**, v 51, p. 273–280, 2005.

ALENCAR, M. M.; COSTA, J. L.; CORRÊA, L. A. Desempenho reprodutivo de fêmeas das raças canchin e nelore. I Desenvolvimento e puberdade. **Revista Agropecuária Brasileira**, v. 22, 1987.

ANDERSON, K. J.; LEFEVER, D.G.; BRINKS, J.S.; ODDE, K.G. The use of reproductive tract scoring in beef heifers. **Agri-Practice**, v.12, p.19–26, 1991.

BAGLEY, C. P. Nutritional management of replacement beef heifers: a review. **Journal of animal science**, v. 71, p. 3155-3163, 1993.

BARROS, B.J.P.; VISINTIN, J. A. Controle ultra-sonográfico de gestações, de mortalidades embrionárias e fetais e do sexo de fetos bovinos zebuínos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, p. 74-79, 2001.

BASSIL, S; WYNS, C; TOUSSAINT-DEMYLLE, D; NISOLLE, M; GORDTS, S; DONNEZ, J. The relationship between ovarian vascularity and the duration of stimulation in in-vitro fertilization. **Human Reproduction**, v. 12, p. 1240–1245, 1997.

BERGMANN, J. A. G. Melhoramento genético da eficiência reprodutiva em bovinos de corte. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 1993, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, p. 70 – 86, 1993. (Suplemento).

BERGMANN, J. A. G.; ZAMBORLINI, L. C.; PROCÓPIO, C. S. O.; ANDRADE, V. J.; VALE FILHO, V. R. Estimativas de parâmetros genéticos do perímetro escrotal e do peso corporal em animais da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 48, p. 69 – 78, 1996.

BOLLWEIN, H.; MAIERL, J.; MAYER, R.; STOLLA, R. Transrectal color Doppler sonography of the A. uterine in cyclic mares. **Theriogenology**, v.49, p.1483–1488, 1997.

BOLLWEIN, H.; MAIERL, R.; STOLLA, R. Transrectal color Doppler sonography of the A. uterine in cyclic mares. **Theriogenology**, v. 49, p.1483-1488, 1998.

BOLLWEIN, H.; MEYER, H.H.; MAIERL, J.; WEBER, F.; BAUMGARTNER, U.; STOLLA, R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in cows during the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 53, p. 1541–1552, 2000.

BOLLWEIN, H.; BAUMGARTNER, U.; STOLLA, R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in cows during pregnancy. **Theriogenology**, v.57, p. 2053–2061, 2002.

BOLLWEIN, H.; MAYER R.; STOLLA, R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow during early pregnancy in mares. **Theriogenology**, v. 60, p. 597-605, 2003.

BOLLWEIN, H.; HEPPELMANN, M.; LÜTTGENAU, J. Ultrasonographic Doppler Use for Female Reproduction Management. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 32, p. 149-164, 2016.

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

BROES, A.; LEBLANC, S. J. Comparison of commercial progesterone assays for evaluation of luteal status in dairy cows. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 55, p. 582, 2014.

BROWN, L. N.; ODDE, K. G.; KING, M. E.; LEFEVER, D. G.; NEUBAUER, C. J. Comparison of melengestrol acetate-prostaglandin F₂ α to Syncro-Mate B for estrus synchronization in beef heifers. **Theriogenology**, v. 30, p. 1-12, 1988.

BUSKIRK, D. D.; FAULKNER, D. B.; IRELAND, F. A. Increased post-weaning gain of beef heifers enhances fertility and milk production. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 937 – 946, 1995.

CACCIATORE, B; SIMBERG, N; FUSARO, P; TIITINEN, A. Transvaginal Doppler study of uterine artery blood flow in in vitro fertilization- embryo transfer cycles. **Fertil Steril**, v. 66, p.130–4, 1996.

CARDOSO, D.; NOGUEIRA, G.P. Mecanismos neuroendócrinos envolvidos na puberdade de novilhas. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar, Umuarama*, v. 10, n. 1, p. 59-67, 2007.

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

CARVALHO, C. F.; CERRI, G. G.; CHAMMAS, M. C. Parâmetros Doppler velocimétricos das artérias renais e da aorta abdominal em gatos da raça persa. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1105-1110, 2009.

CHELIKANI, P. K.; AMBROSE, J. D.; KENNELLY, J. J. Effect of dietary energy and protein density on body composition, attainment of puberty, and ovarian follicular dynamics in dairy heifers. **Theriogenology**, v. 60, p. 707-725, 2003.

