

UFRRJ
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ZOOTECNIA

TESE

**Influência do Temperamento de Vacas Nelores Sobre a
Perfusão Vascular do Folículo e do Corpo Lúteo e Sobre a
Fertilidade, Quando Submetidas à IATF**

Yuri Barbosa Guerson
2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**INFLUÊNCIA DO TEMPERAMENTO DE VACAS NELORES
SOBRE A PERFUSÃO VASCULAR DO FOLÍCULO E DO CORPO
LÚTEO E SOBRE A FERTILIDADE, QUANDO SUBMETIDAS À IATF**

YURI BARBOSA GUERSON

Sob a Orientação do Professor
Marco Roberto Bourg de Mello

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor**, no
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, Área de Concentração em
Produção Animal.

Seropédica, RJ
Agosto de 2020

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Biblioteca Central /
Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G929i GUERSON, YURI BARBOSA, 1989-
 Influência do temperamento de vacas nelores sobre
 a perfusão vascular do folículo e do corpo lúteo e
 sobre a fertilidade, quando submetidas à IATF / YURI
 BARBOSA GUERSON. - Leopoldina, 2020.
 92 f.

 Orientador: Marco Roberto Bourg de Mello.
 Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio
 de Janeiro, Pós Graduação em Zootecnia, 2020.

 1. Folículo pré-ovulatório. 2. Estresse. 3. Color
 Doppler. 4. Fertilidade. . I. Mello, Marco Roberto
 Bourg de, 1971-, orient. II Universidade Federal
 Rural do Rio de Janeiro. Pós Graduação em Zootecnia
 III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ZOOTECNIA**

ATA Nº 2653 / 2020 - PPGZ (12.28.01.00.00.00.61)

Nº do Protocolo: 23083.049992/2020-58

Seropédica-RJ, 01 de outubro de 2020.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
YURI BARBOSA GUERSON**

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor**, no Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal.

TESE APROVADA EM 14/09/2020.

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

Banca Examinadora:

Marco Roberto Bourg de Mello, Dr. UFRRJ - (Presidente)

Vera Lúcia Teixeira de Jesus, Dr.^a UFRRJ

Julio César Ferraz Jacob, Dr. UFRRJ

Joaquim Esquerdo Ferreira, Dr. UNIFAA

Luciano Andrade Silva, Dr. USP

(Assinado digitalmente em 02/10/2020 10:41) JULIO
CESAR FERRAZ JACOB
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptRAA (12.28.01.00.00.00.64)
Matrícula: 2202309

(Assinado digitalmente em 02/10/2020 09:35)
MARCO ROBERTO BOURG DE MELLO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptRAA (12.28.01.00.00.00.64)
Matrícula: 1548043

(Assinado digitalmente em 02/10/2020 09:32) VERA
LUCIA TEIXEIRA DE JESUS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptRAA (12.28.01.00.00.00.64)

(Assinado digitalmente em 09/12/2020 11:36)
JOAQUIM ESQUERDO FERREIRA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 086.668.256-26

(Assinado digitalmente em 02/10/2020 08:28)
LUCIANO ANDRADE SILVA
ASSINANTE EXTERNO CPF: 975.549.106-63

Para verificar a autenticidade deste documento entre em
<https://sipac.ufrjr.br/public/documentos/index.jsp> informando seu
número: **2653**, ano: **2020**, tipo: **ATA**, data de emissão: **01/10/2020** e o código
de verificação: **cf65d37856**

Aos meus pais por todo amor e dedicação na minha educação e formação pessoal e à minha companheira de todas as horas Aline e ao nosso filho Antônio

Dedico

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Deus e a Nossa Senhora pela graça de viver e as bênçãos concedidas a mim e à minha família. Agradecer aos meus pais Evandro e Mabel, por todo amor, esforço e apoio na minha vida. A minha esposa Aline por todo amor e paciência e por me presentear com uma nova vida, que já me inspira a ser uma pessoa melhor, por ti também agradeço Antônio. Aos meus padrinhos Marta e Clóvis, e meu querido avô Mauro por serem segundos pais.

Ao Prof. Dr. Júlio e a Paula por serem tão importantes nessa etapa, me acolher como parte da família, me incentivar sempre e me ajudarem na formação profissional e pessoal.

Agradeço ao Prof. Dr. Marco por todos ensinamentos, pela paciência e a dedicação na minha formação.

Agradeço a todos os amigos e familiares que fazem a vida mais feliz.

À Rural, e a todos profissionais envolvidos no propósito de ajudar a formar pessoas: Zico, Zezinho, Reneu, Profa. Dra. Vera, Prof. Três, vocês são fundamentais.

A todos os amigos de Graduação e Pós-graduação que tive a oportunidade de conviver e aprender no Setor de Reprodução.

A todos os envolvidos direta e indiretamente, os colaboradores: Sr. Ademar, Kleber, Henrique e aos animais.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO GERAL

GUERSON, Yuri Barbosa. **Influência do temperamento de vacas Nelores sobre a perfusão vascular do folículo e do corpo lúteo e sobre a fertilidade, quando submetidas à IATF.** 2020. 80p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2020.

O presente estudo foi dividido em dois capítulos sendo que no primeiro objetivou-se avaliar a influência do temperamento sobre a perfusão vascular do folículo pré-ovulatório (FPO) e do corpo lúteo (CL) assim como sobre a produção de progesterona (P4) e sobre a taxa de concepção de vacas Nelores submetidas à IATF. Já no segundo capítulo, o objetivo foi estudar as relações entre o diâmetro do FPO e do CL com a quantidade e intensidade do fluxo sanguíneo nestas estruturas, produção de P4 e a fertilidade de vacas Nelores submetidas à IATF. No primeiro experimento, 201 fêmeas foram submetidas à sincronização da ovulação e, no momento da IA, foram determinados o escore de brete e velocidade de saída deste para avaliação do temperamento. De acordo com os escores individuais, os animais foram classificados em temperamento adequado (ADQ) ou excitável (EXC). Amostras de sangue foram coletadas para dosagem de cortisol e progesterona. As avaliações ultrassonográficas por Doppler colorido foram realizadas para determinar o diâmetro, volume e a vascularização do FPO e do CL no momento da IA (D0) e sete dias (D7) após, respectivamente. As taxas de sincronização, ovulação e de concepção foram comparadas entre os grupos ADQ e EXC. As variáveis número de pixels do FPO no momento da IA ($p=0,01$), intensidade dos pixels na parede do folículo ($p=0,01$), diâmetro ($p=0,02$) e volume ($p=0,01$) do folículo pré-ovulatório no momento da IA foram todas menores para o grupo de vacas do grupo EXC, enquanto as concentrações de cortisol foram maiores no grupo de vacas excitáveis, o que foi relacionado ao estresse durante o manejo da IATF. O número e a intensidade dos pixels do CL não apresentaram diferença entre os grupos, enquanto o diâmetro e volume também foram menores ($p=0,01$) para o grupo EXC. Não foi observada diferença entre os grupos para as taxas de sincronização, ovulação e de concepção assim como para a concentração de progesterona no D7. Pode-se concluir que vacas Nelores de temperamento excitável apresentam menor fluxo sanguíneo folicular e redução no tamanho do folículo e do corpo lúteo sem, no entanto, comprometer a fertilidade. No segundo experimento, foram determinados o diâmetro e o volume do FPO (D0) e CL (D7) de 201 vacas submetidas a IATF, assim como a quantidade e intensidade de pixels coloridos presente nelas. Adicionalmente, amostras de sangue também foram coletadas no D7 para dosagem de P4. Para análise dos dados, as vacas foram divididas em vazias e gestantes e também de acordo com o diâmetro do FPO: vacas de folículo pequeno, com diâmetro $< 11\text{mm}$ (FP; $n= 35$); vacas de folículo médio, com diâmetro entre 11 e 14mm (FM; $n=84$) e vacas de folículo grande, com diâmetro $> 14\text{mm}$ (FG; $n= 70$). As variáveis ultrassonográficas do FPO e do CL, bem como a concentração de P4 foram comparadas entre os grupos FP, FM e FG e entre fêmeas vazias e gestantes. Foram encontradas diferenças entre os grupos FP, FM e FG para diâmetro e volume do FPO e do CL, demonstrando que folículos maiores também originam corpos lúteos maiores. O grupo FG apresentou maior quantidade e intensidade de pixels no FPO em relação ao FP. A intensidade de fluxo no CL e a concentração de P4 também foram maiores no FG. O grupo FP apresentou menor intensidade de fluxo e taxa de ovulação em relação aos demais, embora a taxa de concepção tenha sido semelhante para todos. Foram encontradas correlações fracas entre o tamanho do FPO e do CL assim como entre o diâmetro

e volume do CL com sua quantidade pixels e concentração de P4. Além de correlação moderada entre o diâmetro e sua intensidade de pixels. Não houve diferença entre fêmeas vazias e gestantes para todas as variáveis analisadas. Os resultados confirmam a presença de relações entre o tamanho das estruturas ovarianas e a quantidade e intensidade de fluxo destas, bem como a sua capacidade de produzir progesterona. A intensidade dos pixels do FPO mostrou-se relevante, demonstrando correlações com o tamanho e o fluxo do CL, que não foram encontradas avaliando somente a quantidade de pixel, revelando a importância de avaliar características complementares do fluxo.

Palavras chave: estresse, folículo pré-ovulatório, color Doppler, progesterona, fertilidade.

GENERAL ABSTRACT

GUERSON, Yuri Barbosa. **Influence of the temperament of Nellore cows on the follicle and corpus luteum vascular perfusion and on fertility, when submitted to TAI.** 2020. 80p. Thesis (Doctorate in Animal Science). Instituto de Zootecnia, Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2020.

The present study was divided into two chapters, the first aimed to evaluate the influence of temperament on the vascular perfusion of the preovulatory follicle (POF) and the corpus luteum (CL) as well as on progesterone (P4) production and conception rate of Nellore cows submitted to TAI. In the second chapter, the objective was to study the relationship between the diameter of the POF and CL with the quantity and intensity of blood flow, P4 production and the fertility of Nellore cows submitted to TAI. In the first experiment, 201 cows were subjected to synchronization of ovulation and, at the time of AI. In the first experiment, 201 females were subjected to synchronization of ovulation and, at the time of AI, the chute score and exit speed were determined to assess temperament. According to the individual scores, the animals were classified in adequate (ADQ) or excitable (EXC) temperament. Blood samples were also collected to measure cortisol and P4. Color Doppler ultrasound evaluations were performed to determine the diameter, volume, and vascularization of POF and CL at the time of AI (D0) and seven days (D7) later, respectively. The synchronization, ovulation and conception rates were compared between the ADQ and EXC groups. The variables number of POF pixels at the time of AI ($p = 0.01$), pixel intensity on the follicle wall ($p = 0.01$), diameter ($p = 0.02$) and volume ($p = 0.01$) of the POF at the time of AI were all lower for the group of cows in the EXC group, while cortisol concentrations were higher in the group of excitable cows, which was related to stress during the management of IATF. The number and intensity of the pixels of the CL showed no difference between the groups, while the diameter and volume were also lower ($p = 0.01$) for the EXC group. There was no difference between groups for synchronization, ovulation, and conception rates as well as for P4 concentration on D7. It can be concluded that Nellore females of excitable temperament have less follicular blood flow and reduction in the size of the follicle and corpus luteum without, however, compromising fertility. In the second experiment, the diameter and volume of the POF (D0) and CL (D7) of 201 cows subjected to TAI were determined, as well as the amount and intensity of colored pixels present in them. In addition, blood samples were also collected on D7 for P4 measurement. For data analysis, the females were divided into nonpregnant and pregnant and also according to the diameter of the POF: females of small follicle, with diameter $<11\text{mm}$ (SF; $n = 35$); females of medium follicle, with diameter between 11 and 14mm (MF; $n = 84$) and females of large follicle, with diameter $\geq 14\text{mm}$ (LF; $n = 70$). The ultrasound variables of POF and CL, as well as the P4 concentration were compared between the groups SF, MF and LF and between nonpregnant and pregnant cows. Differences were found between the SF, MF and LF groups for the diameter and volume of the POF and CL, demonstrating that larger follicles also originate larger luteal bodies. The LF group showed a higher amount and intensity of pixels in the POF compared to the SF. The flow intensity in the CL and the P4 concentration were also higher in the LF. The SF group had lower flow intensity and ovulation rate compared to the others, although the conception rate was similar for all. Weak correlations were found between the size of the POF and the CL as well as between the diameter and volume of the CL with its pixel count and P4 concentration. In addition to a moderate correlation between the diameter and its pixel intensity. There was no difference between nonpregnant and pregnant cows for all variables analyzed. The results

confirm the presence of relationships between the size of the ovarian structures and the quantity and intensity of their flow, as well as their ability to produce progesterone. The intensity of the POF pixels was shown to be relevant, showing correlations with the size and flow of the CL, which were not found by evaluating only the pixel quantity, revealing the importance of evaluating complementary flow characteristics.

Key words: stress, preovulatory follicle, color Doppler, progesterone, fertility

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Parâmetros relacionados ao folículo pré-ovulatório e ao corpo lúteo e concentração de cortisol e progesterona de vacas com temperamento adequado e excitável. 46
- Tabela 2.** Taxas de sincronização, de ovulação e de concepção dos animais com temperamento classificado como adequado (ADQ) e excitável (EXC). Todas variáveis foram submetidas ao teste qui-quadrado, não havendo diferença entre os grupos para estas variáveis ($p>0,05$). 50
- Tabela 3.** Médias e desvios padrões das variáveis do folículo e do corpo lúteo em três grupos divididos de acordo com o diâmetro folicular: Folículos pequenos: $<11\text{mm}$; Folículos médios $>11\text{mm}$ e $<14\text{mm}$; folículos grandes $> 14\text{mm}$. 66
- Tabela 4.** Médias e desvios padrões das variáveis do folículo e do corpo lúteo em grupos divididos entre vacas prenhes ou vazias. 67

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mudanças relativas da concentração plasmática de progesterona (P4), tamanho do corpo lúteo (LS) e fluxo sanguíneo luteínico (LBF) de 10 vacas durante o ciclo estral (% dos respectivos valores encontrados no dia 4; médias e desvios padrões). No gráfico, letras diferentes indicam diferenças significativas entre os respectivos dias ($P < 0,05$). Adaptado de Herzog et al. (2010). 13
- Figura 2.** Fluxo sanguíneo luteínico médio em vacas leiteiras nos dias 3 a 18 (estro = dia 0). O fluxo sanguíneo luteínico sofreu efeitos do grupo, do tempo e do grupo por interação com o tempo ($P < 0,05$, $P < 0,001$ e $P < 0,001$, respectivamente). Adaptado de Herzog et al. (2011) 15
- Figura 3.** Protocolo de IATF adotado. 41
- Figura 4.** Protocolo de IATF adotado 63
- Figura 5.** A) Imagem do folículo pré-ovulatório com a presença de fluxo em modo Doppler colorido, B) Imagem editada com extração das áreas de fluxo colorido da imagem, para posterior contagem de pixels. C) Imagem do corpo lúteo no d7 após a IA com presença de fluxo e uma seta amarela demonstrando a presença de fluxo sanguíneo mais intenso demonstrada pelos tons mais claros presentes no interior dos vasos sanguíneos. 64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Ciclo Estral	3
2.2 Foliculogênese	4
2.3 Luteogênese	5
2.4 Princípios da Ultrassonografia Doppler	7
2.5 Avaliação Hemodinâmica das Estruturas Ovarianas.....	8
2.5.1 Avaliação da Vascularização do Folículo	9
2.5.2 Avaliação da Vascularização do Corpo Lúteo	11
2.6 Uso da Ultrassonografia Doppler na Reprodução Bovina.....	15
2.7 Estresse e Temperamento Animal	18
2.8 Efeito do Estresse e do Temperamento na Reprodução Animal	19
2.9 Referências Bibliográficas.....	25
3. CAPÍTULO I	36
EFEITO DO TEMPERAMENTO SOBRE A PERFUSÃO VASCULAR DO FOLÍCULO DOMINANTE E DO CORPO LÚTEO E SOBRE A TAXA DE CONCEPÇÃO DE VACAS NELORES.....	36
3.1 Resumo	36
3.2 Abstract.....	37
3.3 Introdução.....	37
3.4 Material e Métodos	40
3.4.1 Local do experimento, animais e manejo	40
3.4.2 Sincronização da ovulação e IATF.....	41
3.4.3 Avaliação ultrassonográfica do folículo e do corpo lúteo	41
3.4.4 Avaliação do temperamento	42
3.4.5 Dosagem de cortisol sérico.....	43
3.4.6 Dosagem de progesterona sérica	43
3.4.7 Diagnóstico de gestação	44
3.4.8 Análise estatística	44
3.5 Resultados e Discussão.....	45
3.6 Conclusões.....	51
3.7 Referências Bibliográficas.....	53
4. CAPÍTULO II.....	59
RELAÇÃO DO DIÂMETRO DO FOLÍCULO E DO CORPO LÚTEO COM PERFUSÃO VASCULAR, PRODUÇÃO DE PROGESTERONA E CONCEPÇÃO DE FÊMEAS NELORES.	59
4.1 Resumo	59
4.2 Abstract.....	60
4.3 Introdução.....	61
4.4 Material e Métodos	62
4.4.1 Local do experimento, animais e manejo	62

4.4.2 Sincronização da ovulação e IATF.....	63
4.4.3 Avaliação ultrassonográfica do folículo pré-ovulatório e do corpo lúteo	63
4.4.4 Dosagem de progesterona sérica	65
4.4.5 Diagnóstico de gestação	65
4.4.6 Análise estatística	65
4.5 Resultados e Discussão.....	66
4.6 Conclusões.....	73
4.7 Referências Bibliográficas.....	74
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77

1. INTRODUÇÃO GERAL

A crescente demanda por proteína animal para alimentação humana e a disponibilidade limitada de terras e recursos naturais para produção, exige um contínuo aprimoramento da eficiência produtiva. A constante necessidade de aprimoramento das biotécnicas já existentes e o surgimento de novas técnicas auxiliares tem possibilitado o desenvolvimento de estudos cada vez mais específicos e o conhecimento aprofundado da fisiologia reprodutiva para aumentar os índices reprodutivos e produtivos.

Apesar de todo avanço tecnológico e busca para aumentar a produtividade, ainda se demonstra discreta preocupação em melhorar as condições de manejo e ambiente dos animais, não se atentando para o impacto destas nos problemas produtivos e reprodutivos, e significativa participação nos custos de produção.

A Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) é uma biotécnica consagrada que permite a sincronização da ovulação das fêmeas de um rebanho, facilitando o manejo e permitindo que um maior número de animais seja inseminado ao mesmo tempo, sem a necessidade de observação do cio. O estresse dos animais durante os manejos para sincronização e inseminação é um fator relevante que interfere diretamente nos resultados das biotécnicas, e requer estudos aprofundados para sua melhor compreensão.

O manejo durante o processo de sincronização e inseminação é um fator estressante, principalmente para os animais que apresentam temperamento excitável, como os de raças zebuínas, predominantes em nosso país. Tal situação apresenta repercussões comportamentais e fisiológicas, como o aumento de cortisol. As concentrações elevadas de cortisol durante as situações de estresse têm interferência direta no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, promovendo feedback negativo com as gonadotrofinas e reduzindo a eficiência dos protocolos de sincronização, com redução das taxas de ovulação e de concepção.

O nível de aprimoramento atual e a maior disponibilidade de recursos tecnológicos tem contribuído para aumentar cada vez mais a eficiência, tornando fundamental a máxima exploração desses recursos. A utilização da ultrassonografia modo B na reprodução animal permitiu evidentes avanços e atualmente o modo Doppler traz novas perspectivas na exploração desse vasto campo de estudo. Tal ferramenta pode auxiliar no entendimento das complexas manifestações fisiológicas que o estresse pode promover na reprodução animal.

A ultrassonografia Doppler permite, de forma pouco invasiva, aprofundar o estudo da vascularização e conseqüentemente da funcionalidade de tecidos e órgãos reprodutivos. É uma ferramenta de uso potencial na prática para o manejo reprodutivo e no desenvolvimento de novas pesquisas que fomentem os conhecimentos já existentes (PUGLIESI et al., 2017).

O comportamento do animal durante a situação de estresse e suas repostas fisiológicas são muito complexas e apresentam uma série de repercussões em vários órgãos ou sistemas. Muitos estudos contemplam o efeito endócrino do cortisol nos hormônios da reprodução, a maioria focada nas situações de estresse térmico, porém nenhum avaliou os efeitos fisiológicos do estresse de manejo na vascularização e na funcionalidade das estruturas ovarianas (folículo e corpo lúteo). O estudo ultrassonográfico com o Doppler pode ajudar a explicar porque animais reativos apresentam menor desempenho reprodutivo, além de permitir o melhor entendimento dos efeitos do estresse na qualidade do folículo e corpo lúteo formado.

São fundamentais pesquisas que contemplem a melhora na eficiência reprodutiva visto que essa reflete diretamente na produção, no desempenho econômico do rebanho e na capacidade de suprir as demandas de consumo da população. Além disso, o fato do estresse ser prejudicial a uma função tão importante como a reprodução enfatiza sua importância e torna imperativo o conhecimento sobre seus efeitos ou implicações na produtividade animal.

Diante do exposto, o presente estudo foi dividido em três partes, sendo a primeira uma revisão de literatura com objetivo de embasar a metodologia utilizada no experimento, abordar a importância do estudo e fomentar a discussão dos resultados dos capítulos seguintes. A segunda parte, apresentado em forma de artigo científico, é um experimento com objetivo de avaliar a relação entre o temperamento reativo (estresse), perfusão vascular e funcionalidade do folículo e do corpo lúteo de vacas Nelores submetidas à IATF. A terceira e última parte, também em forma de artigo, é um experimento com objetivo de avaliar a relação entre o diâmetro do folículo pré-ovulatório e do corpo lúteo com a perfusão vascular, produção de progesterona, ovulação e com a concepção de vacas Nelores submetidas à IATF.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ciclo Estral

Após a puberdade, a fêmea bovina entra em um período de ciclicidade que continua ao longo de toda sua vida reprodutiva. Esses ciclos de atividade ovariana são denominados ciclos estrais e consistem em uma série de eventos que começam em um estro e terminam no estro subsequente. Esses ciclos são marcados por mudanças dinâmicas nas estruturas do ovário, especificamente o crescimento e regressão dos folículos e do corpo lúteo (CL), ocorrendo aproximadamente a cada três semanas em uma vaca não gestante (SARTORI et al., 2017). Portanto, o ovário apresenta ciclos caracterizados por padrões repetidos de proliferação, diferenciação e transformação celular, acompanhados por desenvolvimento folicular, formação e regressão do corpo lúteo (SCHAMS; BERISHA, 2004).

Ocorrem várias mudanças transitórias nas concentrações hormonais durante o ciclo estral, tais mudanças regulam a reprodução e o comportamento reprodutivo dos animais e auxiliam na comunicação entre os tecidos específicos durante as diferentes fases do ciclo estral. Essa comunicação ocorre por mecanismos de *feedback* e envolvem alterações morfológicas e funcionais nas estruturas ovarianas (folículos e corpo lúteo) e na genitália tubular (oviduto, cornos uterinos, cérvix e vagina). Tais mudanças são divididas em quatro fases: 1) estro caracterizado pelo período de receptividade ao macho; 2) metaestro que é o período de interrupção do estro e início do desenvolvimento do corpo lúteo; 3) diestro, período de completa funcionalidade do corpo lúteo maduro e 4) proestro, período entre a regressão do CL e início do estro (RATHBONE et al., 2001).

Em bovinos, o ciclo estral começa, quando o animal aceita a monta permanecendo parado, este é o dia do estro designado como o dia 0 do ciclo. Neste momento, as concentrações de estradiol estão altas, devido à sua produção pelo folículo pré-ovulatório. Esse estradiol alto é responsável pela manifestação dos comportamentos sexuais típicos do estro, além de provocar o aumento do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) no hipotálamo que por sua vez induz o aumento do hormônio luteinizante (LH) produzido pela hipófise. Após o pico de LH, as concentrações de estradiol começam a diminuir e o animal ovula 24 a 32 horas após o início do estro (SARTORI et al., 2017). Fêmeas *Bos taurus indicus*

apresentam características de temperamento que tornam a detecção do estro uma difícil tarefa (BÓ et al., 2007), apresentando estros mais curtos, com duração média de 10 horas (GALINA; ARTHUR, 1990). Além de apresentarem maiores tentativas de monta durante a noite (PINHEIRO et al., 1998). As fêmeas *Bos taurus indicus* apresentam duas, três ou quatro ondas de crescimento folicular por ciclo estral, além de apresentarem folículos dominantes menores assim como corpos lúteos (BÓ et al., 2003).