COOKE, R. F.; ARTHINGTON, J. D. Plasma progesterone concentrations as puberty criteria for Brahman-crossbred heifers. **Livestock Science**, v.123, p. 101-105, 2008.

COLLINS, W.; JURKOVIC, D.; BOURNE, T.; KURJAK, A.; CAMPBELL, S. Ovarian morphology, endocrine function and intra-follicular blood flow during the peri-ovulatory period. **Human Reproduction**, v. 6, 319–324, 1991.

CUNNINGHAM, R. B.; AXELSEN, A.; MORLEY, F. H. W. The analysis of distribution of conception times in beef heifers. **Australian Journal Agricultural Research**, v. 31, p. 669, 1981.

CURLEY, K.O.; NEUENDORFF, D.A.; LEWIS, A.W.; CLEERE, J.J.; WELSH, T.H.; RANDEL, R.D. Functional characteristics of the bovine hypothalamic– pituitary– adrenal axis vary with temperament. **Hormones and Behavior**, v.53, p.20 –27, 2008.

DAY, M. L.; IMAKAWA, K.; GARCIA-WINDER, M.; ZALESKY, D. D.; SCHANBACHER, B. D.; KITOK, R. J.; KINDER, J. E. Endocrine mechanisms of puberty in heifers. Estradiol negative feedback regulation of luteinizing hormone secretion. **Biology of Reproduction**, v. 31, p. 332 – 341, 1984.

DAY, M. L.; IMAKAWA, K.; WOLFE, P. L.; KITOK, R. J.; KINDER, J. E. Endocrine mechanisms of puberty in heifers. Role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. **Biology of Reproduction**, v. 37, p.1054 – 1065, 1987.

DAY, M.L.; ANDERSON, L.H. Current concepts on the controle f puberty in cattle. **Journal of Animal Science**, v.76, p.1-15, 1998.

DAHLEN, C. R.; LAMB, G. C.; ZEHNDER, C. M.; MILLER, L. R.; DI COSTANZO, A. Fixed-time insemination in peripuberal, lightweight replacement beef heifers after estrus synchronization with PGF2alpha and GnRH. **Theriogenology**, v. 59, p.1827-1837, 2003.

ELER, J.P. Estratégias para antecipar a puberdade em novilhas de corte. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 4, 2004, Viçosa-MG. **Anais...** Viçosa: UFV, p.449-458, 2004.

EMERICK, L.L.; DIAS, J.C.; GONÇALVES, P.E.M.; MARTINS, J.A.M.; LEITE, T.G.; ANDRADE, V.J.; VALE FILHO, V.R. Aspectos relevantes sobre a puberdade em fêmeas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, p.11-19, 2009.

EVANS, A. C. O., CURRIE, W. D., RAWLINGS, N. C. Effects of naloxone on circulating gonadotrophin concentrations in prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 96, p. 847 – 855, 1992.

FABER, J. J.; THORNBURG, K. L. Placental Physiology. Structure and Function of Fetomaternal Exchange, **Raven Press**, p. 143-150, 1983.

FERREIRA J. C.; GASTAL, E. L.; GINTHER, O. J. Uterine blood flow and perfusion in mares with uterine cysts: effect of the size of the cystic area and age. **Reproduction**, v. 135, p. 541-550, 2008.

FERREIRA, A. M. Reprodução da fêmea bovina: fisiologia aplicada e problemas mais comuns (causas e tratamentos). **1ª edição. Editar, Juiz de Fora, MG**, 2010.

FERREIRA, J.C.; IGNÁCIO, F.S.; MEIRA, C. Doppler ultrasonography principles and methods of evaluation of the reproductive tract in mares. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, p.105-111, 2011.

FERRELL, C. L. Effects of post-weaning rate of gain on onset of puberty and productive performance of heifers of different breeds. **Journal of Animal Science**, v.55, p. 1272 – 1283, 1982.

FINN-BODNER, S. T.; HUDSON, J. A. Abdominal vascular sonography. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.28, p.887- 942, 1998.

FISCHER, N. Cloração de água com 17-beta-estradiol e utilização do teste YES para avaliação de estrogenicidade. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento), Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, SP, 2013.

FLECK, A. T.; SCHALLES, R. R.; KIRACOFÉ, G. H. Effect of growth rate through 30 months on reproductive performance of beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 51, p. 816 – 821, 1980.

FORD, S.P.; CHENAULT J.R.; ECHTERNKAMP, S.E. Uterine blood flow of cows during the estrous cycle and early pregnancy: effect of the conceptus on the uterine blood supply. **Reprod Fertil**, v.56, p.53- 62, 1979.

FORD, S. P.; CHENAULT, J. R. Blood flow to the corpus luteum-bearing ovary and ipsilateral uterine horn of cows during the oestrous cycle and early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, p. 555–562, 1981.

FORD, S.P. Control of Uterine and ovarian blood flow throughout the estrous cycle and pregnancy of ewes, sows and cow. **Journal of Animal Science**, v. 55, p. 32-42, 1982.

FORDYCE, G.E.; DODT, R.M.; WYTHES, J.R. Cattle temperaments in extensive beef herds in northern Queensland. 1. Factors affecting temperament. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.28, p.683–687, 1988.

GASSER, C. L.; GRUM, D. E.; MUSSARD, M. L.; FLUHARTY, F. L.; KINDER, J. E.; DAY, M. L. Induction of precocious puberty in heifers I: Enhanced secretion of luteinizing hormone. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 2035 – 2041, 2006.

GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; GINTHER, O. J. Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. **Reproduction** v. 131, p. 699-709, 2006.

GIUDICE, G. Molecular mechanisms in developmental biology. **Cell Biol Int**, v. 20, p. 29-32, 1996.

GINTHER, O.J. **Reproductive Biology of the Mare, Basic and Applied Aspects**, 2nd ed. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 642p.,1992.

GINTHER, O.J.; MATTHEW, D.U. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.24 p.516-526, 2004.

GINTHER, O.J; UTT, M.D. Doppler Ultrasound in Equine Reproduction: Principles, Techniques, and Potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 24, p. 516-526, 2004.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; CHECURA, C.M.; BEG, M.A. Dose response study of intrafollicular injection of insulin-like growth factor-1 on follicular-fluid factors and follicle dominance in mares. **Biology of reproduction**, v. 70, p. 1063– 1069, 2004.

GINTHER, O.J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: Color-Doppler ultrasonography**. Ed. OJ Ginther, 1. ed. Cross Plains: Equiservices Publishing, p. 258, 2007.

GINTHER, O.J.; SILVA, L.A.; ARAUJO, R.R.; BEG, M.A. Temporal associations among pulses of 13, 14-dihydro-15-keto-PGF_{2a}, luteal blood flow, and luteolysis in cattle. **Biology of reproduction**, v. 76, p. 506-513, 2007.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; COOPERA, D.A. Treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17 β -estradiol decrease and a more rapid LH increase in mares. **Animal Reproduction Science**, v.114, p.311–317, 2009.

GOSWAMY, R. K.; WILLIAMS, G.; STEPTOE, P. C. Decreased uterine perfusion—a cause of infertility. **Human Reproduction**, v.3, p. 955-959, 1988.

GRANATA, A.; FIORINI, F.; ANDRULLI, S.; LOGIAS, F.; GALLIENI, M.; ROMANO, G.; SICUREZZA, E.; FIORE, C. E. Doppler ultrasound and renal artery stenosis: na overview. **Journal of Ultrasound**, Philadelphia, v. 12, p. 133-143, 2009.

GRESSLER, S. L.; BERGMANN, J. A. G.; PENNA, V. M.; PEREIRA, C. S.; PEREIRA, J. C. C. Estudos das associações genéticas entre perímetro escrotal e características reprodutivas de fêmeas da raça Nelore. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 358, Botucatu, SP, 1998. **Anais**. SBZ, Botucatu, SP, v. 3, p. 368 – 370.

GREISS, F. C.; ANDERSON, S. G. Effect of ovarian hormones on uterine vascular bed. **American Journal of Obstetric and Gynecology**, v. 107, p. 829, 1970.

GUTIERREZ, K.; KASIMANICKAM, R.; TIBARY, A.; GAY, J. M.; KASTELIC, J. P.; HALL, J. B.; WHITTIER, W. D. Effect of reproductive tract scoring on reproductive efficiency in beef heifers bred by timed insemination and natural service versus only natural service. **Theriogenology**, v. 81, p. 918-924, 2014.

HALL, J. B.; STAIGMILLER, R. B.; BELLOWS, R. A.; SHORT, R. E.; MOSELEY, W. M.; BELLOWS, S. E. Body composition and metabolic profiles associated with puberty in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 3409 – 3420, 1995.

HERYANTO, B.; LIPSON, K. E.; ROGERS, P. A. Effect of angiogenesis inhibitors on oestrogen-mediated endometrial endothelial cell proliferation in the ovariectomized mouse. **Reproduction**, v. 125, p. 337-346, 2003.