A ovulação ocorre como resultado de uma interação dinâmica entre o aumento do LH e fatores foliculares locais, incluindo esteroides, prostaglandinas (PGs) e peptídeos de maneira dependente do tempo. O pico de LH desencadeia uma cascata bioquímica que leva à ruptura do folículo de Graaf, resultando na expulsão do oócito e consequente desenvolvimento do corpo lúteo (ACOSTA et al., 2000).

2.2 Foliculogênese

A foliculogênese é um processo sequencial de desenvolvimento folicular, altamente regulado e que resulta no crescimento e diferenciação do oócito e das células somáticas associadas (RAJKOVIC et al., 2006). Essa começa a partir da ativação dos folículos primordiais que se desenvolvem até o tamanho de folículo pré-ovulatório (GOUGEON, 1996).

Os folículos apresentam padrões de crescimento em ondas intimamente associadas com mudanças nas gonadotrofinas circulantes (FSH e LH), além disso, existem fatores de crescimento locais associados que trabalham em conjunto com essas variações hormonais (WEBB; ARMSTRONG, 1998). As ondas foliculares são precedidas pelo aumento na concentração de hormônio folículo estimulante (FSH), produzido pela hipófise (ADAMS et al. 1992).

O início da onda de crescimento folicular ovariano em bovinos envolve o desenvolvimento síncrono de um grupo de pequenos folículos antrais - um deles se tornará o folículo dominante e continuará crescendo enquanto os vários subordinados sofrerem atresia (SIROIS; FORTUNE, 1988, GINTHER et al., 1989).

Sob condições naturais, em bovinos, apenas o folículo dominante da onda presente no momento da regressão lútea ovula. Normalmente, ocorrem duas ou três ondas sucessivas de desenvolvimento folicular ao longo do ciclo estral (FORTUNE et al., 2004, GINTHER,

2019). Porém, pode ocorrer de uma a três e até quatro ondas em fêmeas *Bos taurus indicus* (BÓ et al., 2003). A primeira onda folicular inicia logo após a ovulação do folículo dominante, no dia 0 do ciclo (MAPLETOFT et al., 2009).

O folículo que irá ovular deve passar antes por algumas etapas, primeiro ele cresce em grupos quando expostos a estimulação gonadotrófica suficiente (FSH), o que é denominado recrutamento, em seguida um dos folículos em crescimento é escolhido entre os demais para continuar a maturação com o destino final de ovular, processo denominado de seleção (DIZEREG; HODGEN, 1981). Uma vez selecionado, o folículo dominante (FD) é capaz de continuar crescendo e os folículos menores decrescem (GINTHER, 2019), em um processo conhecido como desvio ou divergência folicular (GINTHER, 2016). O conceito de dominância é demonstrado pois o crescimento dos demais folículos recrutados na mesma onda e os de uma nova onda são suprimidos até a regressão ou ovulação do folículo dominante que também apresenta o maior diâmetro (WEBB; ARMSTRONG, 1998).

Doze horas antes do processo de desvio este FD adquire receptores de LH e de estradiol nas células da granulosa que o tornam capaz de responder ao estímulo de ambos FSH e LH (IRELAND; ROCHE, 1983; GINTHER et al., 2017), além disso fatores produzidos no ovário podem amplificar, atenuar ou mediar os efeitos das gonadotrofinas circulatórias na função das células da granulosa e da teca pelo controle do suprimento sanguíneo para o folículo, que tem seu desenvolvimento regulado por um complexo arranjo de fatores extra ovariano e sinais endógenos (WEBB; ARMSTRONG, 1998).

2.3 Luteogênese

O corpo lúteo é uma glândula reprodutiva transitória, responsável pela produção de progesterona e manutenção da gestação, sua formação é iniciada por uma série de mudanças morfológicas e bioquímicas nas células da teca interna e da granulosa do folículo pré-ovulatório (SCHAMS; BERISHA, 2004).

Após a ovulação, o folículo rompido apresenta coágulos de sangue e um pouco de tecido luteal, sendo essa estrutura denominada corpo hemorrágico até o quarto ou quinto dia do ciclo, enquanto cresce, se reorganiza rapidamente e começa a produzir progesterona, tornando-se um corpo lúteo maduro e funcional (RAWLINGS; BARTLEWSKI, 2007). Uma vez maduro, o CL torna-se responsivo a PGF2 α e sofre regressão lútea (MYAMOTO et al.,

2005). A prostaglandina $PGF2\alpha$ é liberada pelo endométrio no final do ciclo estral quando não ocorre a gestação (GINTHER, 2007).

O crescimento e organização ocorrem sobre a influência de vários fatores angiogênicos e mitogênicos (SCHAMS; BERISHA, 2004), como o fator de crescimento dos fibroblastos (REYNOLDS; REDMER, 1998), fator de crescimento I semelhante à insulina (SUH et al., 1992), fator de crescimento semelhante à heparina (GRAZUL-BILSKA et al., 1992) e fator de crescimento endotelial vascular (REDMER; REYNOLDS, 1996).

Além de todos fatores supracitados, as gonadotrofinas também são importantes, e a capacidade de síntese de progesterona pelo CL será determinada pelas organelas, substratos e enzimas presentes nas células luteínicas esteroidogênicas (SALLES; ARAÚJO, 2010). Bem como do adequado suprimento sanguíneo, para aporte de precursores esteroides e liberação de progesterona na circulação (FERREIRA-DIAS et al., 2006).

O corpo lúteo é um tecido heterogêneo, formado por células presentes na parede do folículo, que começam a se luteinizar antes mesmo da ovulação (STOUFFER, 2006) sob o efeito de gonadotrofinas, mais particularmente o LH (SALLES; ARAÚJO, 2010). A concentração mais elevada de LH no plasma atua para transformar as células da granulosa e as células da teca interna em células luteais grandes e pequenas, respectivamente (ALILA; HANSEL, 1984, HANSEL; BLAIR, 1996). Durante a luteogênese, as células luteais pequenas se dividem, enquanto as células luteais grandes aumentam de tamanho (RAWLINGS; BARTLEWSKI, 2007). As células endoteliais e pericitos também compõem mais da metade do tecido lúteo (O'SHEA et al., 1989), além de células do sistema imune (WALUSIMBI; PATE, 2014).

2.4 Princípios da Ultrassonografia Doppler

O transdutor é formado por cristais piezoelétricos que, ao receberem cargas elétricas de alternadas polaridades, sofrem expansões e contrações que emitem ondas de compressão que penetram nos tecidos. Ao enviar uma onda de expansão, os tecidos adjacentes sofrem compressão, e a descompressão causa contrações nestes. Cada cristal é submetido a uma pequena série de excitações elétricas que resulta em uma série de vibrações conhecidas como pulsos (GINTHER, 2007). Os pulsos sonoros são enviados e ecos são recebidos de volta em sequência, ao longo de cada linha de modo-B do campo, até que se forme uma imagem do segmento completo. Os ecos de retorno são demonstrados como pontos brilhantes em escala de cinza, cuja intensidade é proporcional à amplitude dos mesmos e cuja posição corresponde à profundidade que o eco se originou (NYLAND; MATTON, 2005). Os equipamentos de modo-B exibem uma imagem em tempo real da estrutura anatômica em um corte transversal, onde várias linhas de modo-B únicas formam um campo de imagem (NYLAND; MATTON, 2005).

Alguns princípios da ultrassonografia Doppler são extensões da ultrassonografia no modo B (GINTHER, 2007). As ondas ultrassônicas refletidas de uma estrutura em movimento, como as células sanguíneas, diferem na frequência comparadas as ondas emitidas, resultando em um efeito denominado Doppler. Esse efeito foi descrito por Christian Johann Doppler em uma situação na qual uma fonte de ondas (sonoras ou eletromagnéticas), em movimento em relação a um receptor, altera a frequência de onda durante este processo, aumentando a frequência na aproximação da fonte e diminuindo durante o seu distanciamento. Desta forma, temos o efeito Doppler positivo quando a frequência das ondas refletidas (ecos de retorno) é maior que a frequência das ondas emitidas no momento em que as células sanguíneas movem em direção ao transdutor. Quando essas células se afastam do transdutor, a frequência das ondas refletidas (ecos de retorno) é menor do que a das ondas emitidas e o efeito Doppler é denominado negativo (DICKY, 1997).

O deslocamento Doppler ou frequência Doppler (f_d) é definido como a diferença entre a frequência das ondas transmitidas (f_t) e a frequência dos ecos recebidos (f_r) (GINTHER & UTT, 2004) Essa variação de frequência Doppler é utilizada pelo scanner para formação dos sinais coloridos e para a computação da velocidade, por meio do registro do movimento do sangue no sistema cardiovascular, onde as hemácias em movimento dentro dos vasos, ao

encontrarem uma onda sonora, comportam-se como corpos refletoras (GINTHER, 2007). Se o sentido do fluxo sanguíneo for em direção ao transdutor, então a fd será positiva, isto é, o eco retornado terá uma frequência mais alta. Se a direção do fluxo sanguíneo for no sentido contrário ao do transdutor, então a fd será negativa (isto é, a frequência do ultrassom refletido é mais baixa do que aquela transmitida). Assim, a velocidade de aproximação do objeto será o componente vetorial do movimento paralela ao feixe sonoro, proporcional ao coseno do ângulo de aproximação (CERRI et al., 1998). A maior diferença ou sinal mais forte é obtido quando o movimento é paralelo ao feixe de ultrassom. Ao contrário, nenhum sinal é gerado quando o movimento é perpendicular ao feixe (RUBENS et al., 2006).

Quanto maior a variação Doppler, maior a velocidade da estrutura em movimento, e o Doppler de fluxo colorido (Color Doppler) é capaz de codificar em cores as medidas de velocidade das células do sangue, sobrepondo essa informação em imagem bidimensional em escala de cinza, bem como os sinais de cor que variam em função das movimentações no mesmo sentido ou em sentido contrário ao transdutor e a intensidade das cores também indicam a velocidade relativa das células sanguíneas (NYLAND; MATTON,2005).

Quando se utiliza o modo espectral do aparelho Doppler (Doppler espectral), as variações de frequência são exibidas em um gráfico bidimensional em função do tempo, e uma onda Doppler criada no decurso do exame do fluxo sanguíneo arterial durante os ciclos cardíacos (BOLLWEIN et al., 2016).

O modo Power Doppler é sensível à presença e ao volume do fluxo sanguíneo e possui sensibilidade na detecção de fluxo em pequenos vasos e naqueles com fluxo muito lento, porém não exhibe as variações de frequência e as informações sobre a direção ou velocidade do fluxo avaliado. O brilho colorido está relacionado ao número de células em movimento e não à velocidade (NYLAND; MATTON, 2005).

2.5 Avaliação Hemodinâmica das Estruturas Ovarianas

As ondas foliculares representam o sistema macroscópico mais dinâmico e em constante mudança na fêmea envolvendo crescimento e regressão de pequenos folículos antrais bem vascularizados ao longo do ciclo estral. A tecnologia Doppler tem permitido o estudo dos aspectos vasculares da foliculogênese de grandes animais além de fornecer informações clínicas do status e sucesso dos folículos e seus oócitos (GINTHER, 2007).

Mudanças hemodinâmicas são envolvidas com o remodelamento cíclico do tecido ovariano, ocorrido durante o final do crescimento folicular, a ovulação e o desenvolvimento de um novo corpo lúteo (ACOSTA et al., 2002).

O Doppler colorido proporciona importantes informações sobre a função do corpo lúteo e dos folículos, permitindo caracterizar o tecido luteal e de maneira precoce, a prever luteólise e falhas gestacionais, auxiliando no diagnóstico clínico e no manejo. Porém, para ampliar sua gama de utilização ainda é necessário o desenvolvimento de procedimentos viáveis de avaliação do fluxo sanguíneo e um estabelecimento de valores de referência (VIANA et al. 2013).

2.5.1 Avaliação da Vascularização do Folículo

Estudos com objetivo de compreender o processo de seleção e ovulação do folículo dominante em uma onda folicular são desenvolvidos desde a década de 60, e podem ser considerados um dos principais mistérios da biologia reprodutiva de espécies monovulatórias (GINTHER et al. 2003).

Acosta et al. (2003) avaliaram as mudanças de fluxo sanguíneo na parede de folículos pré-ovulatórios em vacas, e observaram similaridades entre as mudanças estruturais e endócrinas em função do tempo nos animais que ovularam espontaneamente ou que foram induzidos com GnRH. Ambos os grupos ovularam entre 24 e 36 horas após o pico de LH e apresentaram desenvolvimento normal do corpo lúteo. Os folículos pré-ovulatórios foram aqueles que apresentaram melhor fluxo sanguíneo detectável contornando o antro na base do folículo, sendo que a área de fluxo média destes foi de $0,06 \pm 0,02 \text{ cm}^2$ para vacas que ovularam espontaneamente ou foram induzidas por GnRH. Nas vacas de ovulação espontânea, esta área aumentou gradativamente em paralelo com as concentrações de estradiol plasmático permanecendo alta até a ovulação, entretanto após a administração de GnRH a área de fluxo aumentou para $0,15 \pm 0,03 \text{ cm}^2$ em apenas 30 minutos, valor maior ao encontrado na ovulação espontânea ou na ovulação induzida antes do pico de LH (ACOSTA et al., 2003). Ainda segundo Acosta et al. (2003), a vascularização na parede folicular está relacionada ao aumento de estradiol e pico de LH e poderia ser usada para identificar folículos saudáveis e para prever a proximidade da ovulação. A área com sinais de fluxo limita-se a base do folículo antes do aumento do LH, e o primeiro aumento desta ocorreu 6 horas antes do início do pico de LH e foi temporariamente associada ao aumento do estradiol. Esse

aumento do fluxo pode aumentar o suprimento de gonadotrofinas, nutrientes e substratos hormonais e outros componentes sanguíneos necessários para a ovulação.

Estudos de Siddiqui et al. (2009b) revelaram que a maior perfusão vascular na parede do folículo pré-ovulatório em novilhas apresentou relação positiva com a fertilização e com o desenvolvimento embrionário *in vitro*. Em outro estudo, Siddiqui et al. (2009a) também observaram uma relação positiva entre a extensão do fluxo sanguíneo do folículo pré-ovulatório e o sucesso no estabelecimento da gestação em vacas.

O advento da ultrassonografia Doppler tem revelado uma extensa vascularização do folículo pré-ovulatório a partir de vasos do mesovário (GINTHER, 2007). Varughese et al. (2014) afirmam que o fluxo sanguíneo na parede do folículo pré-ovulatório é um ótimo indicador da qualidade funcional do folículo, mais confiável até que o diâmetro folicular. Tarso et al. (2016) também afirmaram que a perfusão vascular está intimamente relacionada ao aumento do diâmetro do folículo.

O escore de vascularização do folículo dominante foi correlacionado com o pico de LH e também essa avaliação pode prever o momento da ovulação em fêmeas sincronizadas (GINTHER, 2007; SCALIANTE JÚNIOR et al., 2016).

Pinaffi et al. (2015) observaram que folículos de maior tamanho e vascularização resultaram em CLs maiores e mais irrigados em vacas Nelores avaliadas no momento da IA e 11 dias depois, apesar de não encontrarem nenhuma relação entre fertilidade de animais submetidos a IA e as variáveis estudadas (tamanho e vascularização do folículo e do CL). Varughese et al. (2017) afirmaram que a avaliação pela ultrassonografia Doppler do fluxo sanguíneo folicular no dia da inseminação artificial e do fluxo sanguíneo luteal na gestação precoce mostrou ser ótimo preditor de fertilidade em vacas de leite. Estes autores encontraram associações entre a quantidade de fluxo sanguíneo do folículo, medida em pixels, e as possibilidades de complicações na gestação ou do animal não ficar gestante.

Ginther et al. (2017) compararam o fluxo sanguíneo e ecotextura entre o folículo dominante e os folículos subordinados antes do início do desvio de diâmetro em novilhas e observaram diferenças com uma camada anecóica e presença de sinais de fluxo sanguíneo detectados pela primeira vez em folículos com 6,0 e 6,1 mm de diâmetro, e envolveu quase todos os folículos em crescimento de 6,9 a 10mm.

2.5.2 Avaliação da Vascularização do Corpo Lúteo

Embora em bovinos a regulação da função luteal tem sido estudada há décadas, muitos mecanismos envolvidos não estão completamente entendidos. Neste complexo tecido, vários tipos de células interagem para o crescimento de novos vasos e estabelecimento de um suprimento sanguíneo funcional (SCHAMS; BERISHA, 2004).

Logo após a ovulação, o corpo lúteo desenvolve uma extensa rede de veias, artérias e vasos linfáticos que fazem desse uma das estruturas mais vascularizadas do corpo em proporção de tamanho (REYNOLDS et al., 2000). Isso o torna ainda mais interessante para o estudo com o ultrassom Doppler, visto que esses vasos desenvolvem e regridem em curto espaço de tempo (GINTHER, 2007).

Uma vez que a vascularização lútea desempenha um papel decisivo na função do corpo lúteo (CL), a investigação do fluxo sanguíneo luteal pode fornecer informações valiosas sobre a fisiologia e fisiopatologia do CL e vários estudos abordaram as alterações do fluxo sanguíneo luteal ao longo do ciclo estral, mudanças no início da gestação, em resposta a tratamentos hormonais ou em condições de resposta inflamatória sistêmica (LÜTTGENAU; BOLLWEIN, 2014).

O fluxo sanguíneo é importante na vida útil das estruturas do ovário sendo que a perfusão luteal está diretamente relacionada com sua funcionalidade, capacidade de produzir progesterona e manutenção da gestação. Por isso, a vascularização precede a síntese de progesterona (ACOSTA; MIYAMOTO, 2004). Assim como um fluxo sanguíneo adequado é essencial para liberar a progesterona para a circulação (ACOSTA et al., 2002).

A maioria das células esteroidogênicas está em contato estreito com os capilares sanguíneos (REYNOLDS et al. 1992). No início da luteólise, a queda da progesterona decorre da redução do fluxo sanguíneo no CL o que afeta a esteroidogênese e não devido à regressão das células luteais (SIQUEIRA et al., 2009). Visto que o sangue é responsável por fornecer precursores esteroides e gonadotrofinas para as células luteais (JANSON et al. 1981).

Identificar corretamente a presença de um CL e estimar seu status funcional é muito importante para o sucesso do manejo reprodutivo em bovinos, permitindo determinar quando administrar prostaglandinas e selecionar receptoras para transferência de embriões (HUSSEIN et al., 1992). A dosagem de progesterona é um teste de padrão ouro para determinar a funcionalidade do corpo lúteo (BATTOCCHIO et al., 1999), concentrações acima de 1 ng/mL

indicam a presença de corpo lúteo ativo (BICALHO et al., 2008). Tal método, além do custo elevado apresenta demora na obtenção do resultado, impedindo medidas imediatas após a avaliação por palpação (HERZOG et al., 2010).

É sugerido que a redução da capacidade do CL produzir progesterona pode ser devida à diminuição do tamanho e do suprimento sanguíneo. Entretanto, é possível que essa redução esteja associada também a alterações na funcionalidade do tecido luteal. Estudar o processo necessário para o ótimo desenvolvimento da atividade secretória do CL é essencial para entender as causas da redução desta (MIYAMOTO et al., 2009).

Na Figura 1 estão apresentados os resultados encontrados por Herzog et al. (2010) de um estudo em que o corpo lúteo foi avaliado ao longo do ciclo estral. Os autores dividiram o período luteal em três fases: fase de crescimento luteal, fase de estática luteal e a fase de regressão luteal. Durante a fase de crescimento, as variáveis de concentração de progesterona (P4), tamanho luteal (LS) e fluxo sanguíneo luteal (LBF) aumentaram de maneira quase idêntica. Diferenças consideráveis nas alterações foram óbvias na fase estática, com moderado aumento no tamanho luteal (~25%), enquanto o fluxo sanguíneo luteal quase dobrou entre os dias 7 e 14, similar ao observado com a progesterona que teve, entretanto, um aumento menos pronunciado entre os dias 7 e 12. Além disso, as concentrações de P4 e o LBF foram notavelmente semelhantes na fase de regressão luteal, caracterizado por um declínio acentuado (~80%) de ambos em um período de 48 horas entre o dia -5 e -3.

Herzog et al. (2010) concluíram então que o fluxo sanguíneo luteal é o indicador mais apropriado da função luteal do que o tamanho do corpo lúteo, apresentando correlação íntima com a produção de progesterona durante cada fase ciclo estral, com alterações similares na maioria dos dias. As restrições do tamanho luteal para determinar as concentrações de P4 são devido a fase de regressão, visto o tamanho apresenta diminuição tardia e é similar durante a fase estática e de regressão. Baseado no pressuposto que a fase estática luteal representa ~20% de todo período luteal no ovário, a cada cinco avaliações do tamanho uma teria um alto risco de engano quanto a funcionalidade deste e capacidade de produzir P4.

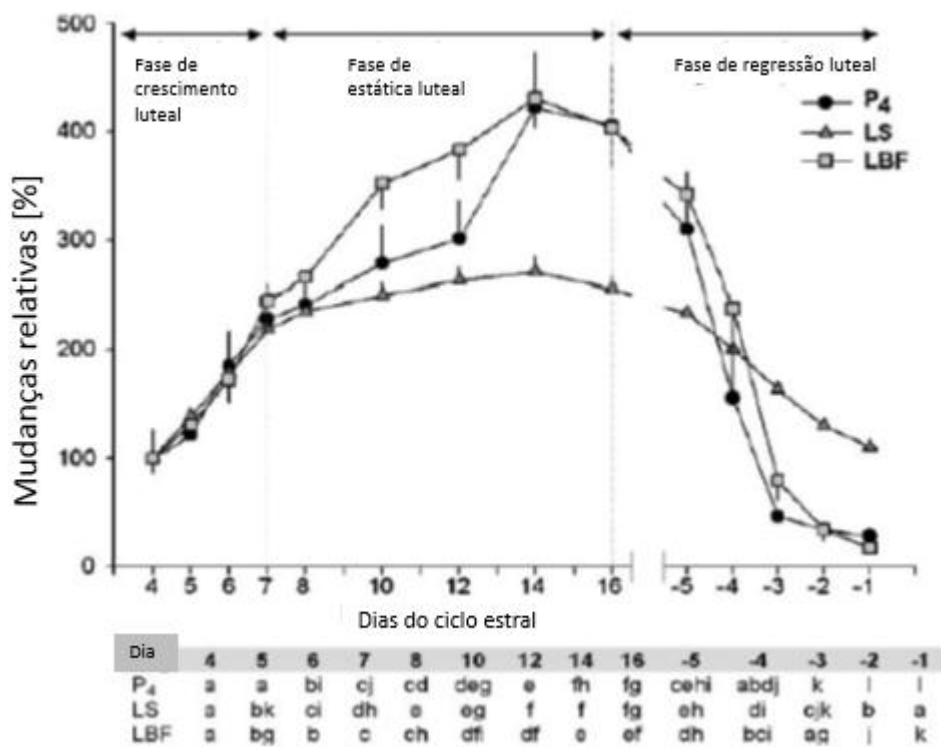


Figura 1. Mudanças relativas da concentração plasmática de progesterona (P₄), tamanho lúteo (LS) e fluxo sanguíneo luteínico (LBF) de 10 vacas durante o ciclo estral (% dos respectivos valores encontrados no dia 4; média e desvios padrão). Na figura, letras diferentes indicam diferenças significativas entre os respectivos dias ($P < 0,05$). Adaptado de Herzog et al. (2010).

Em ruminantes, a regressão do corpo lúteo ocorre sob ação da prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) liberada pelo endométrio no final do ciclo estral, este evento é também marcado pela redução de fluxo sanguíneo no tecido luteal (GINTHER, 2007). No útero, a ocitocina estimula a produção de PGF_{2α} que pode causar luteólise do CL formado após o cio, neste caso se a vaca foi concebida e não houve reconhecimento materno da gestação, essa gestação não será mantida (BALL; PETERS, 2006). Porém, o aumento do fluxo sanguíneo luteal tem sido proposto como resultado da maior transferência de sinais embrionários para manutenção do CL e para o reconhecimento materno, por meio da via útero tubárica (GINTHER; DEL CAMPO, 1973; KAWAKAMI et al., 2001).