HESS, B. W. Estratégias para antecipar a puberdade em novilhas. Novos enfoques na produção e reprodução de bovinos, **Anais**, Uberlândia, MG p. 118 – 126, 2002.

HERZOG, K.; BOLLWEIN, H. Application of Doppler ultrasonography in cattle reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, p. 42, p. 51-58, 2007.

HITE, S. S.; KASIMANICKAM, R. K.; KASIMANICKAM, V. R. Fertility after two doses of PGF2 α concurrently or at 6-hour interval on the day of CIDR removal in 5-day CO-Synch progesterone-based synchronization protocols in beef heifers. **Theriogenology**, 2016.

HOFFMANN, B.; SCHULER, G. The bovine placenta; a source and target of steroid hormones: observations during the second half of gestation. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.309–320, 2002.

HOLM, D. E.; P. N. THOMPSON, P. C. IRONS. The economic effects of an estrus synchronization protocol using prostaglandina in beef heifers. **Theriogenology**, v.70, p.1507–1515, 2008.

HOLM, D.E.; THOMPSON, P.N.; IRONS, P.C. The value of reproductive tract scoring as a predictor of fertility and production outcomes in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v.87, p.1934-1940, 2009.

HONARAMOOZ, A.; CHANDOLIA, R.K.; BEARD, A.P.; RAWLINGS, N.C. Effects of season of birth on the prepubertal pattern of gonadotrophin secretion and age at puberty in beef heifers. **Theriogenology**, v. 52, 67–79, 1999.

HONARAMOOZ, A.; ARAVINDAKSHAN, J.; CHANDOLIA, R. K.; BEARD, A. P., BARTLEWSKI, P. M.; PIERSON, R. A.; RAWLINGS, N. C. Ultrasonographic evaluation of the pre-pubertal development of the reproductive tract in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 80, p.15 – 29, 2004.

HONNENS, A.; NIEMANN, H.; PAUL, V.; MEYER, H. H. D.; BOLLWEIN, H. Doppler sonography of the uterine arteries during a superovulatory regime in cattle: uterine blood flow in superovulated cattle. **Theriogenology**, v. 70, p. 859-867, 2008.

JÚNIOR, I. C.; SÁ FILHO, O. G.; PERES, R. F. G.; AONO, F. H. S.; DAY, M. L.; VASCONCELOS, J. L. M. Reproductive performance of prepubertal *Bos indicus* heifers after progesterone-based treatments. **Theriogenology**, v. 74, p. 903-911, 2010.

KASTELIC, J.P.; CURRAN, S.; PIERSON, R. A.; GINTHER, O.J. Ultrasonic evaluation of the bovine conceptus. **Theriogenology**, v. 29, p.39–54, 1988.

KINDER, J. E.; DAY, M. L.; KITTOCK, R. J. Endocrine regulation of puberty in cows and ewes. **J. Reprod. Fertil.**, supl 34: v. 34, p. 167, 1987.

KINDER, J. E.; BERGFELD, E. G.; WEHRMAN, M. E.; PETERS, K. E., KOJIMA, F. N. Endocrine basis for puberty in heifers and ewes. **Journal of reproduction and fertility**, v. 49, p. 393-407, 1995.

KÖSTER, K.; POULSEN NAUTRIP, C.; GÜNZEL-APEL, A.R. A Doppler ultrasonographic study of cyclic changes of ovarian perfusion in the Beagle bitch. **Reproduction**, v.122, p.453-461, 2001.

LANNA, D. P. D. Fatores condicionantes e predisponentes da puberdade e da idade de abate. In: SIMPÓSIO SOBRE PECUÁRIA DE CORTE, 4., Produção de novilho de corte, 1996, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários "Luiz de Queiroz", 1997, p.41-78.

LANNA, D.P. Fatores condicionantes e predisponentes da puberdade e da idade de abate. In: SIMPÓSIO SOBRE PECUÁRIA DE CORTE, 4., 2004, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba, p.41-78, 2004.

LASTER, D. B.; GLIMP, H. A.; GREGORY, K. E. Age and weight at puberty and conception in different breeds and breed-crosses of beef heifers. **Journal of Animal**

Science, v. 34, p. 1031, 1972.

LAMMERS, B. P.; HEINRICHS, A. J.; KENSINGER, R. S. The effects of accelerated growth rates and estrogen implants in prepubertal Holstein heifers on estimates of mammary development and subsequent reproduction and milk production. **Journal Dairy Science**, v. 82, p. 1753 – 1764, 1999.

LECCE, G.; MEDURI, G.; ANCELIN, M.; BERGERON, C.; PERROT-APPLANAT, M. Presence of estrogen receptor beta in the human endometrium through the cycle: expression in glandular, stromal, and vascular cells. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 86, p.1379-86. 2001.

MACHADO, R.; CORRÊA, R. F.; BARBOSA, R. T.; BERGAMASCHI, M. A. C. M. Escore de condição corporal e sua aplicação no manejo reprodutivo de ruminantes. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 16 p.(Embrapa Pecuária Sudeste. Circular Técnica, 57), 2008.

MACNEIL, M. D.; CUNDIFF, L. V.; DINKEL, C. A.; KOCH, R. M. Genetic correlations among sex-limited traits in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.58, p.1171, 1984.

MARTIN, L.C.; BRINKS, J.S.; BOURDON, R.M.; CUNDIFF, L.V. Genetic effects on beef heifer puberty and subsequent reproductive. **Journal of Animal Science**, v.70, p.4006-4017, 1992.

MARTINS, J. H.; SANTOS, C. S.; SILVA, M. A. V.; AGUIAR, H. M. V. S. B.; FRANÇA, I. G.; PEREIRA, H. G.; MF FILHO, S. Impact of puberty status and melengestrol acetate supplementation before the breeding period on reproductive efficiency of beef heifers. **Journal of animal science**, v.93, p. 2796-2805, 2015.

MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Evaluation of ovarian blood flow by colour Doppler ultrasound: practical use for reproductive management in the cow. **The Veterinary Journal**, v. 181, p. 232-40, 2009.

MATTIOLI, M.; BARBONI, B.; TURRIANI, M.; GALEATI, G.; ZANNONI, A.; CASTELLANI, G.; BERARDINELLI, P.; SCAPOLO, P.A. Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. **Biol. Reprod**, v. 65, p. 1014–1019, 200.

MATTOS, S., ROSA, A. N. Desempenho reprodutivo de fêmeas de raças zebuínas. *Inf. Agropec.*, v. 10, p. 29 – 33, 1984.

MERRITT, C. R. B. Física do Ultra-som. In: RUMACK, C. M.; WILSON, S. R.; CHARBONEAU, J. W. **Tratado de ultra-sonografia diagnóstica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2 ed., 1998. p. 3-29.

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; WIJAYAGUNAWARDANE, M.P.; WATANABE, S.; HAYASHI, M.; YAMAMOTO, D.; MATSUI, M.; ACOSTA, T.J. Blood flow: a key

regulatory component of corpus luteum function in the cow. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 329–339, 2005.

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

MILVAE, R.A.; HANSEL, W. Prostacyclin, prostaglandin F2 alpha and progesterone production by bovine luteal cells during the estrous cycle. **Biol Reprod**, v.29, p.1063-1068, 1983.

MONTANHOLI, Y. R., BARCELLOS, J. O. J., BORGES, J. B., COSTA, E. C., WUNSH, C., PRATES, E. R. Ganho de peso na recria e desempenho reprodutivo de novilhas acasaladas com sobreano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 1253 – 1259, 2004.

MORAN, C.; QUIRK, J.; ROCHE, J.F. Puberty in heifers: a review. **Animal Reproduction Science**, v.18, p.167-182, 1989.

MOURA, M. T.; MARQUES, M. O.; FRARE, J.; MADUREIRA, E. H.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Sincronização da ovulação com CRESTAR e CIDR para inovulação de embriões bovinos em tempo fixo. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal, 4, 2001, Córdoba. Anais... p. 269, 2001.

MONTEIRO, F.M.; MELO, D.S.; FERREIRA, M.M.G.; CARVALHO, L.M.; SARTORELI, E.S.; EDERHARDT, B.G.; NOGUEIRA, G.P.; BARROS, C.M. LH surge in Nelore cows (*Bos indicus*), after induced estrus or after ovarian superstimulation. **Animal Reproduction Science**, v.110, p.128-138, 2009.

MURDOCH, W.; PETERSON, T.; VAN KIRK, E.; VINCENT, D.; INSKEEP, E. Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. **Biol. Reprod**, v. 35, p. 1187–1194, 1986.

NELSON, T. R.; PRETORIUS, D. H. The Doppler signal: where does it come and what does it mean? **American Journal of Roentgenology**, v. 151, p. 439-447, 1988.