Em um estudo com o objetivo de caracterizar o fluxo sanguíneo luteal em vacas gestantes e não gestantes e determinar seu valor para o diagnóstico precoce da gestação, Herzog et al. (2011) observaram que esse fluxo foi significativamente maior em vacas gestantes do que não gestantes nos dias 15 e 18 após o estro. Até o dia 15 após o estro, o fluxo sanguíneo foi similar entre os grupos de vacas (gestante, não gestante, não inseminada e que aparentemente perderam o embrião precocemente), porém declinou bruscamente nas vacas não gestantes e não inseminadas, mantendo-se constante nas vacas gestantes ou que aparentemente perderam o embrião (Figura 2).

Embora o fluxo sanguíneo luteal tenha sido maior nas vacas gestantes do que em não gestantes durante o diestro, analisando os animais individualmente não houve um valor de corte que distinguisse estes animais de maneira confiável (HERZOG et al., 2011). O que, segundo Utt et al. (2009), demonstra que o fluxo sanguíneo luteal é mais adequado para identificar animais não gestantes do que gestantes, com base na diminuição do fluxo sanguíneo luteal associado ao processo de luteólise.

Ao testar a avaliação subjetiva (visual) do fluxo sanguíneo luteal na ultrassonografia Doppler para o diagnóstico de gestação aos 20 dias após a inseminação artificial, Siqueira et al. (2013) concluíram que este teste de diagnóstico representa um método rápido, confiável e consistente que permite a detecção precoce de animais não gestantes, identificando-os corretamente em aproximadamente 98,5% dos casos, o que é de grande utilidade em um programa intensivo de manejo reprodutivo.

A intensidade do fluxo sanguíneo luteal é uma forma indireta de diagnóstico de gestação, por isso é esperado que apresente falsos positivos (QUINTELA et al., 2012). Esses falsos positivos podem decorrer também de perdas gestacionais entre os dias 21-28 da gestação, apresentando o corpo lúteo funcional no momento do diagnóstico precoce, seguido do diagnóstico negativo posteriormente pelo exame ultrassonográfico da vesícula embrionária (SIQUEIRA et al., 2013). Perdas gestacionais até o dia 28 da gestação já foram estimadas em 20% para vacas de leite (MOORE; THATCHER, 2006). A fase luteal prolongada em vacas relatadas por Giordano et al. (2012) também foi associada ao erro de diagnóstico no dia 20 (SIQUEIRA et al., 2013).

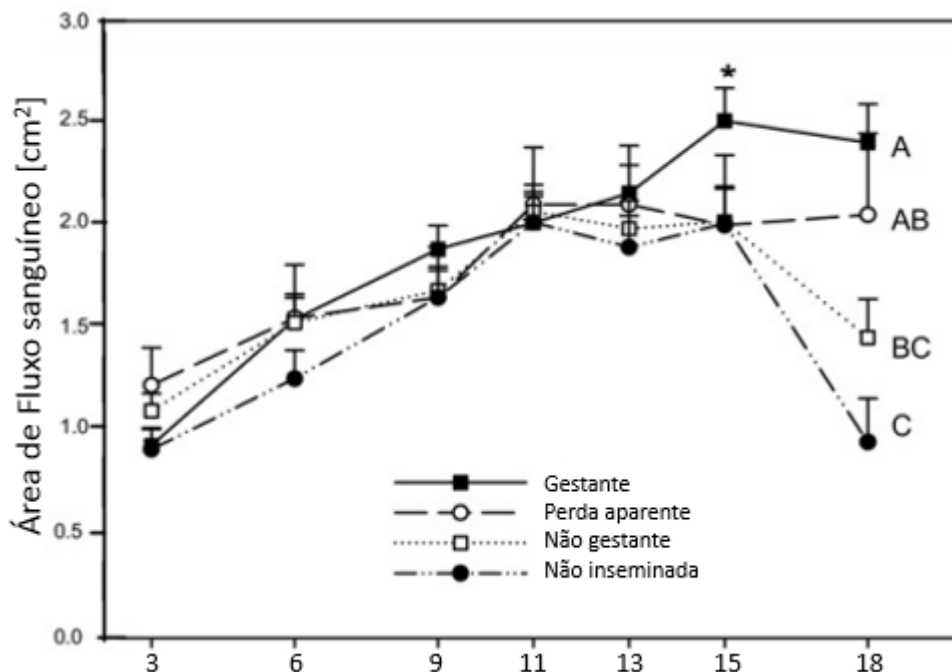


Figura 2. Fluxo sanguíneo luteal médio em vacas leiteiras nos dias 3 a 18 (estro = dia 0). O fluxo sanguíneo luteal sofreu efeitos do grupo, do tempo e do grupo por interação com o tempo ($P < 0,05$, $P < 0,001$ e $P < 0,001$, respectivamente). Adaptado de Herzog et al. (2011).

2.6 Uso da Ultrassonografia Doppler na Reprodução Bovina

A ultrassonografia Doppler permite, de forma pouco invasiva, aprofundar o estudo da vascularização e conseqüentemente da funcionalidade dos tecidos e órgãos reprodutivos. Sendo uma ferramenta de uso potencial na prática para o manejo reprodutivo e no desenvolvimento de novas pesquisas que fomentem os conhecimentos já existentes (PUGLIESI et al., 2017).

Os principais propósitos de um programa reprodutivo são detectar o mais cedo possível se o animal está gestante, detectar causas de falhas na concepção e avaliar se este deve ser reinseminado (FRICKE, LAMB, 2005) ou descartado (SIQUEIRA et al. 2013). Com isso, é possível reduzir o intervalo entre inseminações e aumentar número de serviços e a eficiência reprodutiva (FRICKE, 2002).

Embora seja possível o diagnóstico de gestação com ultrassom no modo B no dia 20-22 após a inseminação com 100% de acurácia (KASTELIC, GINTHER, 1989), para fins práticos recomenda-se que este seja feito pelo menos aos 28-30 dias (PIETERSE et al., 1990),

o que tornaria possível um plano de ressincronização somente após esse período (PUGLIESI et al. 2013).

Segundo Viana et al. (2013), a imagem do Doppler colorido pode ser utilizada para estudos da fisiologia ovariana ou para tomada de decisões de manejo. A ausência de fluxo evidencia a falta de suprimento de sangue, permitindo considerar que o CL não é funcional, mesmo apresentando tamanho normal (diâmetro e área). Deste ponto de vista, a ultrassonografia em modo B limita-se a avaliação do tamanho, que pode ser similar entre um CL funcional ou não funcional.

O fluxo sanguíneo do corpo lúteo tem sido sugerido como sendo mais apropriado do que o tamanho para a avaliação da sua função (HERZOG et al., 2010), permitindo inferir indiretamente sobre a sua funcionalidade e capacidade de produzir progesterona (ACOSTA; MIYAMOTO, 2004). Considerando que em bovinos um CL funcional é obrigatório para gestação, a falta de fluxo sanguíneo em dias específicos do ciclo estral pode ser utilizada como um indicador de animal não gestante (VIANA et al. 2013).

Siqueira et al. (2013) demonstraram a possibilidade de utilização do Doppler como ferramenta confiável e prática para o diagnóstico precoce de vacas não gestantes aos 20 dias após a inseminação. Tal prática possibilitaria a ressincronização precoce e consequente redução do período de serviço e intervalo de parto (VIANA et al. 2013).

O diagnóstico de vacas não gestantes aos 20-22 dias após a inseminação permitiu o desenvolvimento de novas estratégias de sincronização, como uma segunda inseminação em um intervalo de 24 dias após a primeira IATF (ressincronização precoce, a partir dos 14 dias após a primeira). Isto possibilitou uma antecipação em 16 dias neste intervalo comparado ao sistema tradicional que só ressincroniza as fêmeas não gestantes aos 30 dias pós IATF, ou uma antecipação de 8 dias comparada ao sistema precoce que ressincroniza as vacas aos 22 dias e realiza o diagnóstico com 30 dias (PUGLIESI et al. 2017).

Penteado et al. (2016), trabalhando com vacas Nelores e mestiças (1/2 Nelore vs Angus), lactantes, submetidas ao mesmo protocolo precoce, encontraram 52% (233/448) de taxa de concepção na primeira IATF no diagnóstico precoce aos 22 dias e 49% (221/448) de concepção no diagnóstico convencional aos 30 dias, 53% (115/215) de taxa de concepção na ressincronização e 75% (336/448) de prenhez acumulada nas duas IATFs.

Colli et al. (2017), realizando ressincronização precoce em novilhas Nelore de 12 a 16 meses, relataram taxas de concepção de 43% na primeira IATF, 34% na primeira ressincronização e 36% na segunda e com 72% de prenhez acumulada nas 3 IATFs, fechando a estação de monta com 48 dias somente com inseminação artificial, apresentando uma taxa de serviço de 87,5%.

Andrade et al. (2020) realizaram inseminações com intervalos de 21 dias em novilhas Nelores, mimetizando o estado fisiológico de uma fêmea bovina cíclica, trabalhando com uma taxa de serviço de 100% durante a estação de monta. Por meio da ressincronização a partir do dia 12 após a primeira IATF, quando foi colocado um dispositivo intravaginal (DI) de progesterona, no dia 19, o DI foi removido e foi aplicada uma dose de eCG. Na manhã do D21, foi realizado o diagnóstico de gestação com auxílio de um ultrassom Doppler, os animais considerados não gestantes foram imediatamente inseminados e receberam uma aplicação de gonadorelina. No D33, as novilhas consideradas vazias na última avaliação receberam novamente um dispositivo intravaginal, repetindo o tratamento de ressincronização, assim como a metodologia de diagnóstico de gestação descrita anteriormente. Desta maneira, a estação de monta foi de 42 dias, e proporcionou intervalo de 21 dias entre as IATFs, sendo possível pela primeira vez um controle do ciclo estral de fêmeas bovinas associado a um diagnóstico de gestação precoce, onde foi possível inseminar um lote fêmeas a cada 21 dias sem necessitar da detecção de estro.

A perfusão sanguínea pode ser determinada de maneira objetiva por meio da contagem de pixels coloridos presentes em uma determinada estrutura (GINTHER, 2007). Avaliações subjetivas também podem ser realizadas registrando e estimando a extensão da perfusão pela quantidade, tamanho e área dos pontos coloridos presentes para determinar o escore ou porcentagem de vascularização de uma estrutura. Tal técnica permite a avaliação em tempo real sem necessidade de digitalização da imagem (GINTHER, 2007; SIQUEIRA et al., 2013). Abordagem totalmente viável na rotina reprodutiva e sua adoção na rotina reprodutiva pode permitir a ressincronização precoce de animais não gestantes e consequente redução no período de serviço e intervalos de partos (VIANA et al., 2013).

Em programas de transferência de embrião, o Doppler tem sido utilizado como ferramenta para seleção de receptoras, baseado na presença e qualidade do fluxo do corpo lúteo (SIQUEIRA et al., 2009), havendo uma correlação positiva entre a vascularização do CL e a produção de progesterona (HERZOG et al., 2010).

O Doppler também foi utilizado para detectar os animais não gestantes a partir da avaliação do fluxo sanguíneo do CL 14 dias após a TETF (Transferência de Embrião em Tempo Fixo), mostrando ser uma técnica eficaz que aumenta a flexibilidade do uso de receptoras, permitindo que cerca de 79,3% dos animais não gestantes fossem resincronizados 9 a 14 dias antes, comparado ao manejo convencional com diagnóstico aos 30- 35 dias de gestação (GUIMARÃES et al., 2015).

O Doppler pode ser utilizado para descartar receptoras que apresentem CL afuncional, bem como permitir selecionar receptoras de melhor qualidade para embriões de maior prioridade para se obter gestação. Isso contribui de forma efetiva para o aumento da eficiência do programa, visto que não haveria perda de embriões em receptoras com CL afuncional e em caso de excedente de receptoras, as melhores (apresentando média a alta vascularização) poderiam ser escolhidas (PLUGLIESE et al., 2017).

A avaliação de fluxo da parede do folículo pode ser utilizada para identificar folículos saudáveis e prever a proximidade com a ovulação, além disso a ausência de fluxo na parede do folículo é associada a atresia deste (ACOSTA et al., 2003). Essa perfusão também foi associada com o sucesso da fertilização *in vitro* (SIDDIQUI et al., 2009b) e com estabelecimento de gestação em vacas (SIDDIQUI et al., 2009a). Embora na produção comercial de embriões não haja uma rastreabilidade ao ponto de tornar possível associar a origem do oócito ao status do folículo. Isso requer também o estabelecimento de uma rotina de procedimentos de avaliação e valores ou critérios de referência e poderia ser utilizado também para decidir pela inseminação (VIANA et al., 2013).

2.7 Estresse e Temperamento Animal

Os animais domésticos são frequentemente expostos a vários fatores estressores, como calor, frio, manejo, transporte, temperamento, introdução em novos lotes, parasitas e doenças (GEBREGEZIABHEAR; AMEHA, 2015). A resposta ao estresse depende da reação do animal frente a estas condições que afetam seu bem-estar. Desta forma, alguns bovinos

apresentam temperamento excitável quando exposto ao manejo humano, o que pode ser atribuído ao medo e a incapacidade de lidar com tais situações. Esses animais são então classificados como estressados ou reativos, e suas reações ao estresse geram alterações fisiológicas que influenciam aspectos como crescimento, saúde e reprodução (COOKE, 2011). A magnitude do estresse e suas consequências serão determinadas pelo somatório dos agentes estressores, bem como pela intensidade e duração deste estresse (COUBROUGH, 1985).

O temperamento é definido pelas características da reação do animal ao manejo humano (BURROW; CORBET, 2000). E diferentes sistemas de pontuação foram desenvolvidos para medir o temperamento. As técnicas atuais incluem escore de brete, velocidade de fuga e escore de saída (BASZCZAK et al., 2006).

2.8 Efeito do Estresse e do Temperamento na Reprodução Animal

Cooke et al. (2011) estudaram a influência do temperamento no desempenho reprodutivo de fêmeas bovinas (*Bos taurus indicus*) de corte e constataram que o temperamento classificado como excitável foi um fator que afetou negativamente o desempenho reprodutivo, reduzindo as taxas de prenhez pós IATF. Para classificação do temperamento, as vacas foram avaliadas durante a IATF e pontuadas em escores de 1 a 5 de acordo com movimentação no brete de contenção (1 mais calmo e 5 mais agitado) e também de 1 a 5 de acordo com velocidade de saída deste (1 mais lento e 5 mais rápido). Posteriormente, a média destes escores foi utilizada para determinar o escore final de temperamento, no qual foram classificados como temperamento adequado (pontuação de temperamento ≤ 3) ou temperamento excitável (pontuação de temperamento > 3).

Características do sistema de produção e da raça também influenciam no temperamento. O gado de corte criado extensivamente a pasto e de composição genética *Bos taurus indicus* são potencialmente mais difíceis de controlar, o que pode gerar importantes problemas de manejo, produtivos e econômicos (COOKE, 2011). Baseado nisso, o temperamento pode ter, ainda, mais importância na eficiência reprodutiva para a produção de bezerros e vacas no Brasil (VASCONCELOS et al., 2014).

O temperamento afeta a eficiência reprodutiva das fêmeas e está associado ao aumento de cortisol sanguíneo em animais mais excitáveis (COOKE, 2014). Os mamíferos respondem as modificações ambientais por meio de mecanismos de adaptação regulados pela liberação de hormônios como os adrenocorticotróficos, glicocorticoides e catecolaminas cuja a quantidade liberada depende intensidade do estresse ao qual são submetidos (ALEJANDRO et al. 2014). O aumento desses hormônios supracitados acarreta em decréscimo de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), das gonadotrofinas, da prolactina e ocorre a secreção de glucagon (MÖSTL; PALME, 2003).

Agentes estressores afetam a função reprodutiva também por meio de ações no hipotálamo, além de prejudicar a liberação de LH pela hipófise (DOBSON; SMITH, 1995). Ginther (2007) já relacionou o escore de fluxo do folículo dominante com o pico de LH e predição da ovulação. A redução na secreção endógena de GnRH/LH, em última análise, priva o folículo ovariano do suporte adequado de gonadotrofina, levando à redução da produção de estradiol pelos folículos que crescem mais lentamente, havendo assim interferência por estressores também no ovário (DOBSON; SMITH, 2000).

A ovulação de folículos menores foi associada à formação de corpos lúteos menores e menor concentração de progesterona (VASCONCELOS et al., 2001). Além disso, foram detectadas menores taxas de gestação e maior mortalidade embrionária/fetal em vacas com folículos pequenos induzidos a ovulação do que aqueles que tiveram folículos grandes induzidos (PERRY et al., 2005). Sá Filho et al. (2010) também associaram a presença de folículos maiores no momento da IA à maiores taxas de ovulação e expressão de cio.

Pinaffi et al. (2015) afirmam que ajustes finos são necessários para melhorar ainda mais os resultados reprodutivos obtidos com as técnicas de reprodução assistida. E segundo Vasconcelos et al. (2014), são necessárias pesquisas para compreender ainda mais os impactos do temperamento sobre os resultados produtivos e reprodutivos em *Bos taurus indicus*.

As ligações fisiológicas entre o temperamento e a função reprodutiva precisam ser melhor analisadas (COOKE; BOHNERT, 2011). Em um experimento investigando os impactos do temperamento nos parâmetros fisiológicos, produtivos e reprodutivos de vacas *Bos taurus indicus*, foi observado que a probabilidade delas se tornarem gestantes após a primeira IA foi diminuída linearmente quando o cortisol sérico aumentou. A haptoglobulina

sérica também aumentou de maneira similar ao cortisol e embora não tenha sido encontrado efeito do temperamento sobre essa (COOKE et al., 2017), esses autores citam que esta é uma proteína de fase inflamatória aguda que, segundo Hansen et al. (2004) e Williams et al. (2001), são conhecidas por prejudicar a função reprodutiva, perturbando o desenvolvimento folicular, ovulação e o estabelecimento de prenhez.

Entre os fatores ambientais relacionados ao estresse, o calor é um significativo na ciclicidade reprodutiva normal, porém o manejo também é um indutor do estresse e tem se tornado mais importante diante dos métodos modernos de produção (COUBROUGH, 1985).

O estresse ou o temperamento estressado influencia de maneira indireta a reprodução pelo decréscimo no status nutricional, e direta por meio do cortisol, principal hormônio envolvido, que possui efeito direto na interrupção dos mecanismos que regulam os eventos da reprodução em vacas de corte, como ovulação, concepção e estabelecimento da gestação (COOKE, 2011; COOKE, 2016).

O estresse causa redução da amplitude e frequência dos pulsos de GnRH e LH atrasando o pico de LH pré-ovulatório, reduzindo a manifestação de cio e incidência de ovulação normal (DOBSON; SMITH, 2000). Animais reativos podem apresentar alterações no metabolismo, no particionamento e na disponibilidade dos nutrientes devido as necessidades de sustentar a resposta comportamental ao estresse (COOKE et al., 2009, COOKE et al., 2011,). Ausência do pico de LH, concentrações subótimas, diminuição ou alterações no momento da liberação influenciam a ovulação, a qualidade do oócito e o desenvolvimento embrionário, causando falhas na ovulação (KUMAR; SAIT, 2011) e formação de cistos ovarianos (STANY; HAMILTON, 2008).

Em um experimento em camundongos expostos uma única vez ao estresse psicossocial agudo (mudança de gaiola) durante o proestro, ocorreu o bloqueio no aumento do LH induzido pelo estradiol, afetando o tempo ou a incidência do pico deste, interferindo no mecanismo de feedback do estrógeno com o LH (WAGENMAKER; MOENTER, 2017).

Além do feedback negativo da progesterona com o LH, em condições de estresse podem ocorrer aumentos nas concentrações de progesterona, provavelmente de origem adrenal, que afetaria a função endometrial, com mudanças no ambiente uterino, influenciando a sobrevivência dos gametas e zigotos (COUBROUGH, 1985). Cooke et al. (2009), trabalhando com aclimação de novilhas *Bos taurus indicus* ao manejo, observaram um

aumento na concentração de progesterona nos animais manejados, que foi associada a esteroidogênese adrenal.

Kasimanickam et al. (2014) avaliaram a influência do temperamento na concentração hormonal e nas taxas de gestação em novilhas de corte, e encontraram maiores concentrações de cortisol, progesterona e prolactina no início da sincronização em animais de temperamento excitado. Com isso, supôs-se que a primeira administração de GnRH do protocolo utilizado poderia ter falhado em induzir a ovulação e/ou luteinização dos folículos dominantes, o que segundo eles poderia levar a persistência de um folículo dominante e liberação de um oócito envelhecido e incompetente. As concentrações aumentadas da progesterona e da prolactina poderiam causar a falha no aumento do LH e na indução da ovulação pelo GnRH no momento da inseminação também.

Em novilhas de temperamento excitado, a presença de folículos de menor tamanho também foi associada a falhas na fertilização e/ou morte embrionária devido a prejudicada produção de progesterona pelo corpo lúteo formado (KASIMANICKAM et al., 2014).

Reduções de consumo alimentar também estão associadas ao comportamento estressado (NKRUMAH et al., 2007). Essa redução na ingestão de nutrientes resulta em decréscimo no IGF I (Insulin Growth Factor) e no LH plasmático (RICHARDS et al., 1991), sendo que o IGF I, IGF II, os receptores de IGF e as proteínas de ligação de IGF possuem importante papel na modulação dos efeitos da nutrição animal sobre o desenvolvimento folicular (CONSTANT et al., 2000).

PAULA et al. (2008) afirmaram que o estresse térmico materno também diminui a fertilização e o desenvolvimento posterior do concepto por meio de mecanismos ainda desconhecidos, diante disso testaram a hipótese de que o suporte de oxigênio no folículo pré-ovulatório pode ser reduzido devido ao aumento da vascularização da pele e trato respiratório como estratégia de termorregulação do animal, o que também reduziria a síntese de hormônios esteroidais. Porém, as concentrações de oxigênio, 17 β estradiol e progesterona do fluido folicular não sofreram influência, apenas o diâmetro do folículo apresentou tendência de correlação inversa à concentração de oxigênio.

Um dos principais “efeitos colaterais” do estresse sobre a reprodução é que as tarefas não essenciais podem ser adiadas, intervindo de maneira inibitória e podendo diminuir as taxas de fertilidade (DOBSON et al. 2001).

A contenção como fator de estresse em roedores demonstrou reduções significativas no LH plasmático acompanhado de aumentos no ACTH e corticosterona. Efeitos sobre o FSH são mais difíceis de detectar, o que foi associado a meia vida mais longa deste hormônio, não demonstrando variações nas concentrações plasmáticas ou periféricas deste (DEMURA et al., 1989).

Em ovelhas ovariectomizadas, a liberação pulsátil de LH foi diminuída pelo confinamento agudo, com redução na frequência e amplitude do seu pulso (RASMUSSEN; MALVEN, 1983). Porém, com a habituação ao estresse por vários dias à período de confinamento diários, minimizou esse efeito e as descargas episódicas se restauraram com o tempo. O transporte aliado ao confinamento também diminuiu a frequência e a amplitude dos pulsos de LH, com efeito mais marcante nas primeiras quatro horas (PHOGAT et al. 1999; DOBSON et al. 1999).

O estresse é responsável por várias manifestações, incluindo subfertilidade. Alguns fatores são intangíveis embora sejam conhecidos, porém muitas vezes é impossível identificar precisamente as causas que contribuem na redução na fertilidade e, portanto, culpa-se o estresse. Uma definição de estresse seria a incapacidade de um animal para lidar com o seu ambiente, fracassando em alcançar o potencial genético para taxa de crescimento, produção de leite, resistência a doenças ou infertilidade (DOBSON; SMITH, 2000).

Administração de hormônio corticotrófico em novilhas reduziu a frequência e magnitude dos pulsos de LH, o que pode poder afetar a produção de estrógeno pelo folículo em desenvolvimento. Tal como acontece no balanço energético negativo, isso pode repercutir na ovulação e subsequente formação do CL. Os efeitos podem ser mediados, pelo menos em parte, pela hipófise devido a ação do ACTH na redução da quantidade de LH liberado (DOBSON; SMITH, 2000).