NYLAND, T. G.; MATTOON, J. S. Ultra-som diagnóstico em pequenos animais. **São Paulo, SP: Roca**, p. 276-278, 2005.

NOGUEIRA, G. P. Puberty in South América *Bos indicus* (Zebu) cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 82 – 83, p. 361 – 372, 2004.

NOVELLAS, R.; ESPADA, Y.; GOPEGUI, R. R. Doppler ultrasonographic estimation of renal and ocular resistive and pulsability indices in normal dogs and cats. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 48, p. 69-73, 2007.

NUNEZ-DOMINGUEZ, R.; CUNDIFF, L. V.; DICKERSON, G. E.; GREGORY, K. E.; KOCH, R. M. Lifetime production of beef heifers calving first at two vs three years of age. **Journal of animal science**, v. 69, p. 3467-3479, 1991.

O'ROURKE, M.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M.; ROCHE, J. F. The effect of dose and route of oestradiol benzoate administration on plasma concentrations of oestradiol and FSH in long-term ovariectomised heifers. **Animal reproduction science**, v.59, p. 1-12, 2000.

PAREJA, O. S.; URBANETZ, A. A.; URBANETZ, L. A. M. L.; CARVALHO, N. S.;PIAZZA, M. J. Características ecográficas do corpo lúteo em gestações iniciais: morfologia e vascularização. **Rev Bras Ginecol Obstet.**, v. 32, p. 549-55, 2010.

PATTERSON, D.J.; WOOD, S.L.; RANDLE, R.F. Procedures that support reproductive management of replacement beef heifers. **Proceedings of the American Society of Animal Science**, 1999.

PEREIRA, E.; ELER, J. P.; FERRAZ, J. B. S. Análise genética de algumas características reprodutivas na raça Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, p. 703 – 708, 2002.

PERES, R. F. G.; CARDOSO, B. L.; PEREZ, G. C.; SÁ FILHO, O. G.; VASCONCELOS, J. L. M. Fatores que interferem na fertilidade de novilhas nelore m submetidas a protocolos de sincronização de cio. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, XXI, 2007, Salvador. Anais... Salvador: Acta Scientiae Veterinariae, p. 949, 2007.

PEREIRA, E.; ELER, J. P.; FERRAZ, J. B. S. Análise genética de algumas características reprodutivas e suas relações com o desempenho ponderal na raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 720 – 727, 2001.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Reliability of diagnostic ultrasonography for identification and measurement of follicles and detecting the corpus luteum in heifers. **Theriogenology**, v. 28, p. 929-936, 1987.

PINEDA, M. H.; DOOLEY, M. P. Female reproductive system. **McDonald's veterinary endocrinology and reproduction**, p. 283-340, 2003.

PINTO, J. M. **eCG e densidade vascular em úteros bovinos**. 17f.Dissertação (Mestrado) -Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PRICE, C. A.; CARRIERE, P. D.; GOSSELIN, N.; KOHRAM, H.; GUILBAULT, L. A. Effects of superovulation on endogenous LH secretion in cattle, and consequences for embryo production. **Theriogenology**, v. 51, p. 37-46, 1999.

QUEIROZ, Fernanda Barbosa de. Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de fármacos e perturbadores endócrinos em amostras de esgoto utilizando extração em fase sólida e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. 2011. 132 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, 2011.

QUINTANS, G.; STRAUMANN, J. M.; AYALA, W.; VASQUEZ, A. I. Effect of winter management on the onset of puberty in beef heifers under grazing conditions. 15th International Congress Animal Reproduction, 2004.

RAINE-FENNING, N.J.; CAMPBELL, B.K.; KENDALL, N.R.; CLEWES, J.S.; JOHNSON, I.R. Quantifying the changes in endometrial vascularity throughout the normal menstrual cycle with three dimensional power Doppler angiography. **Human Reproduction**, vol.19, p. 330-338, 2004.

RELAVE, F.; LEFEBVRE, R. C.; BEAUDOIN, S.; PRICE, C. Accuracy of a rapid enzyme-linked immunosorbent assay to measure progesterone in mares. The Canadian Veterinary Journal, v. 48, p. 823, 2007.

RESTLE, J.; POLLI, V. A.; DE SENNA, D. B. Efeito de grupo genético e heterose sobre a idade e peso à puberdade e sobre o desempenho reprodutivo de novilhas de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 701 – 707, 1999.

RIESEN, S.; SCHIMID, V.; GASCHEN, L.; BUSATO, A.; LANG, J. Doppler measurement of splanchnic blood flow during digestion in unsedated normal dogs. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 43, p. 554-560, 2002.

RIBADU, A.Y.; WARD, W.R.; DOBSON, H. Comparative evaluation of ovarian structures in cattle by palpation per rectum, ultrasonography and plasma progesterone concentration. **Veterinary Record**, v. 135, p. 452-457, 1994.

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

ROMAN-PONCE, H.; CATON, D.; THATCHER, W.W ; LEHRER, R. Uterine blood flow in relation to endogenous hormones during estrous cycle and early pregnancy. **American Journal of Physiology**, v. 245, p. 843-849, 1983.

ROSENKRANS, K. S.; HARDIN, D. K. Repeatability and accuracy of reproductive tract scoring to determine pubertal status in beef heifers. **Theriogenology**, v.595, p. 1087-1092, 2003.

SÁ FILHO, M.F.; SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A. ; GIROTTI, R.W.; CAVALHEIRO, I.; BARUSELLI, P.S. Effect of different ovulation inductors on pregnancy rates of Nelore (*Bos indicus*) heifers synchronized to fixed-time artificial insemination. ISABR -International Symposium on Animal Biology of Reproduction, 2008.

SÁ FILHO, M. F.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; PENTEADO, L.; GIMENES, L. U.; FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; BARUSELLI, P. S. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal reproduction science**, v. 118, p. 182-187, 2010.

SÁ FILHO, M. F. D.; MARQUES, M. O.; GIMENES, L. U.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; BATISTA, E. D. O. S.; CARVALHO, J. P. B.; BARUSELLI, P. S. Prostaglandin treatment at the onset of norgestomet and estradiol-based synchronization protocols did not alter the ovarian follicular dynamics or pregnancy per timed artificial insemination in cyclic *Bos indicus* heifers. **Animal reproduction science**, v. 144, p. 1-5, 2014.

SAGSÖZ, B.G.; SARUHAN, H. The expression of vascular endothelial growth factor and its receptors (flt1/fms, flk1/KDR, flt4) and vascular endothelial growth inhibitor in the bovine uterus during the sexual cycle and their correlation with serum sex steroids H. **Theriogenology**, v.75, p. 1720–1734, 2011.

SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A.; DIAS, L.M.K.; TEIXEIRA, A.A.; CARDOSO, G.G.C.; GRANDINETTI, R.R.; OLIVEIRA, V.G.; COMBI, I.M; BARUSELLI, P.A. Evaluation of different protocols to induce cyclicity in prepubertal beef heifers. IN: International Symposium on Animal Biology of Reproduction, 2, 2008, Anais...São Paulo, ISABR, p.234, 2008.

SCHILLO; K. K.; HALL, B. J.; HILEMAN, S. M. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. **Journal of Animal Science**, v.70, p.1271-1282, 1992.

SEMMELMANN, C. E. N.; LOBATO, J. F. P.; ROCHA, M. G. Efeito de sistemas de alimentação no ganho de peso e desempenho reprodutivo de novilhas Nelore acasaladas aos 17/18 meses. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 835 – 843, 2001.

SHORT, R. Y.; STAIMILLER, R. B.; BELLOWES, R. L. et al. Breeding heifers at one year of age: biological and economic considerations. In: FIELDS, M.J.; SAND, R.S. (Eds.) Factors affecting calf crop. London: CRC Press, p.55 – 68, 1994.

SCHURZ, B; SCHÖN, H.J; WENZL, R; EPPEL, W; HUBER, J; REINOLD, E. Endovaginal Doppler flow measurements of the ovarian artery in patients with a normal menstrual cycle and with polycystic ovary during in vitro fertilization. **J Clin Ultrasound**, v. 21, p. 19-24, 1993.

SEMMELMANN, C. E. N.; LOBATO, J. F. P.; ROCHA, M. G. Efeito de sistemas de alimentação no ganho de peso e desempenho reprodutivo de novilhas Nelore acasaladas aos 17/18 meses. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 835–843, 2001.

SILVA, L. A.; GASTAL, E. L.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. **Biology of Reproduction**, v. 72, p. 755-761, 2005.

SILVA, L.A. Ultrassonografia Doppler na reprodução equina: presente e futuro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária + Equina**, v.29, p.66-77, 2010.

SILVA, L. A.; GINTHER, O. J. Local effect of the conceptus on uterine vascular perfusion during early pregnancy in heifers. **Reproduction**, v. 139, p. 453-463, 2010.