Embora seja bem estabelecido que o estresse prejudica a reprodução, não se sabe com precisão por meio de qual mecanismo ele atua. Acredita-se que os fatores estressores agem no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, estimulando a liberação de hormônio adrecorticotrófico (ACTH), este estimula as glândulas adrenais a secretarem glicocorticoides. Esses hormônios afetariam a liberação de gonadotrofinas pelo hipotálamo e/ou hipófise. Estudos tem investigado o envolvimento do estresse na síndrome de repetição de cio em gado leiteiro. A estimulação adrenal associada ao estresse resultaria em concentrações elevadas de

progesteronas durante o estro, prolongando o crescimento folicular e levando a ovulação tardia que afeta negativamente a fertilização (GORDON, 2004).

O estresse calórico é outro fator que acarreta perda gestacional, comprometendo a esteroidogênese. Este também compromete funcionalidade e fertilidade interferindo na capacidade do oócito (competência oocitária) em se desenvolver até o estágio de blastocisto, devido a alterações nas membranas e nas propriedades bioquímicas deste (ZERON et al., 2001), reduzindo a qualidade oocitária (HANSEN, 2002). Esses efeitos são mais pronunciados nas vacas lactantes de alta produção devido à dificuldade de termorregulação (FERREIRA et al., 2009).

2.9 Referências Bibliográficas

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, n. 5, 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, p.127-140, 2004.

ACOSTA, T.J.; OZAWA, T.; KOBAYASHI, S.; HAYASHI, K.; OHTANI, M.; KRAETZL, W.D.; SATO, K.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Periovulatory changes in the local release of vasoactive peptides, prostaglandin F2 α , and steroid hormones from bovine mature follicles in vivo. **Biology of Reproduction**, v.63, n.5, p.1253-1261, 2000.

ACOSTA, T.J.; YOSHIKAWA.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F2 α injection in the cow. **Biology of Reproduction**, v.66, n.3, p.651-658, 2002.

ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H.; GINTHER, O. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Reproduction**, v.94, n.1, p.177-188, 1992.

ALEJANDRO, C.I.; ABEL, V.M.; JAIME, O.P.; PEDRO, S. A. Environmental Stress Effect on Animal Reproduction. **Open Journal of Animal Sciences**, v. 4, p. 79-84, 2014.

ALILA, H.W.; HANSEL, W. Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. **Biology of Reproduction**, v.31, n.5, p.1015-1025, 1984.

ANDRADE, J.P.N.; GOMEZ-LEÓN, V.E.; ANDRADE, F.S.; CARVALHO, B.P.; LACOUTH, K. L.; GARCIA, F.Z.; JACOB, J.C.F.; SALES, J.N.S.; WILTBANK, M.C.; MELLO, M.R.B. Development of a novel 21-day reinsemination program, ReBreed21, in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**. v.155, p.125–131, 2020.

BALL, P.J.H.; PETERS, A.R. **Reprodução em bovinos**. 3. ed. Roca: São Paulo, 2006.

BASZCZAK, J.A.; GRANDIN, T.; GRUBER, S.L.; ENGLE, T.E.; PLATTER W.J.; LAUDERT S.B.; SCHROEDER, A.L.; TATUM J.D. Effects of ractopamine supplementation on behavior of British, Continental, and Brahman crossbred steers during routine handling. **Journal of Animal Science**, v.84, n.12, p.3410-3414, 2006.

BATTOCCHIO, M.; GABAI, G.; MOLLO, A.; VERONESI, M.C.; SOLDANO, F.; BONO, G.; CAIROLI, F. Agreement between ultrasonographic classification of the CL and plasma progesterone concentration in dairy cows. **Theriogenology**. v.51, n.6, p.1059–1069, 1999.

BICALHO, R.C.; GALVAO, K.N.; GUARD, C.L.; SANTOS, J.E.P. Optimizing the accuracy of detecting a functional corpus luteum in dairy cows. **Theriogenology**, v.70, n.2, p.199-207, 2008.

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

BÓ, G.A.; CUTAIA, L.; PERES, L.C., PINCINATO, D., MARAÑA, D., BARUSELLI, P.S. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. **Society of Reproduction and Fertility Supplement**, v.64, p.223, 2007.

BOLLWEIN, H.; HEPPELMANN, M.; LÜTTGENAU, J. Ultrasonographic doppler use for female reproduction management. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v.32, n.1, p.149-164, 2016.

BURROW, H.M.; CORBET, N.J. Genetic and environmental factors affecting temperament of zebu and zebu-derived beef cattle grazed at pasture in the tropics. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.51, n.1, p.155- 162, 2000.

CERRI, G.G. **Avaliação dúplex do fígado, sistema portal e vasos viscerais**. São Paulo: Sarvier, 1998. p. 120-12.

COLLI, M.H.A.; REZENDE, R.G.; ELLIFF, F.M.; ZANATTA, G.M.; MINGOTI, R.D.; GONÇALES JUNIOR, W.A.; FERREIRA, R.M.; BARUSELLI, P.S.; Factors influencing the pregnancy rate of 14 month old Nelore heifers submitted to 3 consecutive TAI. **Animal Reproduction**, 2017 (abstract).

CONSTANT, F.; PONTER, A. A.; PONSART, C.; FONTAINE, J. J.; MIALOT, J. P.; GRIMARD, B.; CHASTANT, S. Effect of underfeeding on plasmatic and intrafollicular IGF1s in postpartum anoestrus beef cows. In: **Journal of Reproduction and Fertility Abstract**, v.16, p.15, 2000.

COOKE, R.F. Effects of temperament and animal handling on fertility. In: APPLIED REPRODUCTIVE STRATEGIES IN BEEF CATTLE, 2011, Nashville **Anais...** Nashville, 2011. p. 255-263.

COOKE, R.F. Temperament and acclimation to human handling influence growth, health, and reproductive responses in *Bos taurus* and *B. indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v.92, p.5325-5333, 2014.

COOKE, R.F. Impacts of temperament on reproductive performance of *Bos indicus* and *B. taurus* beef females. **Journal of Animal Science**, v.94, p.561-562, 2016.

COOKE, R.F.; ARTHINGTON, J.D.; AUSTIN, B.R.; YELICH, J.V. Effects of acclimation to handling on performance, reproductive, and physiological responses of Brahman-crossbred heifers. **Journal of Animal Science**, v.87, n.10, p.3403-3412, 2009.

COOKE, R.F.; BOHNERT, D.W. Bovine acute-phase response following corticotrophin-release hormone challenge. **Journal of Animal Science**, v.89, p.252–257, 2011.

COOKE, R.F.; BOHNERT, D.W.; MENEGHETTI, M.; LOSI, T.C.; VASCONCELOS, J.L. M. Effects of temperament on pregnancy rates to fixed-timed AI in *Bos indicus* beef cows. **Livestock Science**, v.142, n.1-3, p.108-113, 2011.

COOKE, R.F.; SCHUBACH, K.M.; MARQUES, R.S.; PERES, R.F.G.; SILVA, L.G.T.; CARVALHO, S.; CIPRIANO, R.S.; BOHNERT, D.W.; PIRES, A.V.; VASCONCELOS, J. L.M. Effects of temperament on physiological, productive, and reproductive responses in *Bos indicus* beef cows. **Journal of Animal Science**, v.95, p. 1-8, 2017.

COUBROUGH, R.I. Stress and fertility. A review. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 153—156, 1985.

DEMURA, R.; SUZUKI, T.; NAKAMURA, S.; KOMATU, H.; ODAGIRI, E.; DEMURA, H. Effect of immobilization stress on testosterone and inhibin in male rats. **Journal of Andrology**, v.10, n.3, p.210-213, 1989.

DICKEY R.P. Doppler ultrasound investigation of uterine and ovarian blood flow in infertility and early pregnancy. **Human Reproduction Update**, v.3, n.5, p.467–503, 1997.

DIZEREGA, G.S.; HODGEN, G.D. Folliculogenesis in the primate ovarian cycle. **Endocrine reviews**, v.2, n.1, p. 27-49, 1981.

DOBSON, H.; SMITH, R.F. Stress and reproduction in farm animals. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.49, p.451-61, 1995.

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

DOBSON, H.; TEBBLE, J. E.; PHOGAT, J.B.; SMITH, R.F. Effect of transport on pulsatile and surge secretion of LH in ewes in the breeding season. **Reproduction**, v.116, n.1, p.1-8, 1999.

DOBSON, H.; TEBBLE, J.E.; SMITH, R.F.; WARD, W.R. Is stress really all that important? **Theriogenology**, v.55, n.1, p.65-73, 2001.

E PAULA, L.D.C.; ANDRZEJEWSKI, J.; JULIAN, D.; SPICER, L.J.; HANSEN, P.J. Oxygen and steroid concentrations in preovulatory follicles of lactating dairy cows exposed to acute heat stress. **Theriogenology**, v.69, n.7, p.805-813, 2008.

FERREIRA, F., CAMPOS, W. E., CARVALHO, A. U., PIRES, M. F. A., MARTINEZ, M. L., SILVA, M. V. G. B., VERNEQUE, R.S.; SILVA, P. F. Taxa de sudação e parâmetros

histológicos de bovinos submetidos ao estresse calórico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 4, p. 763-768, 2009.

FERREIRA-DIAS, G.; COSTA, A.S.; MATEUS, L.; KORZEKWA, A.; REDMER, D.A.; SKARZYNSKI, D. J. Proliferative processes within the equine corpus luteum may depend on paracrine progesterone actions. **Journal of Physiology and Pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society**, v.57, p.139-151, 2006.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v.82, p.109-126, 2004.

FRICKE, P.M. Scanning the Future – Ultrasonography as a Reproductive Management Tool for Dairy Cattle1. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.8, p.1918-1926, 2002.

FRICKE, P.M.; LAMB, G.C. Potential applications and pitfalls of reproductive ultrasonography in bovine practice. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v.21, n.2, p.419-436, 2005.

GALINA, C.S.; ARTHUR, G.H. Review on cattle reproduction in the tropics. Part 4. Oestrous cycles. In: **Animal Breeding Abstracts**, p.697-707. 1990

GEBREGEZIABHEAR, E.; AMEHA, N. The Effect of Stress on Productivity of Animals: A Review, **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v.5, n.3, p.165-172, 2015.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; DONADEU, F.X.; BERGFELT, D.R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v.78, n.3-4, p.239–257, 2003.

GINTHER, O.J.; DEL CAMPO, C.H. Vascular anatomy of the uterus and ovaries and the unilateral luteolytic effect of the uterus: areas of close apposition between the ovarian artery and vessels which contain uterine venous blood in sheep. **American Journal of Veterinary Research**, v.34, p.1387-1393, 1973.

GINTHER, O.J.; DOMINGUES, R.R.; SIDDIQUI, M.A.R.; DANGUDUBIYYAM, S.V. Blood flow and echotextural differences between the future dominant and subordinate follicles before the beginning of diameter deviation in heifers. **Theriogenology**, v.100, p.42-49, 2017.

GINTHER, O.J. Intraovarian spatial and vascular harmony between follicles and corpus luteum in monovulatory heifers, mares, and women. **Theriogenology**, v.128, p.31-39, 2019.

GINTHER, O.J.; KASTELIC, J.P.; KNOPF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v.20, n.3, p.187-200, 1989.

GINTHER, O.J. **Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color-Doppler Ultrasonography, 1ed.** Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 2007. 258p

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

GINTHER, O. J. The theory of follicle selection in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.57, p.85-99, 2016.

GIORDANO, J.O.; GUENTHER, J.N.; LOPES JR., G.; FRICKE, P.M. Changes in serum pregnancy-associated glycoprotein, pregnancy-specific protein B, and progesterone concentrations before and after induction of pregnancy loss in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.95, n.2, p.683-697, 2012.

GORDON, I. **Reproductive Technologies in Farm Animals**. Library of Congress Cataloging-in-Publication, CABi, 2004.

GOUGEON, A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. **Endocrine Reviews**, v.17, n.2, p.121-155, 1996.

GRAZUL-BILSKA, A.T.; REDMER, D.A.; KILLILEA, S.D.; KRAFT, K.C.; REYNOLDS, L.P. Production of mitogenic factor (s) by ovine corpora lutea throughout the estrous cycle. **Endocrinology**, v.130, n.6, p.3625-3632, 1992.

GUIMARÃES, C.R.B.; OLIVEIRA, M.E.; ROSSI, J.R.; FERNANDES, C.A.C.; VIANA, J.H.M.; PALHAO, M.P. Corpus luteum blood flow evaluation on Day 21 to improve the management of embryo recipient herds. **Theriogenology**, v.84, p.237- 241, 2015.

HANSEL, W.; BLAIR, R.M. Bovine corpus luteum: a historic overview and implications for future research. **Theriogenology**, v.45, n.7, p.1267-1294, 1996.

HANSEN, P.J. Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective. **Journal of Animal Science**, v.80, n.2, p.E33-E44, 2002.

HANSEN, P.J.; SOTO, P.; NATZKE, R.P. Mastitis and Fertility in Cattle – Possible Involvement of Inflammation or Immune Activation in Embryonic Mortality. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.51, n.4, p.294- 301, 2004.

HERZOG, K.; BROCKHAN-LÜDEMANN, M.; KASKE, M.; BEINDORFF, N.; PAUL, V.; NIEMANN, H.; BOLLWEIN, H. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. **Theriogenology**, v.73, n.5, p. 691-697, 2010.

HERZOG, K.; KOERTE, J.; FLACHOWSKY, G.; BOLLWEIN, H. Variability of uterine blood flow in lactating cows during the second half of gestation. **Theriogenology**, v.75, n.9, p.1688-1694, 2011.

- HUSSEIN, F.M.; PACCAMOMTI, D.L.; EILTS B.E.; YOUNIS, M.Y.M. Comparison of ovarian palpation, milk progesterone and plasma progesterone in the cow. **Theriogenology**, v.38, n.3, p.431-439, 1992.
- IRELAND, J.J.; ROCHE, J.F. Growth and differentiation of large antral follicles after spontaneous luteolysis in heifers: changes in concentration of hormones in follicular fluid and specific binding of gonadotropins to follicles. **Journal of Animal Science**, v.57, n.1, p.157-167, 1983.
- JANSON, P.O.; DAMBER, J.E.; AXEN, C. Luteal blood flow and progesterone secretion in pseudopregnant rabbits. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.63, n.2, p.491-497, 1981.
- KASIMANICKAM, R.; SCHROEDER, S.; ASSAY, M.; KASIMANICKAM, V.; MOORE, D.A.; GAY, J.M.; WHITTIER, W.D. Influence of temperament score and handling facility on stress, reproductive hormone concentrations, and fixed time AI pregnancy rates in beef heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, n.5, p.775-782, 2014.
- KASTELIC, J. P.; GINTHER, O.J. Fate of conceptus and corpus luteum after induced embryonic loss in heifers. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.194, n.7, p.922-928, 1989.
- KAWAKAMI, S.; SHIDA, T.; MUTOH, M.; KOHMOTO, H.; ONHCHI, T. Relation between luteal regression and so-called counter current mechanism in the cow: verification from PGF2 α concentrations in ovarian arterial, uterine venous and jugular venous blood following PGF2 α loading. **Journal of Reproduction and Development**, v.41, n.3, p.219-223, 2001.
- KUMAR, P.; SAIT, S.F. Luteinizing hormone and its dilemma in ovulation induction. **Journal of Human Reproductive Sciences**, v.4, n.1, p.2, 2011.
- LÜTTGENAU, J.; BOLLWEIN, H. Evaluation of bovine luteal blood flow by using color Doppler ultrasonography. **Reproductive Biology**, v.14, n.2, p.103-109, 2014.
- MAPLETOFT, R.J.; BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S. Control of ovarian function for assisted reproductive technologies in cattle. **Animal Reproduction (AR)**, v.6, n.1, p.114-124, 2009.
- MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; SASAHARA, K. Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: impact of angiogenic and vasoactive factors. **Domestic Animal Endocrinology**, v.37, n.3, p.159-169, 2009.
- MOORE, K.; THATCHER, W.W. Major advances associated with reproduction in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.89, n.4, p.1254-1266, 2006.
- MÖSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.67-74, 2003.

MIYAMOTO, A.; SHIRASUMA, K.; WIJAYAGUNAWARDANE, M.P.B.; WATANABE, S.; HAYASHI, M.; YAMAMOTO D.; MATSUI, M.; ACOSTA, T.J. Blood flow: a key regulatory component of corpus luteum function in cow. **Domestic Animal Endocrinology**, v.29, p.329-339, 2005.

NKRUMAH, J.D.; CREWS JR, D.H.; BASARAB, J.A.; PRICE, M.A.; OKINE, E.K.; WANG, Z.; LI, C.; MOORE, S.S. Genetic and phenotypic relationships of feeding behavior and temperament with performance, feed efficiency, ultrasound, and carcass merit of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.85, n.10, p.2382-2390, 2007.

NYLAND, T.G.; MATTOON, J.S. **Ultra-som diagnóstico em pequenos animais**. Roca, São Paulo, p.161-198, 2005.

O'SHEA, J.D.; RODGERS, R.J.; D'OCCHIO, M.J. Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. **Reproduction**, v 85, n.2, p.483-487, 1989.

PENTEADO, L.; REZENDE, R.G.; MINGOTI, R.D.; COLLI, M.H.A.; SÁ FILHO, M.F.; SANTOS, F.B.; MOTTA, J.C.L.; BAYEUX, B.M.; VIEIRA, L.M.; BARUSELLI, P.S.; Pregnancy rate of Nelore cows submitted to resynchronization 14 or 22 days after prior TAI. **Animal Reproduction**, v.13, n.3, p.450, 2016.

PERRY, G.A.; SMITH, M.F.; LUCY, M.C.; GREEN, J.A.; PARKS, T.E.; MACNEIL, M.D.; ROBERTS, A.J.; GEARY, T.W. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 14, p. 5268-5273, 2005.

PHOGAT, J.B.; SMITH, R.F.; DOBSON, H. Effect of transport on pituitary responsiveness to exogenous pulsatile GnRH and oestradiol-induced LH release in intact ewes. **Reproduction**, v.116, n.1, p.9-18, 1999.

PINAFFI, F.L.V.; SANTOS, E.S.; SILVA, M.G.; MATURANA FILHO, M.; MADUREIRA, E.H.; SILVA, L.A. Follicle and corpus luteum size and vascularity as predictors of fertility at the time of artificial insemination and embryo transfer in beef cattle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n.5, p.470-476, 2015.

PIETERSE, M.C.; SZENCI, O.; WILLEMSE, A.H.; BAJCSY, C.S.A.; DIELEMAN, S. J.; TAVERNE, M.A.M. Early pregnancy diagnosis in cattle by means of linear-array real-time ultrasound scanning of the uterus and a qualitative and quantitative milk progesterone test. **Theriogenology**, v. 33, n. 3, p. 697-707, 1990.

PINHEIRO, O.L.; BARROS, C.M.; FIGUEIREDO, R.A.; DO VALLE, E.R.; ENCARNÇÃO, R.O.; PADOVANI, C.R. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus* with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2 α or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v.49, n.3, p.667-681, 1998.

PUGLIESI, G.; MELO, G. D.; SILVA, J. B.; CARVALHÊDO, A. S.; LOPES, E.; SIQUEIRA FILHO, E.; SILVA, L. A. BINELLI, M. Use of color-Doppler ultrasonography

for selection of recipients in timed-embryo transfer programs in beef cattle. **Theriogenology**, v. 135, p. 73-79, 2019.

PUGLIESI, G.; PINAFFI, F.L.V.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Use of corpus luteum area as a predictor of ongoing functional luteolysis in dairy heifers. In: 39 ST ANNUAL CONFERENCE OF THE IETS. 2013. Hannover (GER) **Reproduction, Fertility and Development**, Hannover (GER) v.25, p. 235, 2013.

PUGLIESI, G.; REZENDE, R.G.; DA SILVA, J.C.B.; LOPES, E.; NISHIMURA, T.K.; BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA, E.H.; BINELLI, M. Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.41, n.1, p.140-150, 2017.

QUINTELA, L.A.; BARRIO, M.; PEÑA, A.I.; BECERRA, J.J.; CAINZOS, J.; HERRADÓN, P.G.; DÍAZ, C. Use of ultrasound in the reproductive management of dairy cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, n.s.3, p.34-44, 2012.

RAJKOVIC, A.; PANGAS, S.A.; MATZUK, M.M. Follicular Development: Mouse, Sheep and Human Models In: Knobil and Neill's **Physiology of Reproduction**, Third Edition edited by Jimmy D. Neill Elsevier, 2006.

RASMUSSEN, D.D.; MALVEN, P.V. Effects of confinement stress on episodic secretion of LH in ovariectomized sheep. **Neuroendocrinology**, v.36, n.5, p.392-396, 1983.

RATHBONE, M.J.; KINDER, J.E.; FIKE, K.; KOJIMA, F.; CLOPTON, D.; OGLE, C.R.; BUNT, C.R. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. **Advanced drug delivery reviews**, v.50, n.3, p.277-320, 2001.

RAWLINGS, N.C.; BARTLEWSKI, P.M. Clinical reproductive physiology of ewes. In: **Current therapy in large animal theriogenology**. WB Saunders, 2007.

REDMER, D.A.; REYNOLDS, L.P. Angiogenesis in the ovary. **Reviews of Reproduction**, v.1, n.3, p.182-192, 1996.

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

REYNOLDS, L.P.; KILLILEA, S.D.; REDMER, D.A. Angiogenesis in the female reproductive system. **The FASEB Journal**, v.6, n.3, p.886-892, 1992.

REYNOLDS, L.P.; REDMER, D.A. Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. **Journal of Animal Science**, v.76, n.6, p.1671-1681, 1998.

- RICHARDS, M.W.; WETTEMANN, R.P.; SPICER, L.J.; MORGAN, G.L. Nutritional anestrus in beef cows: effects of body condition and ovariectomy on serum luteinizing hormone and insulin-like growth factor-I. **Biology of Reproduction**, v.44, n.6, p.961-966, 1991.
- SÁ FILHO, M.F.D.; CRESPILO, A.M.; SANTOS, J.E.P.; PERRY, G.A.; BARUSELLI, P.S. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, v.120, n.1-4, p.23-30, 2010.
- SALLES, M.G.F.; ARAÚJO, A.A. Corpo lúteo cíclico e gestacional: revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.3, p.185-194, 2010.
- SARTORI, R.; PURSLEY, J.R.; WILTBANK, M.C. Estrous cycle of heifers and lactating dairy cows: Ovarian and hormonal dynamics and estrous cycle abnormalities, In: **Large Dairy Herd Management**, 3rd Ed. pp.489-502, 2017.
- SCALIANTE JÚNIOR, J.R.; FRANCO, M.M.; GUSSON, A.C.; SILVA, B.D.M. Dinâmica do fluxo sanguíneo folicular em vacas Nelore submetidas a protocolos de IATF. In: 1^o Encontro Internacional de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Crise: tecnologias para a superação de desafios no setor agrário. 2016 **Anais...Unesp**, Campus Dracena, Dracena- SP, 2016.
- SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of corpus luteum function in cattle – a review. **Reproduction in Domestic Animals**, v.39, n.4, p.241-251, 2004.
- SIDDIQUI, M.A.R.; ALMAMUN, M.; GINTHER, O.J. Blood flow in the wall of the preovulatory follicle and its relationship to pregnancy establishment in heifers. **Animal Reproduction Science**, v.113, n.1, p.287-292, 2009a.
- SIDDIQUI, M.A.R.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; ALMAMUN, M.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Relationship of vascular perfusion of the wall of the preovulatory follicle to in vitro fertilization and embryo development in heifers. **Reproduction**, v.137, n.4, p.689-697, 2009b.
- SIQUEIRA, L.G.B.; AREAS, V.S.; GHETTI, A.M.; FONSECA, J.F.; PALHAO, M.P.; FERNANDES, C.A.C.; VIANA, J.H.M. Color Doppler flow imaging for the early detection of nonpregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. **Journal of Dairy Science**, v.96, n.10, p.1-12, 2013.
- SIQUEIRA, L.G.B.; TORRES, C.A.A.; AMORIM, L.S.; SOUZA, E.D.; CAMARGO, L.S. A.; FERNANDES, C.A.; VIANA, J.H.M. Interrelationships among morphology, echotexture, and function of the bovine corpus luteum during the estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v.115, n.1-4, p.18-28, 2009.

- SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian Follicular Dynamics during the Estrous Cycle in Heifers Monitored by Real-Time Ultrasonography. **Biology of Reproduction**, v.39, n.2, p.308-317, 1988.
- STANY, M.P.; HAMILTON, C.A. Benign disorders of the ovary. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v.35, n.2, p.271-284, 2008.
- STOUFFER, R. Structure, function, and regulation of the corpus luteum. In: **Knobil and Neill's physiology of reproduction**. Elsevier Inc., 2006.
- SUH, D.Y.; HUNT, T.K.; SPENCER, E.M. Insulin-like growth factor-I reverses the impairment of wound healing induced by corticosteroids in rats. **Endocrinology**, v.131, n.5, p.2399-2403, 1992.
- RUBENS, D.; BHATT, S.; NEDELKA, S.; CULLINAN, J. Doppler Artifacts and Pitfalls, **Radiologic Clinics of North America**, v.44, p. 805-835, 2006.
- TARSO, S.G.S.; APGAR, G.A.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E. Relationships between follicle and corpus luteum diameter, blood flow, and progesterone production in beef cows and heifers: preliminary results. **Animal Reproduction**, v.13, n.2, p.81-92, 2016.
- UTT, M.D.; JOHNSON, G.L.; BEAL, W.E. The evaluation of corpus luteum blood flow using color-flow Doppler ultrasound for early pregnancy diagnosis in bovine embryo recipients. **Theriogenology**, v.71, n.4, p.707-715, 2009.
- VARUGHESE, E.E.; BRAR, P.S.; GHUMAN, S.S. Vascularization to preovulatory follicle and corpus luteum-a valuable predictor of fertility in dairy cows. **Theriogenology**, v.103, p.59-68, 2017.
- VARUGHESE, E.E.; BRAR, P.S.; HONPARKHE, M.; GHUMAN, S.P.S. Correlation of blood flow of the preovulatory follicle to its diameter and endocrine profile in dairy buffalo. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, n.1, p.140-144, 2014.
- VASCONCELOS, J.L.M.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H.N.; GUENTHER, J.G.; WILTBANK, M.C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v.56, n.2, p.307-314, 2001.
- VASCONCELOS, J.L.M.; SÁ FILHO, O.G.; COOKE, R.F. Impacts of reproductive technologies on beef production in South America. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.752, p.161–180, 2014.
- VIANA, J.H.M.; ARASHIRO, E.K.N.; SIQUEIRA, L.G.B.; GHETTI, A.M.; AREAS, V.S.; GUIMARÃES, C.R.B.; PALHAO, M.P.; CAMARGO, L.S.A.; FERNANDES, L.S.A. Doppler ultrasonography as a tool for ovarian management. **Animal Reproduction**, v.10, n.3, p.215-222, 2013.

WAGENMAKER, E.R.; MOENTER, S.M. Exposure to acute psychosocial stress disrupts the luteinizing hormone surge independent of estrous cycle alterations in female mice. **Endocrinology**, v.158, n.8, p.2593-2602, 2017.

WALUSIMBI, S.S.; PATE, J.L. Luteal cells from functional and regressing bovine corpora lutea differentially alter the function of gamma delta T cells. **Biology of Reproduction**, v.90, n.6, p. 1-10, 2014.

WEBB, R.; ARMSTRONG, D.G. Control of ovarian function; effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. **Livestock Production Science**, v.53, n.2, p.95-112, 1998.

WILLIAMS, C.Y.; HARRIS, T.G.; BATTAGLIA, D.F.; VIGUIÉ, C.; KARSCH, F.J. Endotoxin inhibits pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone. **Endocrinology**, v.142, n.5, p.1915-1922, 2001.

ZERON, Y.; OCHERETNY, A.; KEDAR, O.; BOROCHOV, A.; SKLAN, D.; ARAV, A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles., **Reproduction**, v.121, n.3, p.447-454, 2001.

3. CAPÍTULO I

EFEITO DO TEMPERAMENTO SOBRE A PERFUSÃO VASCULAR DO FOLÍCULO DOMINANTE E DO CORPO LÚTEO E SOBRE A TAXA DE CONCEPÇÃO DE VACAS NELORES.

3.1 Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do temperamento sobre a perfusão vascular do folículo pré-ovulatório e do corpo lúteo de vacas Nelores submetidas à IATF assim como sobre a produção de progesterona e a taxa de concepção. Para tanto, 201 fêmeas foram submetidas à sincronização da ovulação e, no momento da IA, foram realizadas avaliações da reatividade por meio do escore de brete e velocidade de saída do tronco. De acordo com os escores individuais, os animais foram divididos em temperamento adequado (ADQ) ou excitável (EXC). Amostras de sangue também foram coletadas para dosagem de cortisol e progesterona. As avaliações ultrassonográficas por Doppler colorido foram realizadas para determinar o diâmetro, volume e a vascularização do folículo pré-ovulatório (FPO) e do corpo lúteo (CL) no momento da IA e sete dias (D7) após, respectivamente. As taxas de sincronização, ovulação e de concepção foram comparadas entre os grupos ADQ e EXC pelo teste de qui-quadrado enquanto concentrações hormonais e variáveis ultrassonográficas foram comparadas por um modelo linear geral. As comparações múltiplas entre os grupos foram conduzidas usando contrastes de Tukey. Os dados foram expressos em média e desvio padrão. As variáveis número de pixels do FPO no momento da IA ($p=0,01$), intensidade dos pixels na parede do folículo ($p=0,01$), diâmetro ($p=0,02$) e volume ($p=0,01$) do folículo pré-ovulatório no momento da IA foram todas menores para o grupo de fêmeas do grupo EXC, enquanto as concentrações de cortisol foram maiores no grupo de vacas excitáveis em relação às adequadas ($30,22\pm 25,45$ vs $16,99\pm 17,33$, respectivamente) o que foi relacionado ao estresse durante o manejo da IATF. O número e a intensidade dos pixels do CL no dia 7 após a IA não apresentou diferença entre os grupos, enquanto o diâmetro e volume também foram menores ($p=0,01$) para o grupo EXC. Não foi observada diferença entre os grupos para as taxas de sincronização, ovulação e de concepção assim como para a concentração de progesterona. A partir dos resultados é possível concluir que vacas Nelore de temperamento excitável apresentam maiores concentrações de cortisol durante a IATF, que podem ter efeitos endócrinos importantes e refletem nas estruturas ovarianas, com menor fluxo sanguíneo folicular e redução no tamanho do folículo e corpo lúteo sem, no entanto, comprometer a fertilidade, diante disso supõe-se que a utilização do eCG nos protocolos de IATF seria uma estratégia que poderia mitigar os efeitos negativos do estresse na reprodução, contribuindo para o aporte gonadotrófico.

Palavra-chaves: estresse, Doppler colorido, prenhez.

3.2 Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of temperament on the vascular perfusion of the preovulatory follicle (POF) and corpus luteum (CL) of Nelore cows submitted to TAI as well as on progesterone (P4) production and conception rate. For this purpose, 201 females were submitted to ovulation synchronization and, at the time of AI, reactivity assessments were carried out using the chute score and exit speed. According to the individual scores, the animals were classified into adequate temperament (ADQ) and excitable (EXC). Blood samples were also collected to measure cortisol and P4. Color Doppler ultrasound assessments were performed to determine the diameter, volume, and vascularization of the POF and CL at the time of AI and seven days (D7) after, respectively. The synchronization, ovulation and conception rates were compared between the ADQ and EXC groups using the chi-square test while hormonal concentrations and ultrasound variables were compared using a general linear model. Multiple comparisons between groups were conducted using Tukey's contrasts. The data were expressed as means and standard deviations. The variables number of pixels of the POF at the moment of AI ($p = 0.01$), intensity of pixels on the follicle wall ($p = 0.01$), diameter ($p = 0.02$) and volume ($p = 0.01$) of the pre-ovulatory follicle at the time of AI were all lower for the group of females in the EXC group, while cortisol concentrations were higher in the group of excitable cows in relation to adequate ones (30.22 ± 25.45 vs 16.99 ± 17.33 , respectively) which was related to stress during the management of IATF. The number and intensity of the pixels of the CL on day 7 after the AI showed no difference between the groups, while the diameter and volume were also lower ($p = 0.01$) for the EXC group. There was no difference between groups for synchronization, ovulation and conception rates as well as for progesterone concentration. From the results it is possible to conclude that Nelore cows with an excitable temperament have higher concentrations of cortisol during IATF, which can have important endocrine effects and reflect on ovarian structures, with less follicular blood flow and reduction in the size of the follicle and corpus luteum without, however, compromising fertility, given that it is assumed that the use of eCG in IATF protocols would be a strategy that could mitigate the negative effects of stress on reproduction, contributing to the gonadotrophic support.

Key words: stress, color Doppler, pregnancy.

3.3 Introdução

A alta reatividade é um traço evolutivo adaptativo em ungulados, embora seja uma característica negativa do ponto de vista produtivo, uma vez que o medo os motivava a ficar em constante vigilância para escapar de predadores (GRANDIN, 2014). Entretanto, existe uma variação significativa na maneira como os indivíduos se comportam e respondem ao seu ambiente, com implicações importantes no bem-estar e na produção (HEDLUND; LØVLIE, 2015). A resposta ao estresse depende da reação do animal frente a estas condições que afetam seu bem-estar. Desta forma, alguns bovinos apresentam temperamento excitável

quando expostos ao manejo humano, o que pode ser atribuído ao medo e à incapacidade de lidar com tais situações. Esses animais são então classificados como reativos ou estressados e suas reações ao estresse geram alterações fisiológicas que influenciam aspectos como crescimento, saúde e reprodução (COOKE, 2011). Assim, estresse pode ser definido como a incapacidade de um animal para lidar com o seu ambiente, fracassando em alcançar o potencial genético (DOBSON; SMITH, 2000).

O temperamento do animal é definido pelo comportamento em resposta ao manejo humano (BURROW, 1997). Este tornou-se um importante assunto no Brasil, particularmente devido a predominância de rebanhos zebuínos e seus cruzamentos (SANT'ANNA; COSTA, 2013) e o fato desses apresentarem mais frequentemente comportamento excitável (FORDYCE et al., 1988) sendo mais sensíveis ao manejo quando comparado aos *Bos taurus taurus* (VOISINET et al., 1997). A forma de criação extensiva é outro fator que contribui para a maior reatividade destes animais (COOKE, 2011). Os animais *Bos taurus indicus* são largamente difundidos em regiões tropicais devido a sua capacidade de adaptação, com significativa contribuição em rebanhos de leite e de corte (BÓ et al., 2003). A seleção por temperamento em rebanhos de corte visa muitas vezes reduzir o risco de acidentes (COOKE, 2011). Porém, estudos demonstram que o temperamento aversivo prejudica a reprodução (COOKE et al., 2012), a qualidade da carne (KING et al., 2006), o ganho de peso (VOISINET et al., 1997), a taxa de parição, a taxa de desmame e peso do bezerro desmamado/vaca (COOKE et al., 2012), além de aumentar a suscetibilidade a doenças (HULBERT et al., 2011).

Embora seja bem estabelecido que o estresse prejudica a reprodução, não se sabe com precisão por meio de qual mecanismo ele atua. Acredita-se que os fatores estressores agem no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, estimulando a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), o qual estimula as glândulas adrenais a secretarem glicocorticoides. Esses hormônios afetariam a liberação de gonadotrofinas pelo hipotálamo e/ou hipófise. Estudos tem investigado o envolvimento do estresse na síndrome de repetição de cio em bovinos. A estimulação adrenal, associada ao estresse, resultaria no aumento da progesterona durante o estro, prolongando o crescimento folicular e causando ovulação tardia que afeta negativamente a fertilização (GORDON, 2004). As ligações fisiológicas entre o

temperamento e a função reprodutiva precisam ser melhor analisadas (COOKE; BOHNERT, 2011).

Embora estudos tenham sido conduzidos com intuito de avaliar o efeito do estresse no eixo hipotalâmico hipofisário gonadal sob uma perspectiva endócrina, nenhum destes se ateuve aos seus efeitos na vascularização das estruturas ovarianas, que apresentam também relação com os hormônios sexuais hipofisários e gonadais. Acosta et al. (2003) associaram a vascularização da parede folicular ao aumento do estradiol e ao pico de LH. Segundo Dobson e Smith (2000), a redução na secreção endógena de GnRH/LH, em última análise, priva o folículo ovariano do suporte adequado de gonadotrofina, levando à redução da produção de estradiol pelos folículos que crescem mais lentamente, havendo assim interferência por estressores também no ovário. Em função do ovário apresentar inervação simpática (BURDEN et al., 1983; GERENDAI et al., 2000) e ser susceptível e regulado também pelos hormônios hipotalâmico-hipofisários (CHRISTENSEN et al., 2012), acredita-se que a perfusão vascular do folículo e do corpo lúteo também possam sofrer perturbações em função das alterações decorrentes do estresse, com redução do suprimento de gonadotrofinas, nutrientes e substratos hormonais e outros componentes sanguíneos necessários para a ovulação. Adicionalmente, acredita-se que haja comprometimento da qualidade do oócito bem como do corpo lúteo formado, cuja vascularização, segundo Lüttgenau e Bollwein (2014), desempenha um papel decisivo na funcionalidade e produção de progesterona.

Os animais domésticos são frequentemente expostos a vários agentes estressores, como calor, frio, manejo, transporte, temperamento, introdução em novos lotes, parasitas e doenças (GEBREGEZIABHEAR; AMEHA, 2015). A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) exige constante manejo e contenção dos animais para aplicações hormonais e realização da inseminação, tornando esta biotécnica um fator de estresse agudo.

Embora seja percebida a redução da performance reprodutiva de animais de temperamento reativos ou excitável, muitas questões importantes da consequência do temperamento na reprodução permanecem desconhecidas. Diante disso a hipótese do presente estudo é que o estresse apresenta efeitos sistêmicos que interferem no fluxo sanguíneo ovariano diminuindo a perfusão vascular do folículo dominante e do corpo lúteo e, conseqüentemente, reduzindo a taxa de concepção. Portanto, objetivou-se estudar o efeito do

temperamento sobre a perfusão vascular do folículo e do corpo lúteo e sobre a fertilidade de vacas Nelores submetidas à IATF.

3.4 Material e Métodos

O presente estudo foi aprovado na COMISSÃO DE ETICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/IZ/UFRRJ, – processo no 23083.008085/2018-34.

3.4.1 Local do experimento, animais e manejo

O presente estudo foi desenvolvido em fazenda comercial de gado de corte localizada em Paraibuna-SP. Duzentas e uma fêmeas Nelore, não gestantes, com escore de condição corporal (ECC) médio de $2,83 \pm 0,53$ (escala de um a cinco, considerado o 1 caquético e o 5 obeso) e entre 45 e 120 dias de pós-parto foram submetidas ao exame ginecológico para constatar possíveis alterações, selecionando somente animais sadios e ainda sem anomalias no trato reprodutivo (infecção uterina, cérvix tortuosa ou fibrosada, etc).

Os animais eram criados em regime extensivo com pastagem de *Brachiaria brizantha*, água e sal mineral *ad libitum* e divididos em lotes com média de 30 animais. A propriedade dispõe de um curral com cinco divisões para separação dos animais, além de um galpão coberto onde é abrigado o brete, tronco de contenção e o apartadouro.

Os animais eram conduzidos de maneira tranquila e gentil ao curral por dois profissionais montados a cavalo. Neste local, aguardavam até o momento do manejo realizado no interior do tronco de contenção. No tronco de contenção o comportamento do animal foi avaliado assim como foram realizadas a aplicação dos hormônios, a inseminação artificial, a avaliação ultrassonográfica transretal e a coleta de sangue de acordo com o momento do experimento. Os animais foram conduzidos em grupos pequenos para o interior da seringa para entrarem em fila no brete e em seguida foram contidos individualmente no tronco, sendo que a entrada ocorreu de maneira aleatória. Após realizado o manejo, os animais foram apartados separadamente no curral onde aguardaram até que todo o lote fosse manejado e posteriormente conduzidos novamente ao pasto. Todos animais foram submetidos ao mesmo manejo e todas as avaliações foram concentradas para finalizar todo o lote em no máximo quatro horas de trabalho, para que não houvesse diferenças significativas no tempo de espera no curral.

3.4.2 Sincronização da ovulação e IATF

As fêmeas foram sincronizadas por meio de protocolo hormonal baseado em Pugliesi et al. (2019), no qual em dia aleatório do ciclo estral (início do tratamento; denominado D-10), inseriu-se um dispositivo intravaginal de progesterona novo de 1g, associado à aplicação de 2,0 mg de benzoato de estradiol, por via intramuscular. O dispositivo foi mantido por oito dias e, na sua retirada (D-2), aplicou-se 0.53 mg de cloprostenol sódico + 300UI de gonadotrofina coriônica equina + 1,0mg de cipionato de estradiol, todos por via intramuscular. Após 48 horas da retirada do dispositivo, realizou-se a Inseminação Artificial em Tempo Fixo, sendo esse considerado o D0 (Figura 3).

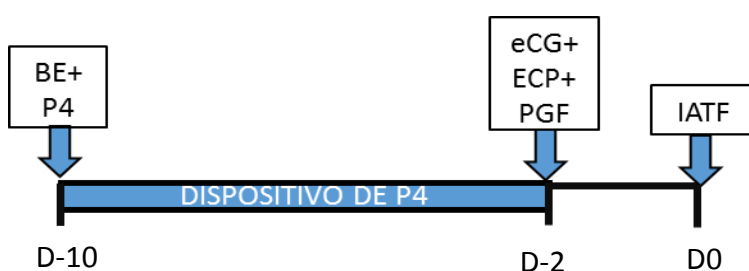


Figura 3. Protocolo de sincronização da ovulação adotado.

Ao final do protocolo, foi calculada a taxa de sincronização, determinada pelo número de fêmeas apresentando folículo dominante no momento da IA dividido pelo total de fêmeas protocoladas. Também foi estimada a taxa de ovulação dos animais tratados, determinada pela divisão do número de fêmeas apresentando CL sete dias após a IA pelo total de animais protocolados.

3.4.3 Avaliação ultrassonográfica do folículo e do corpo lúteo

A avaliação ultrassonográfica dos ovários foi realizada por via transretal com auxílio de um Ultrassom Doppler Mindray, modelo Z5VET, equipado com transdutor linear 75L50EAV e emissão de onda de 5,0/7,5 Mhz padronizando o ganho total em 70%. As imagens dos folículos e corpos lúteos foram realizadas em modo B para determinação das posições e mensuração do diâmetro médio destas estruturas, calculado pela média das duas maiores medidas transversais, perpendiculares entre si, além de outra medida para cálculo do volume. As avaliações do folículo e do corpo lúteo foram realizadas, respectivamente, no dia

da inseminação (D0) e sete dias após (D7), sempre pelo mesmo técnico. Para cálculo do diâmetro e do volume do CL, descontou-se o diâmetro e volume de eventual cavidade que poderia estar presente (corpos lúteos cavitários).

Durante a avaliação no modo de fluxo colorido, as configurações de imagem do ultrassom foram fixadas e padronizadas, permanecendo constante para todos os exames. A frequência do transdutor foi fixada em 6,6 MHz, frequência de repetição de pulso:1 KHz; e posição de foco:1 (SIQUEIRA et al., 2013).

O folículo pré-ovulatório e o CL foram avaliados em momentos diferentes do experimento, porém em ambos, após a avaliação morfológica em modo B, ativou-se o modo de fluxo colorido para mapeamento do fluxo sanguíneo e gravação das imagens no próprio aparelho. As imagens capturadas com a função Doppler acionadas foram gravadas em formato de vídeo AVI e armazenadas em um disco magnético para posterior análise. Os vídeos foram analisados selecionando e congelando três imagens, com intuito de obter uma média das variáveis, onde mostrava o folículo ou CL com seu maior diâmetro e a maior quantidade de fluxo sanguíneo. Posteriormente, as imagens capturadas foram editadas e submetidas a análise do software Image J para quantificar o número de pixels coloridos presentes (GINTHER, 2007). Além disso, os pixels foram quantificados de acordo com a intensidade, utilizando o código numérico de cada cor multiplicado pelo número de pixel dessa, com o auxílio do Image J. Sabendo que as cores mais claras apresentam maior código e estão relacionadas a maior intensidade.

3.4.4 Avaliação do temperamento

O temperamento foi avaliado no dia da Inseminação Artificial (D0), por um mesmo técnico, empregando metodologias cujas características não alterassem a rotina do manejo. A avaliação da reatividade foi realizada, por meio de observações visuais, durante os primeiros seis segundos da permanência do animal no brete de contenção, imediatamente antes da realização da IA.

A metodologia empregada foi adaptada de Cooke (2014). O escore composto de reatividade foi baseado em uma escala crescente de quatro escores, sendo: 1 = Pouco ou nenhum deslocamento, permanecendo na mesma posição a maior parte do tempo, encostado na parte da frente ou de trás do brete, movimentos ocasionais e relaxados da cauda; 2=

Animal geralmente calmo, mas não permanecendo na mesma posição por muito tempo, movimentos de cauda ocasionais e vigorosos; 3 = Deslocamento frequente, movimentos contínuos e vigorosos, movimentos frequentes e vigorosos da cauda; 4= Deslocamento contínuo, movimentos vigorosos e abruptos, tentativa e/ou sucesso em se virar ou deitar, ocorrência de saltos, forçar a grade de saída com a cabeça tentando se livrar da guilhotina, movimentos frequentes e vigorosos da cauda.

Além da avaliação descrita acima, relacionada ao comportamento no brete, foi utilizada a avaliação de escore de saída do brete de acordo com Jimenez Filho et al. (2012). Nesta última, pontuou-se o escore em 1 = animal não sai do brete, precisa ser tocado, 2 = animal sai andando, 3 = animal sai trotando e 4 = animal sai correndo ou pulando.

O escore final de temperamento dos animais foi determinado calculando a média da pontuação do escore de brete com a pontuação do escore de saída de acordo com Cooke et al. (2017). Posteriormente, de acordo com a pontuação média obtida, os animais foram classificados como de temperamento adequado (ADQ = pontuação média \leq 2) temperamento excitável (EXC = pontuação média $>$ 2).

3.4.5 Dosagem de cortisol sérico

No momento da avaliação ultrassonográfica do folículo pré-ovulatório, momentos antes de realizar a inseminação artificial, foram coletadas amostras de sangue, mediante punção da veia coccígea com auxílio de adaptador e agulhas de ponta dupla acoplados ao tubo de coleta a vácuo de 10mL sem aditivos para a dosagem do cortisol plasmático. As amostras de sangue foram centrifugadas por 15 minutos a 480G e mantidas em refrigeração a -20°C até a análise. As concentrações de cortisol foram determinadas no Laboratório de Dosagem Hormonal da Faculdade de Veterinária da UFF pela técnica de radioimunoensaio em fase sólida, utilizando kits comerciais (ImmuChem, MP Biomedicals, Santa Ana, Califórnia, EUA). O coeficiente intra-ensaio foi de 10%. Todos os dados estavam dentro do ponto máximo e mínimo da curva.

3.4.6 Dosagem de progesterona sérica

No momento da avaliação ultrassonográfica do corpo lúteo, no sétimo dia após a inseminação artificial, foram coletadas amostras de sangue por meio de venopunção da veia

ou artéria coccígea, com auxílio de adaptador e agulhas de ponta dupla acoplados ao tubo de coleta a vácuo sem anticoagulante para determinação da concentração de progesterona. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 480G sendo o soro mantido em refrigeração a -20°C até a análise. As concentrações séricas de P4 foram determinadas no Laboratório de Dosagem Hormonal da Faculdade de Veterinária da UFF pela técnica de radioimunoensaio em fase sólida, utilizando kits comerciais (ImmuChem, MP Biomedicals, Santa Ana, Califórnia, EUA). A sensibilidade e o coeficiente intra-ensaio foram de 0,05ng/ml e 11%, respectivamente. Todos os dados estavam dentro do ponto máximo e mínimo da curva.

3.4.7 Diagnóstico de gestação

Das 201 vacas utilizadas no experimento, apenas cento e uma foram submetidas ao diagnóstico de gestação aos 30 dias, sendo que as demais receberam outros tratamentos que poderiam interferir na taxa de concepção por isso esses dados não foram utilizados (observação: estavam sendo desenvolvidos dois projetos de pesquisa simultaneamente).

O diagnóstico de gestação foi realizado aos 30 dias após a inseminação utilizando a ultrassonografia transretal (transdutor linear; 7,5MHz). A confirmação da prenhez foi baseada na visualização da vesícula embrionária com a presença de embrião viável (presença de batimento cardíaco).