SOUZA, E. M.; MILAGRES, J. C.; SILVA, M. A., REGAZZI, A. J.; CASTRO, A. G. C. Influências genéticas e de meio ambiente sobre a idade ao primeiro parto em rebanhos de Gir leiteiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 24, p. 926– 935, 1995.

SPRAGUE, B.J.; PHERNETTON, T.M.; MAGNESS, R.R.; CHESLER, N.C. The effects of the ovarian cycle and pregnancy on uterine vascular impedance and uterine artery mechanics. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 144, p.170–S178, 2009.

STEER, C.V.; CAMPBELL, S.; TAN, S.L.; CRAYFORD, T.; MILLS, C.; MASON, B.A.; COLLINS, W.P. The use of transvaginal color flow imaging after in vitro fertilization to identify optimum uterine conditions before embryo transfer. **Fertil Steril**, v. 57, p. 373-376, 1992.

SZATMÁRI, V.; SÓTONYI, P.; VÖRÖS, K. Normal duplex Doppler waveforms of major abdominal blood vessels in dogs: a review. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 42, p. 93-107, 2001.

TANAKA, Y.; VINCENT, D. L.; LEDGERWOOD, K. S.; WEEMS, C. W. Variable progesterone response and estradiol secretion in prepubertal beef heifers following treatment with norgestomet implants. **Theriogenology**, v. 43, n. 6, p. 1077-1086, 1995.

TIBARY, A.; BOUKHLIQ, R.; LAHLOU-KASSI, A.; HADDADA, B.; NAKRO, M. Reproductive patterns of Santa Gertrudis heifers in Morocco: II. Fertility of cyclic and acyclic heifers after synchronization of estrus. **Theriogenology**, v. 7, n. 2, p. 389-393, 1992.

TRAN, T. Q.; WARNICK, A. C.; HAMMOND, M. E.; KOGER, M. Reproduction in Brahman cows calving for the first time at two or three years of age. **Theriogenology**, v. 29, p. 751 – 756, 1988.

VASCONCELOS, J. L. M.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H. N.; GUENTHER, J. N.; WILTBANK, M. C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rates. **Theriogenology**, v. 56, p. 307 - 314, 2001.

VASCONCELOS, J.L.M.; SANTOS, R.M. Aplicações práticas da ultrasonografia no manejo reprodutivo de rebanho leiteiro. **Milkpoint**, São Paulo, 17 de jan 2006.

VIANA, J. H. M.; ARASHIRO, E. K. N.; SIQUEIRA, L. G. B.; GHETTI, A. M.; AREAS, V. S.; GUIMARÃES, C. R. B.; FERNANDES, C. A. C. (2013). Doppler ultrasonography as a tool for ovarian management. **Animal Reproduction**, v. 10, p. 215-222. 2013.

VYNCKIER, L.; DEBACKERE, M.; KRUIF, A. D.; CORYN, M. Plasma estradiol-17 β concentrations in the cow during induced estrus and after injection of estradiol-17 β benzoate and estradiol-17 β cypionate-a preliminary study. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v.13,n. 1, p. 36-42, 1990.

VOISINET, B.D.; GRANDIN, T.; TATUM, JD.; O'CONNOR, S.F.; STRUTHERS, J.J. Feedlot cattle with calm temperaments have greater average daily gains than cattle with excitable temperaments. **Journal of Animal Science**, v.75, p.892-896, 1997.

WEN, L.; CHEN, L. H.; LI, H. Y.; CHANG, S. P.; LIAO, C. Y.; TSUI, K. H.; CHAO, K. C. Roles of estrogen and progesterone in endometrial hemodynamics and vascular endothelial growth factor production. **Journal of the Chinese Medical Association**, v.72, n. 4, p. 188-193, 2009.

WETTEMANN, R. P.; BOSSIS, I. Energy intake regulates ovarian function in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 1 – 10, 2000.

WILLARD, S.; LAY, D.; FRIEND, T.; NEUENDORFF, D.; RANDEL, R. Plasma progesterone response following ACTH administration during midgestation in the pregnant Brahman heifer. **Theriogenology**, v.63, p.1061–1069, 2005.

WILTBANK, M.C. Cell types and hormonal mechanisms associated with mid cycle corpus luteum function. **Journal of Animal Science**, v.72, p.1873-1883, 1994.

YELICH, J. V.; WETTERMANN, R. P., MARSTON, T. T., SPICER, L. J. Luteinizing hormone, growth hormone, insulin like growth factor-I, insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. **Dom. Anim. Endocrinol.**, v. 13, p. 325–338, 1996.