3.4.8 Análise estatística

No processo de análise os dados foram ajustados até chegar ao modelo de melhor ajuste para as variáveis testadas, desta forma animais que apresentaram dados discrepantes foram excluídos, pois a presença destes poderia afetar interpretação do resultado. Esses outliers, caracterizados como pontos que possuem valor variável de resultado extremo, observações cujos resíduos padronizados foram maiores que 3 em valor absoluto são possíveis discrepantes (JAMES et al., 2014). Assim, os dados de alguns animais foram removidos em determinadas análises, explicando o menor número de animais em alguns resultados.

As análises estatísticas foram realizadas pelo software R. v. 3.6.1 (R Core Team, 2019). Para analisar as diferenças entre os tratamentos em cada variável resposta, foi implementado um modelo linear geral (função *glm* do pacote stats) com diferentes estruturas

de erro (gaussian ou gamma) e função de link (identidade). A estrutura de erro foi avaliada com o uso da função *descdist* do pacote *fitdistrplus* (DELIGNETTE-MULLER; DUTANG 2015).

As concentrações de cortisol e progesterona foram analisadas após uma transformação para escala raiz quadrada. Para apresentar os resultados, os dados foram retornados à condição original. As comparações múltiplas entre os tratamentos foram conduzidas usando contrastes de Tukey por meio da função *emmeans* do pacote *emmeans* (RUSSELL LENTH, 2019). Os dados foram expressos em média e desvio padrão salvo indicação em contrário. Os resultados de sincronização, ovulação e concepção foram comparados pelo teste de qui-quadrado com nível de significância de 5%.

3.5 Resultados e Discussão

Embora muitas pesquisas tenham investigado as consequências negativas do estresse e do temperamento no desempenho reprodutivo de animais e humanos (MAZIEIRO et al., 2011; COOKE et al., 2012; RALPH et al., 2016; COOKE et al., 2017; LUCY, 2019), trabalhos focados nas alterações das estruturas morfofuncionais ovarianas são limitados, inexistindo algum que tenha realizado a ultrassonografia Doppler nestes tecidos em animais de temperamento excitável.

A proporção de animais apresentando temperamento adequado foi de 72,6% (146/201) e excitável foi de 27,4% (55/201). Essa menor proporção de animais excitáveis é esperada, conforme já relatado por Cooke et al. (2017) que classificaram 28% dos animais como excitáveis em estudo com fêmeas *Bos taurus indicus*. Embora Matsunaga (2002) tenha reportado que apenas 10% dos animais são classificados como excitáveis em rebanhos de gado Nelore no Brasil. Essa discrepância pode ser atribuída a vários fatores, incluindo número de animais avaliados, diferenças na população bovina e nos sistemas de produção nos diferentes experimentos, bem como nos critérios de avaliação do temperamento.

A Tabela 1 compara os valores relacionados às avaliações ultrassonográficas do folículo dominante e do corpo lúteo, além das concentrações de cortisol e de progesterona, entre vacas com temperamento adequado e excitável.

Tabela 1. Parâmetros relacionados ao folículo pré-ovulatório e ao corpo lúteo e concentração de cortisol e progesterona de vacas com temperamento adequado e excitável.

Parâmetros	TEMPERAMENTO	
	ADEQUADO	EXCITÁVEL
Número de pixels coloridos – FL	504,70±307,42 ^a	385,74±247,46 ^b
Intensidade de pixel* - FL	56831,34±35000,73 ^a	28842,14±6993,33 ^b
Diâmetro FL (cm)	1,34±0,24 ^a	1,24±0,26 ^b
Volume FL (cm)	1,41±0,84 ^a	1,11±0,6 ^b
Número de pixels coloridos - CL D7	2396,97±1078,93 ^a	2382,22±984,07 ^a
Intensidade de pixel* - CL D7	268722,94±126415,31 ^a	273175,75±111550,76 ^a
Diâmetro CL D7 (cm)	2,01±0,29 ^a	1,88 ±0,27 ^b
Volume CL D7 (cm ³)	4,17±2,02 ^a	3,46±1,90 ^b
Concentração P4 D7 (ng/ml)	1,88±1,28 ^a	2,09±1,09 ^a
Concentração CORT (ng/ml)	16,99±17,33 ^a	30,22±25.45 ^b

FL = folículo, CL = corpo lúteo, D7 = dia 7 após a ovulação, P4 = progesterona, CORT = cortisol. Valores com letras sobrescritas iguais não apresentam diferença estatística. *A intensidade é um valor numérico obtido a partir do código numérico de cada cor multiplicado pelo número de pixel dessa, não possuindo unidade específica de medida.

Foi observada diferença entre os grupos ADQ e EXC para número de pixels do folículo no momento da IA (p=0,01), intensidade dos pixels na parede do folículo (p=0,01), diâmetro (p=0,02) e volume (p=0,01) do folículo pré-ovulatório no momento da IA, com todas as variáveis menores para o grupo de fêmeas de temperamento excitável. Não foi observada diferença estatística para número de pixel (p=0,95) e intensidade (p=0,79) do CL no dia 7 após a IA entre os dois grupos (ADQ e EXC). Por outro lado, foi observada diferença significativa para diâmetro e volume, ambas significativamente menores (p=0,01) para o grupo EXC em relação ao ADQ.

O número de pixels na parede dos folículos pré-ovulatórios foi menor em animais excitáveis no presente estudo, evidenciando uma redução da perfusão vascular, situação compatível com os efeitos do estresse já relatados no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal em estudo anterior (GORDON, 2004). Tal situação pode estar associada ao estresse resultante da dificuldade dos animais em lidarem com o manejo, visto que estudos mais antigos já sugeriram a existência de atividade adrenérgica vasoconstritora no ovário (VARGA et al. 1979; SELSTAM et al., 1985; MASSA et al., 1994). Em estudo mais recente com ratos. Uchida e Kagitani (2015) observaram que a estimulação de nervos simpáticos no ovário induziu a vasoconstrição nas arteríolas ovarianas reduzindo o suprimento sanguíneo e

inibindo a secreção de estradiol pelo folículo. Secundariamente, segundo Grazul-Bliska et al. (2007), o suprimento vascular do folículo apresenta correlação positiva com a atividade esteroidogênica, a qual pode também ter sido reduzida em animais excitáveis. E consequentemente, o pico de GnRH-LH pode ser comprometido, visto que, segundo Dobson et al. (2003), em condições normais o estradiol ovariano seria o estímulo inicial responsável pela ocorrência deste pico.

Seis horas antes da ovulação, ocorre aumento nos sinais de fluxo na parede do folículo e, segundo Acosta et al. (2003), este fato está associado ao aumento temporário do estradiol. O que reforça a tese que em animais excitáveis a estimulação simpática pode comprometer a produção de estradiol pelo folículo e, consequentemente, o fluxo sanguíneo folicular. Lucy (2019) também afirma que o cortisol pode diminuir a responsividade dos folículos ovarianos ao LH. Além disso, glicocorticoides liberados em situação de estresse, segundo Chrousos et al. (1998), suprimem o LH da hipófise e as secreções de estrógeno e progesterona no ovário, além de tornar os tecidos alvos resistentes ao estrógeno.

No presente estudo, o folículo pré-ovulatório foi avaliado somente no momento da IA, portanto, o menor número de pixels na parede do folículo dos animais do grupo EXC pode ser associado também à distância da ovulação neste momento, visto que, segundo Varughese et al. (2017), os aumentos significativos dos pixels na parede folículo estariam associados a proximidade da ovulação em vacas. Este atraso pode ser consequência do estresse, pois de acordo com Dobson e Smith (2000), a redução na secreção endógena de GnRH/LH, priva o folículo ovariano do suporte adequado de gonadotrofina, levando à redução da produção de estradiol e, consequentemente, de seu crescimento.

Uchida e Kagitani (2015) ainda propuseram que a ativação reflexa dos nervos simpáticos do ovário pode estar envolvida na inibição rápida e direta da função ovariana em emergências. Essa regulação pode ser uma importante adaptação na função reprodutiva da fêmea tanto ao ambiente interno quanto ao externo e está associada a regulação de longa ação, promovida pelo eixo hipotálamo- hipófise.

Associada ao menor número de pixels na parede do folículo, a intensidade destes também apresentou valores menores em vacas do grupo EXC. A intensidade, segundo Varughese et al. (2017), está relacionada a velocidade do fluxo presente na parede do folículo ou do corpo lúteo. Quando o transdutor é posicionado sobre o folículo ou corpo lúteo, os

pontos coloridos de fluxo capturados são codificados em diferentes intensidades de cores no monitor e quanto mais claras as cores, mais intenso é o fluxo (GINTHER, 2007). Varughese et al. (2017) analisaram esta questão de forma qualitativa por meio de análises visuais para avaliar também a turbulência do fluxo do corpo lúteo, a qual foi correlacionada com a ocorrência de luteólise, o mesmo não foi constatado no presente estudo e não houve diferença entre a intensidade de fluxo do CL de animais EXC e ADQ.

Porém, o programa Image J, utilizado para a contagem dos pixels, também codifica numericamente cada cor de pixel, e quanto mais clara a cor, maior o número que a representa. Isso permite quantificar a intensidade do fluxo, multiplicando os números de pixels de cada cor pelo código numérico que a representa, assim obtém-se um produto numérico que representa quantitativamente a intensidade do fluxo. Fluxos mais intensos apresentam maior número de pixels de cores claras (MANNION, 2008), com códigos numéricos maiores que resultam em um produto numérico (intensidade) maior. Quanto maior a intensidade, maior o produto numérico encontrado e maior a velocidade do fluxo, o inverso também é verdadeiro. Tal análise permite avaliar de maneira objetiva a intensidade do fluxo sanguíneo folicular e luteal.

O menor tamanho (diâmetro e volume) do folículo dominante encontrado em animais do grupo EXC pode ser resultado da menor vascularização presente nessas estruturas, além do menor suporte gonadotrófico e capacidade esteroidogênica, conforme citado anteriormente. Basset (1943) demonstrou que o desenvolvimento vascular é primordial para o crescimento e seleção dos folículos ovulatórios, bem como para a formação e função do corpo lúteo. Segundo Tarso et al. (2016), a perfusão vascular em bovinos está intimamente relacionada ao aumento do diâmetro do folículo, ao tamanho do folículo pré-ovulatório e também, segundo Sirois; Fortune (1988), à proximidade da ovulação.

O fato dos animais pertencentes ao grupo EXC apresentarem folículos menores pode ter contribuído para que esses apresentassem um corpo lúteo menor após a ovulação, assim como foi constatado por Vasconcelos et al. (2001 e 2013), os quais observaram que a redução no tamanho do folículo pré-ovulatório resultou em diminuição no tamanho do corpo lúteo subsequente, assim como em menores concentrações de progesterona e menores taxas de gestação, fato que não foi observado no presente estudo.

Embora a vascularização do folículo pré-ovulatório tenha sido menor em animais EXC, o temperamento não influenciou a vascularização dos CLs, que foram semelhantes para os dois grupos. Diferente dos resultados encontrados por Tarso et al. (2015) e Pinaffi et al. (2015), os quais mostraram que o tamanho e a vascularização do folículo estavam positivamente associados ao tamanho e a vascularização do corpo lúteo formado. Apesar disso, Herzog et al. (2010) afirmam que o fluxo sanguíneo luteal é o indicador mais apropriado da função luteal, sendo mais confiável do que o tamanho, apresentando forte correlação com a produção de progesterona durante cada fase do ciclo estral. Esta observação de Herzog et al. (2010) pode explicar o fato dos valores de progesterona encontrados no presente estudo não terem apresentado diferença estatística entre os grupos EXC e ADQ.

A concentração de progesterona no dia 7 após a IA não diferiu entre os grupos ($p=0,28$). No entanto, os valores de cortisol no dia da IA foram maiores ($p=0,01$) em vacas EXC.

A Tabela 2 apresenta as taxas de sincronização, de ovulação e de concepção dos grupos EXC e ADQ sendo que não foi observada diferença estatística para nenhuma destas variáveis entre animais excitáveis e adequados. A taxa de sincronização geral do protocolo adotado foi de 97% (195/201), enquanto para os grupos de animais EXC e ADQ foram de 98,18% (54/55) e 96,57% (141/146), respectivamente. Já a taxa de ovulação geral foi de 91,54% (184/201), enquanto para os grupos de animais EXC e ADQ foram, respectivamente, de 92,72% (51/55) e 91,78% (134/146). Por fim, a taxa de concepção total foi de 49,5% (50/101), sendo que para os grupos EXC e ADQ, essas taxas foram de 45,83% (11/24) e 50,64 % (39/77), respectivamente.

Tabela 2. Taxas de sincronização, de ovulação e de concepção dos animais com temperamento classificado como adequado (ADQ) e excitável (EXC). Todas variáveis foram submetidas ao teste qui-quadrado, não havendo diferença entre os grupos para estas variáveis ($p>0,05$).

VARIÁVEIS	TEMPERAMENTO		
	ADEQUADO	EXCITÁVEL	GERAL
Taxa de sincronização	96,57% ^a	98,18 ^a	97%
Taxa de ovulação	91,78% ^a	92,72 ^a	91,54%
Taxa de concepção	45,83% ^a	50,64 % ^a	49,5%

Valores com letras sobrescritas iguais não apresentam diferença estatística.

Embora Da Rosa e Wagner (1981) tenham observado que o estresse e a atividade adrenal prejudicaram a produção de progesterona pelo corpo lúteo em novilhas, no presente estudo as concentrações de progesterona não diferiram em função do temperamento. Maiores concentrações de progesterona também podem ocorrer, em função da participação de P4 oriunda da adrenal (COUBROUGH, 1985) e tal situação pode atrasar o declínio normal da progesterona durante o ciclo estral por interferir na luteólise e suprimir os pulsos de LH, o que levaria a um atraso na ovulação e formação do corpo lúteo subsequente (MIMOUNE et al., 2019). Cooke et al. (2009), trabalhando com aclimatação de novilhas *Bos taurus indicus* ao manejo, observaram um aumento de progesterona nos animais manejados, que foi associado a esteroidogênese adrenal.

As concentrações séricas basais de cortisol em bovinos, reportadas por Yoshida e Nakao (2005), variam entre 5 e 10ng/mL, valores menores às médias encontradas no presente estudo em ambos os grupos, o que permite concluir que o manejo ao qual foram submetidos os animais foi suficiente para causar estresse nesses, com maior intensidade nos animais excitáveis. . No entanto, de acordo com Maziero et al. (2011), os procedimentos realizados nos animais no brete (a coleta de sangue por venopunção e a palpação transretal) foram suficientes para desencadear estresse nas vacas.

A concentração plasmática média de cortisol foi significativamente maior ($p=0,01$) no grupo de animais excitáveis (EXC) em relação aos animais de temperamento adequado (ADQ), o que demonstra a relação entre o temperamento e o nível de estresse sofrido pelo animal, levando em consideração que o cortisol é um dos principais hormônios produzidos em resposta a estresse em mamíferos (COOKE, 2016). Este achado está em concordância com os estudos de Curley et al. (2008); Café et al. (2011); Cooke et al. (2017) e Cooke et al. (2019), os quais também encontraram maiores concentrações de cortisol plasmático em bovinos de temperamento reativo em relação aos de temperamento adequado. Adicionalmente, Cooke et al. (2012) constaram que o valor de cortisol aumentou à medida que a pontuação do escore de temperamento aumentou e diminuiu com o condicionamento dos animais ao manejo.

As taxas de sincronização e de ovulação (Figura 4) não foram afetadas no presente estudo, o que pode ter ocorrido em função do protocolo hormonal utilizado, eficiente em induzir a ovulação mesmo de folículos menores de animais excitáveis. De acordo com Gimenes et al. (2008), em novilhas *Bos taurus indicus* o folículo dominante alcançou

capacidade ovulatória entre 7,0 e 8,4 mm (média de 7,6 mm) de diâmetro. No presente estudo os folículos do grupo EXC apresentaram um diâmetro médio de 11,1mm, valor maior ao de 8,5mm que segundo Gimenes et al. (2008) apresentaram um significativo aumento na taxa de ovulação após este diâmetro. Este diâmetro médio de 11,1 mm encontrado em animais excitáveis no presente estudo foi similar ao que Sá Filho et al. (2010) definiram como crítico, ao observar que vacas *Bos taurus indicus* com folículos > 11,1mm apresentaram aumento da exibição de estro e taxa de gestação, possivelmente em função disso a taxa de gestação não foi afetada no grupo EXC bem como as concentrações de progesterona.

Além disso, o emprego de eCG (Gonadotrofina Coriônica Equina) no momento da retirada do dispositivo de P4, que pode ter ajudado no suporte gonadotrófico, na maturação final do folículo e na ovulação principalmente daqueles animais mais excitáveis, com maiores níveis de cortisol e menor aporte gonadotrófico. Diante disso, supõe-se que a utilização do eCG nos protocolos de IATF seria uma estratégia também para melhorar a eficiência reprodutiva de animais excitáveis, reduzindo os efeitos negativos do estresse na reprodução. Baruselli et al. (2004) e Bó et al. (2003) citam o eCG como uma alternativa que pode aumentar as taxas de concepção principalmente de animais em anestro. E de acordo com Thedy et al. (2018), seu uso em protocolos de sincronização da ovulação promoveu maior crescimento folicular entre a retirada do dispositivo e a IATF. Assim é importante destacar a necessidade de estudos que comprovem o efeito positivo do eCG também em animais de temperamento excitável.

Os resultados aqui expostos abrem caminho para mais estudos, com o objetivo de compreender mais especificamente de que maneira o temperamento excitável e o estresse interferem nas estruturas ovarianas e nas condições reprodutivas de fêmeas bovinas, permitindo extrapolar para outras espécies mamíferas, inclusive humanos. Necessitando saber se tais consequências teriam relações sistêmicas com o eixo hipotálamo hipófise gonadal, seriam somente em função da atividade simpática local ou seriam o resultado complexo de ambas circunstâncias.

3.6 Conclusões

Conclui-se que fêmeas Nelores de temperamento excitável apresentam menor fluxo sanguíneo folicular com redução no tamanho do folículo e do corpo lúteo subsequente.

Conclui-se também que, quando submetidas à IATF, a menor perfusão vascular do folículo dominante e seu menor tamanho em fêmeas excitáveis não foi suficiente para causar prejuízos à fertilidade (taxas de ovulação e de concepção).

3.7 Referências Bibliográficas

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, n.5, p.759–767, 2003.

BARUSELLI P.S.; REIS E.L.; CARVALHO, N.A.T.; CARVALHO, J.B.P. eCG increase ovulation rate and plasmatic progesterone concentration in Nellore (*Bos indicus*) heifers treated with progesterone releasing device. **Anais...** In: 15th International Congress on Animal Reproduction: ICAR, Porto Seguro, BA, Brasil, 2004.

BASSETT, D.L. The changes in the vascular pattern of the ovary of the albino rat during the estrous cycle. **American Journal of Anatomy**, v.73, n.2, p.251-291, 1943.

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

BURDEN, H.W.; LEONARD, M.; SMITH, C.P.; LAWRENCE JR, I.E. The sensory innervation of the ovary: a horseradish peroxidase study in the rat. **The Anatomical Record**, v.207, n.4, p.623-627, 1983.

BURROW, H.M. Measurements of temperament and their relationships with performance traits of beef cattle. **Animal Breeding Abstract**, v.65, n.7 p. 477-495, 1997.

CAFE, L.M.; ROBINSON, D.L.; FERGUSON, D.M.; GEESINK, G.H.; Greenwood, P.L. Temperament and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function are related and combine to affect growth, efficiency, carcass, and meat quality traits in Brahman steers. **Domestic Animal Endocrinology**, v.40, n.4, p.230-240, 2011.

CHRISTENSEN, A.; BENTLEY, G.E.; CABRERA, R.; ORTEGA, H.H.; PERFITO, N.; W.U., T.J.; MICEVYCH, P. Hormonal regulation of female reproduction. **Hormone and Metabolic Research**, v.44, p.587–591, 2012.

CHROUSOS, G. P.; TORPY, D. J.; GOLD, P. W. Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. **Annals of Internal Medicine**, v.129, n.3, p.229-240, 1998.

COOKE, R. Effects of temperament and animal handling on fertility, **Anais...**In: Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle - Northwest September 30, 2011.

COOKE, R.F. Temperament and acclimation to human handling influence growth, health, and reproductive responses in *Bos taurus* and *B. indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v.92, p.5325-5333, 2014.

COOKE, R.F. Impacts of temperament on reproductive performance of *Bos indicus* and *B. taurus* beef females. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 5, p. 561-562, 2016.

COOKE, R.F.; ARTHINGTON, J.D.; AUSTIN, B.R.; YELICH, J.V. Effects of acclimation to handling on performance, reproductive, and physiological responses of Brahman-crossbred heifers. **Journal of Animal Science**, v.87, n.10, p.3403-3412, 2009.

COOKE, R.F.; BOHNERT, D.W. Bovine acute-phase response following corticotrophin-release hormone challenge. **Journal of Animal Science**, v.89, p.252–257, 2011.

COOKE, R.F.; BOHNERT, D.W.; CAPPELLOZZA, B.I.; MUELLER, C.J.; DELCURTO, T. Effects of temperament and acclimation to handling on reproductive performance of *Bos taurus* beef females. **Journal of Animal Science**, v.90, n.10, p.3547-3555, 2012.

COOKE, R.F.; MORIEL, P.; CAPPELLOZZA, B.I.; MIRANDA, V.F.B.; BATISTA, L.F.D.; COLOMBO, E.A.; FERREIRA, V.S.M.; MIRANDA M.F.; MARQUES, R.S.; VASCONCELOS, J.L.M. Effects of temperament on growth, plasma cortisol concentrations and puberty attainment in Nelore beef heifers. **Animal**, v.13, n.6, p.1208-1213, 2019.

COOKE, R.F.; SCHUBACH, K.M.; MARQUES, R.S.; PERES, R.F.G.; SILVA, L.G.T.; CARVALHO, R.S.; CIPRIANO, R.S.; BOHNERT, D.W.; PIRES, A.V.; VASCONCELOS, J.L.M. Effects of temperament on physiological, productive, and reproductive responses in *Bos indicus* beef cows. **Journal of Animal Science**, v.95, n.1, p.1-8, 2017.

COUBROUGH, R.I. Stress and fertility. A review. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.52, p.153-156, 1985.

CURLEY JR, K.O.; NEUENDORFF, D.A.; LEWIS, A.W.; CLEERE, J.J.; WELSH JR, T.H.; RANDEL, R.D. Functional characteristics of the bovine hypothalamic–pituitary–adrenal axis vary with temperament. **Hormones and Behavior**, v.53, n.1, p.20-27, 2008.

DA ROSA, G.O.; WAGNER, W.C. Adrenal-gonad interactions in cattle. Corpus luteum function in intact and adrenalectomized heifers. **Journal of Animal Science**, v.52, n.5, p.1098-1105, 1981.

DELIGNETTE-MULLER, M.L.; DUTANG, C. Fitdistrplus: An R Package for Fitting Distributions. **Journal of Statistical Software**, v.64, n.4, p.1-34, 2015.

DOBSON, H.; GHUMAN, S.; PRABHAKAR, S.; SMITH, R. A conceptual model of the influence of stress on female reproduction. **Reproduction**, v.125, n.2, p.151-163, 2003.

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

FORDYCE, G.; 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, n.6, p.683-687, 1988.

GEBREGEZIABHEAR, E.; AMEHA, N. The Effect of Stress on Productivity of Animals: A Review, **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v.5, n.3, p.165-172, 2015.

GERENDAI, I.; TÓTH, I.E.; BOLDOGKÖI, Z.; MEDVECZKY, I.; HALASZ, B. CNS structures presumably involved in vagal control of ovarian function. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v.80, n.1-2, p.40-45, 2000.

GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.D.; CARVALHO, N.A.T.D.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; SOUZA, A.D.; MADUREIRA, E.H.; TRINCA, L.A.; SARTORELLI, E.S.; BARROS, C.M.; CARVALHO, J.B.P.; MAPLETOFT, R.J.; BARUSELLI, P.S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v.69, n.7, p. 852-858, 2008.

GINTHER, O.J. **Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color-Doppler Ultrasonography**, 1ed. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 2007.

GORDON, I. **Reproductive technologies in farm animals**. Library of Congress Cataloging-in-Publication, CABI, 2004.

GRANDIN, T. Behavioural principles of handling cattle and other grazing animals under extensive conditions. In: **Livestock Handling and Transport, 4th ed.; Grandin, T., Ed**, p. 39-64, 2014.

GRAZUL-BILSKA, A.T.; NAVANUKRAW, C.; JOHNSON, M.L.; VONNAHME, K.A.; FORD, S.P.; REYNOLDS, L.P.; REDMER, D.A. Vascularity and expression of angiogenic factors in bovine dominant follicles of the first follicular wave. **Journal of Animal Science**, v.85, n.8, p.1914-1922, 2007.

HEDLUND, L.; LØVLIE, H. Personality and production: Nervous cows produce less milk. **Journal of Dairy Science**, v.98, n.9, p.5819-5828, 2015.

HERZOG, K.; BROCKHAN-LÜDEMANN, M.; KASKE, M.; BEINDORFF, N.; PAUL, V.; NIEMANN, H.; BOLLWEIN, H. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. **Theriogenology**, v.73, n.5, p.691-697, 2010.

HULBERT, L.E.; CARROLL, J.A.; BURDICK, N.C.; RANDEL, R.D.; BROWN, M.S.; BALLOU, M.A. Innate immune responses of temperamental and calm cattle after transportation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.143, n.1-2, p.66-74, 2011.

JAMES, G.; DANIELA, W.; TREVOR, H.; ROBERT, T. 2014. **An Introduction to Statistical Learning: With Applications**. 121 ed. New York: R. Springer Publishing Company, Incorporated, 2014.

JIMENEZ FILHO, D.L.; TITTO, E.A.L.; TITTO, C.G.; CALVIELLO, R.F.; LEME, T.M. D.C. Reatividade em vacas da raça Nelore submetidas a protocolo de inseminação artificial em tempo fixo. **Revista de Etologia**, v.11, p.185, 2012.

KING, D.A.; PFEIFFER, C.S.; RANDEL, R.D.; WELSH Jr, T.H.; OLIPHINT, R.A.; BAIRD, B.E.; CURLEY Jr, K.O.; VANN, R.C.; HALE, D.S.; SAVELL, J.W. Influence of animal temperament and stress responsiveness on the carcass quality and beef tenderness of feedlot cattle. **Meat Science**, v.74, n.3, p.546-556, 2006.

LUCY, M.C. Stress, strain, and pregnancy outcome in postpartum cows. **Animal Reproduction**, v.16, n.3, p.455-464, 2019.

LÜTTGENAU, J.; BOLLWEIN, H. Evaluation of bovine luteal blood flow by using color Doppler ultrasonography. **Reproductive Biology**, v.14, n.2, p.103-109, 2014.

MANNION, P. (Ed.). **Diagnostic ultrasound in small animal practice**. John Wiley & Sons, Oxford: Blackwell Science, 2008.

MASSA, H.M.; BRUCE, N.W. Effects of noradrenaline on blood flow, progesterone secretion and oxygen consumption in the intact ovary of rats on day 16 of pregnancy. **Reproduction**, v.101, n.3, p.605-610, 1994.

MATSUNAGA, M. E.; SILVA, J. A.; TOLEDO, L. M.; DA COSTA, M. P.; ELER, J. P.; FERRAZ, J. B. S. Genetic analysis of temperament in Nelore cattle. In: 7TH WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 2002, Montpellier. **Anais...Montpellier**, 2002. p. 16.

MAZIERO, R.R.D.; MARTINS, A.C.; MOLLO, M.R.; MARTIN, I.; BASTOS, M.R.; FERREIRA, J.C.P.; RUMPF, R.; SARTORI, R. Ovarian function in cows submitted to acute stress during proestrus. **Livestock Science**, v.138, n.1-3, p.105-108, 2011.

MIMOUNE, N.; BAAZIZI, R.; AZZOUZ, M.Y.; BENAÏSSA, M.H.; KAIDI, R. Basic and new concepts of ovarian cyst pathogenesis in cattle. **Veterinaria**, v.68, n.2, p.73-80, 2019.

PINAFFI, F.L.V.; SANTOS, E.S.; SILVA, M.G.; MATURANA FILHO, M.; MADUREIRA, E.H.; SILVA, L.A. Follicle and corpus luteum size and vascularity as predictors of fertility at the time of artificial insemination and embryo transfer in beef cattle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n.5, p.470-476, 2015.

RALPH, C.R.; LEHMAN, M.N.; GOODMAN, R.L.; TILBROOK, A.J. Impact of psychosocial stress on gonadotrophins and sexual behaviour in females: role for cortisol? **Reproduction**, v.152, n.1, p.R1-R14, 2016.

RUSSELL, L. Emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.4. 2019. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans> [Acesso em: 21/01/2020].

SÁ FILHO, M.F.D.; CRESPILO, A.M.; SANTOS, J.E.P.; PERRY, G.A.; BARUSELLI, P.S. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-

based protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, v.120, n.1-4, p.23-30, 2010.

SANT'ANNA, A. C.; DA COSTA, M.J.R.P. Validity and feasibility of qualitative behavior assessment for the evaluation of Nellore cattle temperament. **Livestock Science**, v157, n.1, p.254-262, 2013.

SELSTAM, G.; GÅFVELS, M.; NORJAVAARA, E.; DAMBER, J.E. Acute increase of noradrenaline on vascular resistance in the corpus luteum of the pseudopregnant rat. **Reproduction**, v.75, n.2, p.351-356, 1985.

SIQUEIRA, L.G.B.; AREAS, V. S.; GHETTI, A.M.; FONSECA, J.F.; PALHAO, M.P.; FERNANDES, C.A.C.; VIANA, J.H.M. Color Doppler flow imaging for the early detection of nonpregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. **Journal of Dairy Science**, v.96, n.10, p.1–12, 2013.

SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Ovarian Follicular Dynamics during the Estrous Cycle in Heifers Monitored by Real-Time Ultrasonograph. **Biology of Reproduction**, v.39, n.2, p.308-317, 1988.

TARSO, S.G.S.; GASTAL, G.D.A.; BASHIR, S.T.; GASTAL, M.O.; APGAR, G.A.; GASTAL, E. L. Follicle vascularity coordinates corpus luteum blood flow and progesterone production. **Reproduction, Fertility and Development**, v.29, n.3, p.448-457, 2015.

TARSO, S.G.S.; APGAR, G.A.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E. Relationships between follicle and corpus luteum diameter, blood flow, and progesterone production in beef cows and heifers: preliminary results. **Animal Reproduction**, v.13, n.2, p.81-92, 2016.

TEAM, R. Core. R: A Language and Environment for Statistical Computing (Version 3.5. 2, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2018). <https://www.R-project.org/> [Acesso em: 21/01/2020].

THEDY, D.X.; BERLITZ, C.G.B.; OLIVEIRA, C.R.D.; LUIZ, D.S.V.; VELHO, G.D.S.; DALTO, A.G.C.; BORGES, J.B.S. Influência da estimulação do crescimento folicular na fertilidade de vacas de corte tratadas com eCG ou FSH em protocolos de IATF. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.46, n.1565, p.1-6, 2018.

UCHIDA, S; KAGITANI, F. Autonomic nervous regulation of ovarian function by noxious somatic afferent stimulation. **The Journal of Physiological Sciences**, v.65, n.1, p.1-9, 2015.

VARGA, B.; BERNARD, A. Stimulation of the alpha-and beta-adrenergic receptors in human ovarian vasculature in vitro. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 10, n. 2-3, p. 81-87, 1979.

VARUGHESE, E.E.; BRAR, P.S.; GHUMAN, S.S. Vascularization to preovulatory follicle and corpus luteum-a valuable predictor of fertility in dairy cows. **Theriogenology**, v.103, p.59-68, 2017.

VASCONCELOS, J.L.M.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H.N.; GUENTHER, J.G.; WILTBANK, M.C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v.56, n.2, p.307-314, 2001.

VASCONCELOS, J.L.M.; PEREIRA, M.H.C.; MENEGHETTI, M.; DIAS, C.C.; SÁ FILHO, O.G.; PERES, R.F.G.; RODRIGUES, A.D.P; WILTBANK, M.C. Relationships between growth of the preovulatory follicle and gestation success in lactating dairy cows. **Animal Reproduction**, v.10, n.3, p. 206-214, 2013.

VOISINET, B.D.; GRANDIN, T.; TATUM, J.D.; O'CONNOR, S.F.; STRUTHERS, J.J. Feedlot cattle with calm temperaments have higher average daily gains than cattle with excitable temperaments. **Journal of Animal Science**, v.75, n.4, p.892-896, 1997.

YOSHIDA, C.; NAKAO, T. Response of plasma cortisol and progesterone after ACTH challenge in ovariectomized lactating dairy cows. **Journal of Reproduction and Development**, v.51, n.1, p.99-107, 2005.

4. CAPÍTULO II

RELAÇÃO DO DIÂMETRO DO FOLÍCULO E DO CORPO LÚTEO COM PERFUSÃO VASCULAR, PRODUÇÃO DE PROGESTERONA E CONCEPÇÃO DE FÊMEAS NELORES.

4.1 Resumo

O objetivo deste experimento foi avaliar as relações entre o diâmetro do folículo pré-ovulatório (FPO) e do corpo lúteo (CL) com a quantidade e intensidade do fluxo sanguíneo, produção de progesterona e a fertilidade de vacas Nelores submetidas à IATF. Para tanto, 201 fêmeas Nelores foram submetidas à sincronização da ovulação e a avaliações ultrassonográficas em modo Color Doppler do FPO no momento da IA (D0) e do CL sete dias depois (D7). Foram determinados o diâmetro e o volume destas estruturas, assim como a quantidade e intensidade de pixels coloridos presente nelas. Adicionalmente, amostras de sangue também foram coletadas no D7 para dosagem de progesterona. Para análise dos dados, as fêmeas foram divididas em vazias e gestantes e também de acordo com o diâmetro do FPO: fêmeas de folículo pequeno, com diâmetro < 11mm (FP; n= 35); fêmeas de folículo médio, com diâmetro entre 11 e 14mm (FM; n=84) e fêmeas de folículo grande, com diâmetro \geq 14mm (FG; n= 70). As variáveis ultrassonográficas do FPO e do CL, bem como as concentrações de progesterona foram comparadas entre os grupos FP, FM e FG e entre fêmeas vazias e gestantes em cada variável resposta, implementando um modelo linear geral. As comparações múltiplas entre os tratamentos foram conduzidas usando contrastes de Tukey. As taxas de concepção foram comparadas entre os grupos FP, FM e FG pelo qui-quadrado. Correlações de Pearson foram realizadas para todas variáveis e os dados foram expressos em média e desvio padrão. Foram encontradas diferenças entre os grupos FP, FM e FG para diâmetro e volume do folículo e do corpo lúteo, demonstrando que folículos maiores também originam corpos lúteos maiores. O grupo FG apresentou maior quantidade e intensidade de pixels no folículo em relação ao FP. A intensidade de fluxo no CL e a concentração de progesterona também foram maiores no FG. O grupo FP apresentou menor intensidade de fluxo e taxa de ovulação em relação aos demais, embora a taxa de concepção tenha sido semelhante para todos. Foram encontradas correlações fracas entre o tamanho do FPO e do CL assim como entre o diâmetro e volume do CL com sua quantidade pixels e concentração de progesterona. Além de correlação moderada entre o diâmetro e sua intensidade de pixels. Não houve diferença entre fêmeas vazias e gestantes para todas as variáveis analisadas. Os resultados confirmam a presença de relações entre o tamanho das estruturas ovarianas e a quantidade e intensidade de fluxo destas, bem como a sua capacidade de produzir progesterona. A intensidade dos pixels do FOP mostrou-se relevante, demonstrando correlações com o tamanho e o fluxo do CL, que não foram encontradas avaliando somente a quantidade de pixel, revelando a importância de avaliar características complementares do fluxo.

Palavra-chaves: folículo pré-ovulatório, color Doppler, fluxo sanguíneo.

4.2 Abstract

The objective of this experiment was to evaluate the relationship between the diameter of the preovulatory follicle (POF) and the corpus luteum (CL) with the amount and intensity of blood flow, progesterone production and the fertility of Nelore females submitted to TAI. For this purpose, 201 Nelore females were submitted to synchronization of ovulation and ultrasound assessments in Doppler Color Flow mode of POF at the time of AI (D0) and CL seven days later (D7). The diameter and volume of these structures were determined, as well as the amount and intensity of colored pixels present in them. In addition, blood samples were also collected on D7 for progesterone measurement. For data analysis, the females were divided into pregnant and nonpregnant and also according to the POF diameter: females of small follicle, with diameter <11mm (SF; n = 35); females of medium follicle with diameter between 11 and 14mm (MF; n = 84) and females of large follicle with diameter \geq 14mm (LF; n = 70). The ultrasound variables of POF and CL, as well as the concentrations of progesterone were compared between the groups SF, MF and LF and between pregnant and nonpregnant females in each response variable, implementing a General Linear Model. Multiple comparisons between treatments were conducted using Tukey's contrasts. Conception rates were compared between the SF, MF and LF groups using the chi-square test. Pearson correlations were performed for all variables and the data were expressed as means and standard deviations. Differences were found between the SF, MF and LF groups for follicle and corpus luteum diameter and volume, demonstrating that larger follicles also give rise to larger CLs. The LF group showed a higher amount and intensity of pixels in the POF compared to the SF. The flow intensity in the CL and progesterone concentrations were also higher in the LF. The SF group had lower flow intensity and ovulation rate compared to the others, although the conception rate was similar for all. Weak correlations were found between the size of the POF and the CL. There was a weak correlation between the diameter and volume of the CL with its number of pixels and concentration of progesterone. In addition to a moderate correlation between the diameter and its pixel intensity. There were no differences between the variables of pregnant and nonpregnant cows ($p > 0.05$). The results confirm the presence of relationships between the size of the ovarian structures and the quantity and intensity of their flow, as well as their ability to produce progesterone. The intensity of the POF pixels was shown to be relevant, demonstrating correlations with the size and flow of the CL, which were not found by evaluating only the pixel quantity, revealing the importance of evaluating complementary flow features.

Key words: preovulatory follicle, color Doppler, blood flow.

4.3 Introdução

Na busca de melhores resultados, a ultrassonografia Doppler surge como uma tecnologia importante, aplicável e minimamente invasiva, que permite um maior aprimoramento do manejo reprodutivo por meio da avaliação da perfusão no trato reprodutivo de vacas durante vários estágios do ciclo estral, gestação e puerpério. Esta avaliação fornece informações adicionais sobre processos fisiológicos e patológicos no útero e nos ovários (HERZOG; BOLLWEIN, 2007). Mudanças hemodinâmicas cíclicas ocorrem no tecido ovariano de vacas, durante o crescimento folicular final, ovulação e desenvolvimento do corpo lúteo (ACOSTA et al., 2003). O fluxo sanguíneo dessas estruturas apresenta relações diretas com sua funcionalidade (ACOSTA et al., 2003; LÜTTGENAU; BOLLWEIN, 2014)

A maior perfusão do folículo pré-ovulatório também foi associada a maior sucesso na recuperação de óocitos, na clivagem e no desenvolvimento embrionário (SIDDIQUI et al., 2009). O maior fluxo do folículo pré-ovulatório está relacionado também a maturidade folículo, bem como do oócito (GINTHER, 2007). Animais com maior fluxo na parede folicular também apresentam maiores chances de se tornarem gestantes após a inseminação (SIDDIQUI et al., 2009).

Segundo Acosta et al. (2003), um dos principais pontos para entender o papel das substâncias vasoativas na fisiologia ovariana é determinar a mudança do fluxo sanguíneo local em folículos e corpo lúteo em estágios específicos do ciclo estral. Substâncias vasoativas desempenham papel importante também na modulação da secreção de hormônios esteroides e prostaglandinas (ACOSTA et al., 2000).

A partir da ideia de que alterações na quantidade e intensidade de fluxo sanguíneo folicular e luteal permitem avaliar a funcionalidade do folículo e do corpo lúteo, o presente estudo testou as seguintes hipóteses: i) folículos pré-ovulatórios maiores originam corpos lúteos maiores e mais vascularizados; ii) folículos e corpos lúteos maiores apresentam maior intensidade de fluxo sanguíneo; iii) folículos dominantes com maior quantidade e intensidade de fluxo sanguíneo, quando ovulados, dão origem a corpos lúteos com maior quantidade e intensidade de fluxo sanguíneo e produzem mais progesterona; iv) fêmeas com maior quantidade e intensidade de fluxo sanguíneo luteal apresentam maior taxa de concepção quando submetidas à IATF. Desta forma, o presente estudo objetivou avaliar a relação entre o

diâmetro do folículo pré-ovulatório e do corpo lúteo com a perfusão vascular, produção de progesterona, ovulação e a concepção de vacas Nelores submetidas à IATF.

4.4 Material e Métodos

O presente estudo foi aprovado na COMISSÃO DE ETICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/IZ/UFRRJ, – processo no 23083.008085/2018-34.

4.4.1 Local do experimento, animais e manejo

O presente estudo foi desenvolvido em fazenda comercial de gado de corte localizada em Paraibuna-SP. Duzentas e uma fêmeas Nelores, não gestantes, com escore de condição corporal (ECC) médio de $2,83 \pm 0,53$ (escala de um a cinco, considerado o 1 caquético e o 5 obeso) e entre 45 e 120 dias de pós-parto foram submetidas ao exame ginecológico para constatar possíveis alterações, selecionando somente animais sadios e ainda sem anomalias no trato reprodutivo (infecção uterina, cérvix tortuosa ou fibrosada etc).

Os animais eram criados em regime extensivo com pastagem de *Brachiaria brizantha*, água e sal mineral *ad libitum* e divididos em lotes com média de 30 animais. A propriedade dispõe de um curral com cinco divisões para separação dos animais, além de um galpão coberto onde é abrigado o tronco de contenção e o apartadouro.

No tronco de contenção foram realizadas a aplicação dos hormônios, a inseminação artificial, a avaliação ultrassonográfica transretal e a coleta de sangue de acordo com o momento do experimento. Os animais foram conduzidos em grupos pequenos para o interior da seringa para entrarem em fila no brete e em seguida foram contidos individualmente no tronco, sendo que a entrada ocorreu de maneira aleatória. Após realizado o manejo, os animais foram apartados separadamente no curral onde aguardaram até que todo o lote fosse manejado e posteriormente conduzidos novamente ao pasto. Todos animais foram submetidos ao mesmo manejo e todas as avaliações foram concentradas para finalizar todo o lote em no máximo quatro horas de trabalho, para que não houvesse diferenças significativas no tempo de espera no curral.

4.4.2 Sincronização da ovulação e IATF

As fêmeas foram sincronizadas por meio de protocolo hormonal baseado em Pugliesi et al. (2019), no qual em dia aleatório do ciclo estral (início do tratamento; denominado D-10), inseriu-se um dispositivo intravaginal de progesterona novo de 1g, associado à aplicação de 2,0 mg de benzoato de estradiol, por via intramuscular. O dispositivo foi mantido por oito dias e, na sua retirada (D-2), aplicou-se 0.53 mg de cloprostenol sódico + 300UI de gonadotrofina coriônica equina + 1,0mg de cipionato de estradiol, todos por via intramuscular. Após 48 horas da retirada do dispositivo, realizou-se a Inseminação Artificial em Tempo Fixo, sendo esse considerado o D0 (Figura 5).

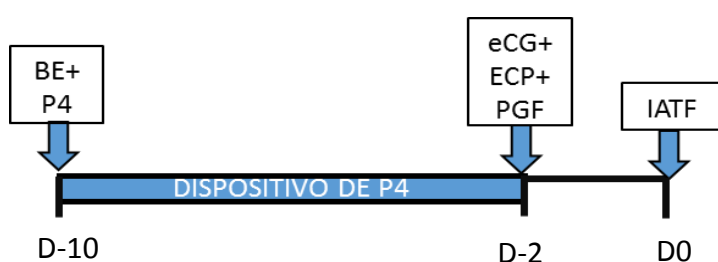


Figura 4. Protocolo de sincronização da ovulação adotado.

Ao final do protocolo, foi calculada a taxa de sincronização, determinada pelo número de fêmeas apresentando folículo dominante no momento da IA dividido pelo total de fêmeas protocoladas. Também foi estimada a taxa de ovulação dos animais tratados, determinada pela divisão do número de fêmeas apresentando CL sete dias após a IA pelo total de animais protocolados.

4.4.3 Avaliação ultrassonográfica do folículo pré-ovulatório e do corpo lúteo

A avaliação ultrassonográfica dos ovários foi realizada por via transretal com auxílio de um Ultrassom Doppler Mindray, modelo Z5VET, equipado com transdutor linear 75L50EAV e emissão de onda de 5,0/7,5 Mhz padronizando o ganho total de 70%. As imagens do folículo dominante e do corpo lúteo foram realizadas em modo B para determinação das posições e mensuração destas estruturas. O diâmetro foi calculado pela média das duas maiores medidas transversais, perpendiculares entre si, além de outra terceira medida de maior tamanho formada por uma linha concorrente a uma das transversais do diâmetro, para cálculo do volume. A avaliação do folículo pré-ovulatório foi realizada

previamente à inseminação (D0) e a do corpo lúteo sete dias após a IATF (D7). Com base na mensuração do diâmetro do folículo pré-ovulatório, as fêmeas foram divididas em três grupos assim descritos: grupo FP de fêmeas apresentando folículo pequeno, com diâmetro < 11mm (FP; n= 35); grupo FM de fêmeas apresentando folículo médio, com diâmetro entre 11 e 14mm (FM; n=84); grupo FG de fêmeas apresentando folículo grande, com diâmetro \geq 14mm (FG; n= 70);

As imagens em modo Doppler colorido foram gravadas em formato de vídeo AVI e armazenadas em um disco magnético para posterior análise. Os vídeos foram analisados selecionando e congelando três imagens, com intuito de obter uma média das variáveis, onde mostrava o folículo ou CL com seu maior diâmetro e a maior quantidade de fluxo sanguíneo. Posteriormente, as imagens capturadas foram editadas e submetidas a análise do software Image J para quantificar o número de pixels coloridos presentes (GINTHER, 2007), conforme Figura 6. Todas as avaliações ultrassonográficas, neste estudo, foram realizadas por um único operador.

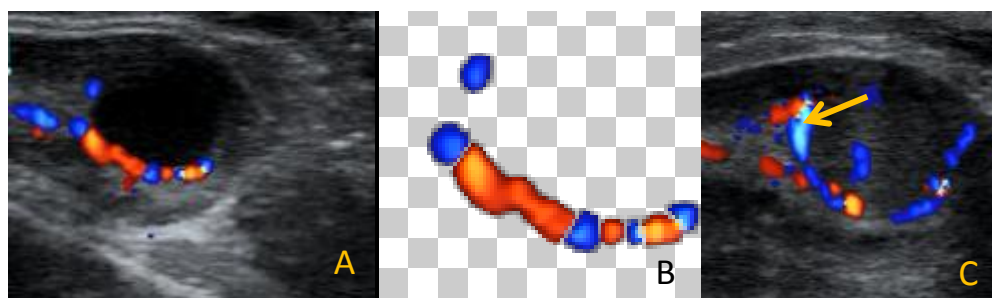


Figura 5. A) Imagem do folículo pré-ovulatório com a presença de fluxo em modo color Doppler, B) Imagem editada com extração das áreas de fluxo colorido, para posterior contagem de pixels. C) Imagem do corpo lúteo sete dias após a IA com presença de fluxo e uma seta amarela demonstrando a presença de fluxo sanguíneo mais intenso demonstrada pelos tons mais claros presentes no interior dos vasos sanguíneos.

Durante a contagem dos pixels foi realizada a quantificação da intensidade do fluxo por meio de uma equação, utilizando o número de pixels encontrado de cada tom de cor multiplicado pelo código numérico que representa cada um desses tons presentes na imagem, sabendo que cores mais claras apresentam maiores valores. A partir da soma desses produtos, foi obtida a intensidade de fluxo, que está diretamente ligada a velocidade do fluxo sanguíneo.

4.4.4 Dosagem de progesterona sérica

No momento da avaliação ultrassonográfica do corpo lúteo, no sétimo dia após a inseminação artificial, foram coletadas amostras de sangue por meio de venopunção da veia ou artéria coccígea, com auxílio de adaptador e agulhas de ponta dupla acoplados ao tubo de coleta a vácuo sem anticoagulante para determinação da concentração de progesterona. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 480G sendo o soro mantido em refrigeração a -20°C até a posterior análise. Os valores séricos de P4 foram avaliados no Laboratório de Dosagem Hormonal da Faculdade de Veterinária da UFF pela técnica de radioimunoensaio em fase sólida, utilizando kits comerciais (ImmuChem, MP Biomedicals, Santa Ana, Califórnia, EUA). A sensibilidade e o coeficiente intra-ensaio foram de 0,05ng/ml e 11%, respectivamente. Todos os dados estavam dentro do ponto máximo e mínimo da curva.

4.4.5 Diagnóstico de gestação

Das 201 vacas utilizadas no experimento, 101 foram submetidas ao diagnóstico de gestação aos 30 dias e as demais receberam outros tratamentos que poderiam interferir na taxa de gestação, sendo assim, não foram contabilizadas.

O diagnóstico de gestação foi realizado aos 30 dias após a inseminação utilizando ultrassonografia transretal (transdutor linear; 7,5MHz). A confirmação da prenhez foi baseada na visualização da vesícula embrionária com a presença de embrião viável (presença de batimento cardíaco).

4.4.6 Análise estatística

No processo de análise dos dados até chegar ao modelo de melhor ajuste para as variáveis testadas, os dados foram ajustados excluindo animais que apresentaram dados discrepantes. Outliers, um ponto que possui valor variável de resultado extremo, cuja presença poderia afetar a interpretação do modelo, observações cujos resíduos padronizados foram maiores que 3 em valor absoluto são possíveis discrepantes (JAMES et al., 2014). Desta forma, os dados de alguns animais foram removidos em determinadas análises, explicando o menor número de animais em alguns resultados.

As análises estatísticas foram realizadas na R. v. 3.6.1 (R Core Team, 2019). Para analisar as diferenças entre os tratamentos em cada variável resposta, foi implementado um modelo linear geral (função *glm* do pacote stats) com diferentes estruturas de erro (gaussian

ou gamma) e função de link (identidade). A estrutura de erro foi avaliada com o uso da função *descdist* do pacote *fitdistrplus* (DELIGNETTE-MULLER E DUTANG, 2015). As concentrações séricas de progesterona foram analisadas após uma transformação para escala de raiz quadrada. Para apresentar os resultados, os dados foram retornados à condição original. As comparações múltiplas entre os tratamentos foram conduzidas usando contrastes de Tukey por meio da função *emmeans* do pacote *emmeans* (RUSSELL LENTH, 2019). As variáveis foram relacionadas por meio de correlação de Pearson. Os dados foram expressos em média e s.e.m. salvo indicação em contrário.

4.5 Resultados e Discussão

A Tabela 2 apresenta valores relacionados ao folículo pré-ovulatório, ao corpo lúteo, à concentração de progesterona e às taxas de ovulação e de concepção. Foi possível observar diferença significativa entre os diferentes grupos (FP, FM e FG) para diâmetro e volume do folículo e do corpo lúteo. O grupo FG com maior tamanho de FPO e de CL apresentou também maiores valores de progesterona.

Tabela 3. Médias e desvios padrão das variáveis do folículo e do corpo lúteo nos três grupos divididos de acordo com o diâmetro folicular (folículos pequenos: diâmetro <11mm; folículos médios: diâmetro entre 11mm e 14mm; folículos grandes: diâmetro ≥ 14mm).

Parâmetros	Grupo FP (N=35)	Grupo FM (N=84)	Grupo FG (N=70)
Diâmetro FL (cm)	0,96±0,09 ^a	1,26±0,01 ^b	1,58±0,11 ^c
Volume FL (cm)	0,45±0,13 ^a	1,06±0,21 ^b	1,89±0,3 ^c
Número de pixels coloridos – FL	329,1±49,72 ^a	448,77 ± 31,82 ^{ab}	556,64 ± 35,16 ^b
Intensidade de pixel*-FL	36872,9±24711,1 ^a	50368,7±31028,3 ^b	61670,9±31811,2 ^b
Diâmetro CL D7 (cm)	1,78±0,05 ^a	1,92±0,03 ^b	2,14±0,03 ^c
Volume CL D7 (cm)	2,86±0,22 ^a	3,62±0,16 ^b	5,19±0,26 ^c
Número de pixels coloridos - CL D7	1493,44±130,29 ^a	2233,79±113,93 ^b	2348,86±134,15 ^b
Intensidade de pixel* - CL D7	167823,5±15128,3 ^a	248845,5±13114,0 ^a	265544,0±15670,6 ^b
Concentração P4 (ng/ml)	1,18±0,19 ^a	1,57±0,12 ^a	2,17±0,16 ^b
Taxa de ovulação (%)	77,14% ^a	95,23% ^b	94,28% ^b
Taxa de concepção (%)	43,48 % ^a	56,41 % ^a	50 % ^a

FP= Folículos pequenos, FM= folículos médios, FG= folículos grandes, FL= Folículo, CL= Corpo Lúteo, D7= dia 7 após a ovulação, P4= progesterona. *A intensidade é um valor numérico obtido a partir do código numérico de cada cor multiplicado pelo número de pixel dessa, não possuindo unidade específica de medida.

Em relação ao número de pixels e à intensidade do FPO, observou-se que a perfusão vascular média do grupo FP foi significativamente inferior ao grupo FG. Essa diferença do número de pixels e da intensidade entre folículos pequenos e grandes também foi observada quando estas variáveis foram comparadas para os corpos lúteos. Não foi observada diferença do número de pixels e intensidade de fluxo entre folículos médios e grandes. Os números de pixels do CL também foram semelhantes para os grupos FM e FG, embora o FG tenha apresentado maior intensidade de fluxo.

As vacas do grupo FP apresentaram menor taxa de ovulação em relação aos animais dos demais grupos. Apesar disso, não foi observada diferença entre as taxas de concepção dos três grupos. As mesmas variáveis apresentadas na Tabela 1 foram comparadas entre fêmeas vazias e gestantes (Tabela 3), não sendo observada diferença para nenhum dos parâmetros avaliados.

Tabela 4. Médias e desvios padrão das variáveis do folículo e do corpo lúteo em grupos divididos entre vacas prenhes ou vazias.

Parâmetro	Vazias	Gestantes	Valor de p
Diâmetro FL (mm)	1,28±0,28	1,33±0,24	0,33
Volume FL (mm ³)	1,24±0,76	1,35±0,71	0,30
Número pixels coloridos FL	456,14±277,41	502,42±275,28	0,36
Intensidade de pixel* - FL	51184,83±32661,01	56081,02±32158,02	0,47
Diâmetro CL D7 (mm)	1,98±0,30	1,98±0,28	0,98
Volume CL D7 (mm ³)	4,32±2,02	4,27±1,70	0,90
Número de pixels coloridos – CL D7	2354,92±938,37	2488,05±1076,83	0,62
Intensidade de pixel* - CL D7	265326,86±106099,09	280227,86±130692,40	0,69
Concentração P4 (ng/ml)	1,86±1,13	1,93±1,15	0,80

FL= Folículo, CL= Corpo Lúteo, D7= dia 7 após a ovulação, P4= progesterona. *A intensidade é um valor numérico obtido a partir do código numérico de cada cor multiplicado pelo número de pixel dessa, não possuindo unidade específica de medida.

Foram observadas correlações positivas, variando de fracas a moderadas, para o diâmetro do folículo pré-ovulatório e do corpo lúteo e todas as demais variáveis. O número de pixels do folículo apresentou correlação positiva fraca com o seu diâmetro ($r=0,16$), volume ($r=0,15$) e, como era esperado, moderada com a intensidade ($r=0,48$).

O diâmetro folicular, utilizado como critério de divisão dos grupos, assim como o volume, apresentaram diferença estatística entre os grupos FP, FM e FG ($p < 0,01$). De acordo com Vasconcelos et al. (2013), o diâmetro do folículo pré-ovulatório está envolvido em um equilíbrio entre a qualidade do oócito, um adequado nível de estrógeno circulante próximo a IA e uma adequada circulação de progesterona após a IA.

No presente estudo, o tamanho do folículo apresentou correlação positiva moderada ($r=0,49$) com o diâmetro do corpo lúteo. Segundo Lonergan et al. (2013), Pinaffi et al. (2015) e Pugliesi et al. (2016 e 2019), é esperado que maiores folículos deem origem a maiores corpos lúteos e esses apresentem maior capacidade de produzir progesterona, estando associado a maiores taxas de gestação após a IATF. Adicionalmente, as diferenças encontradas entre os grupos FP, FM e FG para diâmetro e volume do folículo se repetiram para as mesmas variáveis do CL. Em conformidade, Tarso et al. (2015) afirmaram que as dimensões do folículo pré-ovulatório permitiriam estimar as dimensões do CL.

No entanto, ao comparar as variáveis diâmetro e volume do CL entre fêmeas gestantes e vazias, não foram observadas diferenças ($p > 0,05$), bem como a taxa de concepção não diferiu entre os grupos FP, FM e FG. Ainda que Perry et al. (2007) tenham associado tamanhos maiores de folículos a maiores taxas de gestação.

A taxa de ovulação foi menor no grupo de folículos menores (FP) em relação aos demais, comprovando que o maior tamanho está associado também a maior probabilidade de ovulação conforme reportado por Ribeiro Filho et al. (2013). Gimenes et al. (2008) também afirmam que a capacidade ovulatória depende do tamanho folículo e apresenta grande variação nas respostas aos protocolos hormonais.

As concentrações de progesterona foram significativamente maiores no grupo FG (folículos $>14\text{mm}$) em relação aos demais grupos, em conformidade com Vasconcelos et al. (2013) que também constataram maiores concentrações de progesterona no dia 7 em vacas que ovularam folículos maiores ($>17\text{mm}$), segundo estes, a otimização do tamanho do folículo estaria relacionada a uma adequada circulação de P4 pós IA.

Embora positivas, correlações fracas foram encontradas entre as dimensões do folículo e do corpo lúteo com a quantidade de progesterona no dia 7 (TAYLOR, 1990), em contradição com os achados de Tarso et al. (2017) que encontraram correlações altas entre as

dimensões do folículo pré-ovulatório, do corpo lúteo e o fluxo sanguíneo de ambas estruturas, bem como destes com a concentração plasmática de progesterona.

Embora o grupo FG tenha apresentado maior concentração de progesterona em relação aos demais grupos, a taxa de concepção não diferiu entre nenhum desses, demonstrando que as concentrações de progesterona foram satisfatórias para manter a gestação em todos grupos, e que nem sempre os folículos maiores resultam em maiores taxas de concepção. Em alguns casos, o maior tamanho do folículo pode estar associado a persistência de dominância, que segundo Mihm et al. (1994), apesar de formarem corpos lúteos funcionais, podem causar decréscimo na taxa de concepção e aumentar as perdas iniciais como reportado por Colazo et al. (2015).

Apesar da diferença observada na concentração de progesterona no grupo FG em relação aos demais, no presente estudo não foi encontrada diferença ($p=0,80$) nas concentrações de progesterona entre fêmeas vazias e gestantes. Este achado está em concordância com Pugliesi et al. (2019) que também não encontraram diferença na progesterona sérica no dia 7 em receptoras bovinas que ficaram gestantes ou vazias, e afirmaram que a perfusão sanguínea luteal é um indicador mais adequado da atividade luteal e de probabilidade de gestar em relação à concentração de P4.

Outra constatação em comum com o presente estudo é que o tamanho do CL também foi similar entre gestantes e vazias. Tal fato pode ser explicado pelas variações de tamanho, fluxo e concentração durante a fase luteal conforme descrito por Herzog et al. (2010), que dividiram o período luteal em 3 fases: fase de crescimento luteal, fase estática luteal e a fase de regressão luteal. Durante a fase de crescimento luteal, a concentração de progesterona, o tamanho luteal (LS) e o fluxo sanguíneo luteal (LBF) aumentaram de maneira quase idêntica. Diferenças consideráveis nas alterações foram óbvias na fase estática, com moderado aumento no tamanho luteal, enquanto o fluxo sanguíneo e as concentrações de progesterona aumentaram de maneira quase similar.

Tais relações entre o fluxo sanguíneo luteal e as concentrações de progesterona, fazem do fluxo o principal indicador de mudanças na concentração desta ao longo do ciclo de vacas (HERZOG et al., 2010; LUTTGEMAU et al., 2011; THIJSEN et al., 2011). Andrade et al. (2019) verificaram que o diâmetro do CL apresentou a mesma eficácia que a perfusão

vascular para o diagnóstico de gestação em novilhas Nelores, no entanto essas análises foram realizadas somente no dia 21 após a IA.

Embora bastante estudada e com grande contribuição para avaliação das características reprodutivas, Ginther (2007) afirma que avaliação ultrassonográfica no modo B limita-se apenas ao plano anatômico, enquanto a ultrassonografia no modo Doppler colorido permite avaliar também a funcionalidade das estruturas ovarianas. Diante disto, o presente estudo buscou encontrar relações importantes entre os dois modos utilizando um número expressivo de animais de corte, além de procurar características importantes que impactam positivamente no sucesso reprodutivo em um programa de IATF. Visto que Lüttgenau e Bollwein (2014) afirmaram haver relações importantes entre o fluxo sanguíneo, a capacidade de produção hormonal e a morfologia associadas a melhoria na fertilidade.

No presente estudo, o grupo FP apresentou menor número de pixels em relação aos demais grupos, atestando que a menor perfusão sanguínea está associada ao menor diâmetro, conforme constatado anteriormente por Pinaffi et al. (2015) e Tarso et al. (2016). Isso pode ser explicado pelo maior fluxo resultar em maior aporte de gonadotrofinas, substâncias bioquímicas e fatores hormonais necessários para o desenvolvimento folicular, por isso folículos maiores apresentam maior perfusão (ACOSTA; MYAMOTO 2004).

Embora Sidiqui et al. (2007) tenham associado o aumento da vascularização folicular à maior chance de estabelecer a gestação, a taxa de concepção no presente estudo não apresentou diferença entre os grupos ($p=0,36$), bem como o número de pixels na parede do folículo não diferiu entre fêmeas gestantes e vazias. Outro dado importante que pode ter influenciado o presente resultado é que algumas vacas mesmo vazias poderiam apresentar uma alta contagem de pixel, visto que de acordo com Pinaffi et al. (2015), e de maneira contraditória, CLs de vacas com fluxo sanguíneo maior que 70% na análise subjetiva apresentaram queda na fertilidade.

Embora a quantidade de pixel coloridos, que representam o fluxo sanguíneo do CL, tenha sido maior em animais com folículos médios (FM) e grandes (FG) em relação aos de folículo pequeno (FP), tal característica não diferiu ($p= 0,62$) entre os grupos de fêmeas vazias e gestantes no presente estudo, embora, segundo Pugliesi et al. (2019), a perfusão sanguínea do corpo lúteo seja o principal fator a ser avaliado em receptoras de embrião, afetando diretamente a probabilidade de gestar. O fluxo sanguíneo luteal apresenta variações temporais

durante o ciclo estral, tal condição pode ter contribuído para a inexistência de diferenças entre estes, visto que as avaliações foram realizadas no dia sete após o estro e, segundo Herzog et al. (2011), até o dia 15 após o estro, o fluxo sanguíneo também foi similar entre os grupos de vacas gestantes e vazias.

Uma avaliação complementar à contagem de pixel é proposta nesse artigo, com intuito quantificar a intensidade ou velocidade do fluxo sanguíneo das estruturas avaliadas. A imagem ultrassonográfica é formada por pixels, o fluxo sanguíneo é representado por pontos coloridos que aumentam ou diminuem de acordo com o fluxo presente, cada pixel apresenta um tom de cor, esses diferentes tons de cores variam de acordo com a intensidade do fluxo, tonalidades escuras e claras são velocidades lentas e rápidas, respectivamente (GINTHER 2007, VARUGHESE et al., 2017). O software Image J permite a contagem do número de pixel de cada cor, e atribui um valor numérico para cada uma destas cores ou tons, cores ou tons mais claros apresentam valores numérico maiores, enquanto os tons mais escuros são representados por menores valores. Ao multiplicar o número de pixel de determinada cor pelo seu código numérico obtém-se um produto, o somatório de todos os produtos obtidos permite quantificar a intensidade do fluxo sanguíneo presente na estrutura avaliada. O resultado encontrado será maior de maneira proporcional a quantidade de pixels coloridos e a quantidade destes com tons claros (códigos numéricos maiores).

Metodologia semelhante foi adotada por Oliveira et al. (2017), utilizando a barra de escala de velocidade em cada imagem Doppler dividida em 64 cores visivelmente distintas em linhas. As velocidades no primeiro quarto (16 linhas) e no quarto inferior (16 linhas) da barra de escala foram então isoladas. O número de pixels no ultrassonograma do ovário, correspondente às cores nas partes superior e inferior da barra de escala, foram enumeradas utilizando um software analítico. A função foi utilizada para registrar o número de pixels no ovário que caíam na faixa de cores selecionada. O número de pixels que correspondeu às cores nessas regiões selecionadas da barra de escala de cores foi considerado "pixels de alta velocidade" (HVPs). Esses autores encontraram correlações positivas entre o número de pixel de alta velocidade no dia 1 do tratamento superovulatório em ovelhas com o número de CLs, número de estruturas recuperadas e número de embriões viáveis, as mesmas correlações foram negativas no dia 3 do tratamento, o que demonstra que existem alterações em função do tempo e essas podem ser as responsáveis pelas variações nos resultados. Em revisão sobre a

aplicação da ultrassonografia Doppler em pequenos ruminantes, Bartlewski (2019) concluiu que a avaliação do fluxo sanguíneo de alta velocidade em folículos antrais é um método útil para prever o resultado do tratamento superovulatório.

No presente estudo, diferenças não constatadas na quantidade de pixels entre os grupos FP e FM foram evidenciadas a partir da comparação da intensidade de fluxo. Com menor intensidade no grupo FP, de menor diâmetro folicular, o que reforça a ideia de uma correlação positiva entre o tamanho folicular e sua perfusão vascular conforme demonstrado por Tarso et al. (2016). A intensidade nos acrescenta mais informações sobre as características do fluxo sanguíneo, podendo ser utilizada como análise complementar mais sensível para aumentar a acurácia do exame.

De fato, os coeficientes de correlação positiva foram maiores entre a intensidade dos pixels e as variáveis diâmetro e volume do folículo e CL, do que entre tais variáveis e a quantidade de pixels dessas estruturas.

As variáveis diâmetro e volume do CL no dia 7 após a IA também apresentaram correlação positiva, embora fraca, com a intensidade dos pixels do folículo, as mesmas não apresentaram correlação com o número de pixels do folículo. O que permite especular sobre a aplicação de tal característica na avaliação complementar do fluxo sanguíneo das estruturas ovarianas, devendo ser trabalhada e estudada também de maneira subjetiva e mais prática do que a contagem de pixel de tons claros para auxiliar na predição de fertilidade na rotina de programas reprodutivos.

Segundo Acosta (2007), as imagens do folículo pré-ovulatório no Doppler modo espectral também revelaram maiores áreas de fluxo e maior velocidade média total (TAMV), que foram temporalmente correlacionadas com o aumento nas concentrações plasmáticas de estradiol e pico de LH, demonstrando também relações funcionais com a quantidade e velocidade do fluxo. O modo espectral, apesar de permitir uma análise quantitativa da velocidade de fluxo durante o exame, sofre alterações drásticas nestes valores em função de alterações no ângulo de insonância (GINTHER, 2007).

É possível constatar que o aumento da intensidade de fluxo sanguíneo apresentou efeito positivo sobre o tamanho do folículo e do CL, visto que tal variável foi estatisticamente diferente e crescente para os grupos FP, FM e FG, respectivamente.

Entretanto, a intensidade de fluxo sanguíneo do folículo não diferiu entre grupos de vacas gestantes e vazias ($p>0,05$), em discordância com Silva et al. (2006), que encontraram maior velocidade sistólica (VS) e tempo médio de velocidade máxima (TAMV) em folículos de éguas que ficaram gestantes. Além das possíveis variações entre as espécies, alterações em relação ao momento de avaliação ultrassonográfica podem ter contribuído para tal situação.

A intensidade do fluxo sanguíneo no CL também não apresentou diferença entre vacas gestantes e vazias. Embora com intuito de avaliar não necessariamente a velocidade do fluxo, Varughese et al. (2017) associaram a quantidade de tons mais claros de cores no fluxo do corpo lúteo no dia 12 e 21 do ciclo com a presença de turbulência e ocorrência de luteólise, isso atenta para importância de diferenciar os aumentos da intensidade de fluxo da presença de turbulência.

4.6 Conclusões

Conclui-se que folículos pré-ovulatórios pequenos apresentam menor quantidade e intensidade de fluxo sanguíneo, menor chance de ovular e que estes também originam CLs menores e menos vascularizados, com fluxo sanguíneo menos intenso e menor capacidade de produzir progesterona. No entanto, tais características não são suficientes para diminuir a taxa de concepção de fêmeas submetidas à IATF.

4.7 Referências Bibliográficas

ACOSTA, T.J.; OZAWA, T.; KOBAYASHI, S.; HAYASHI, K.; OHTANI, M.; KRAETZL, W.D.; SATO, K.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Periovulatory changes in the local release of vasoactive peptides, prostaglandin F₂ α , and steroid hormones from bovine mature follicles in vivo. **Biology of Reproduction**, v.63, n.5, p. 1253-1261, 2000.

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, n.5, 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, p.127-140, 2004.

ACOSTA, T.J. Studies of follicular vascularity associated with follicle selection and ovulation in cattle. **Journal of Reproduction and Development**, v.53, n.1, p.39-44, 2007.

ANDRADE, J.P.N.; ANDRADE, F.S.; GUERSON, Y.B.; DOMINGUES, R.R.; GOMEZ-LEÓN, V.E.; CUNHA, T.O.; JACOB, F.C.F.; SALES, J.N.; MARTINS, J.P.N.; MELLO, M. R. B. Early pregnancy diagnosis at 21 days post artificial insemination using corpus luteum vascular perfusion compared to corpus luteum diameter and/or echogenicity in Nelore heifers. **Animal Reproduction Science**, v.209, p.106144, 2019.

BARTLEWSKI, P.M. Applications of Doppler ultrasonography in reproductive health and physiology of small ruminants. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.43, n.2, p.122-125, 2019.

COLAZO, M.G.; BEHROUZI, A.; AMBROSE, D.J.; MAPLETOFT, R.J. Diameter of the ovulatory follicle at timed artificial insemination as a predictor of pregnancy status in lactating dairy cows subjected to GnRH-based protocols. **Theriogenology**, v.84, n.3, p.377-383, 2015.

DELIGNETTE-MULLER, M.L.; DUTANG, C. Fitdistrplus: An R Package for Fitting Distributions. **Journal of Statistical Software**, v.64, n.4, p.1-34, 2015.

GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.D.; CARVALHO, N.A.T.D.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; SOUZA, A.D.; MADUREIRA, E.H.; TRINCA, L.A.; SARTORELLI, E.S.; BARROS, C.M.; CARVALHO, J.B.P.; MAPLETOFT, R.J. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v.69, n.7, p.852-858, 2008.

GINTHER, O.J. **Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color-Doppler Ultrasonography**, 1ed. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 2007.

HERZOG, K.; BROCKHAN-LÜDEMANN, M.; KASKE, M.; BEINDORFF, N.; PAUL, V.; NIEMANN, H.; BOLLWEIN, H. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. **Theriogenology**, v.73, n.5, p.691-697, 2010.

HERZOG, K.; BOLLWEIN, H. Application of Doppler ultrasonography in cattle reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, n.s2, p.51-58, 2007.

HERZOG, K.; KOERTE, J.; FLACHOWSKY, G.; BOLLWEIN, H. Variability of uterine blood flow in lactating cows during the second half of gestation. **Theriogenology**, v.75, n.9, p.1688-1694, 2011.

JAMES, G.; DANIELA, W.; TREVOR, H.; ROBERT, T. 2014. **An Introduction to Statistical Learning: With Applications**. 121 ed. New York: R. Springer Publishing Company, Incorporated, 2014.

LONERGAN, P.; OHARA, L.; FORDE, N. Papel da progesterona do diestro na função endometrial e desenvolvimento do concepto em bovinos. **Animal Reproduction**, v.10, n.3, p.119-123, 2013.

LÜTTGENAU, J.; BEINDORFF, N.; ULBRICH, S.E.; KASTELIC, J.P.; BOLLWEIN, H. Low plasma progesterone concentrations are accompanied by reduced luteal blood flow and increased size of the dominant follicle in dairy cows. **Theriogenology**, v.76, n.1, p.12-22, 2011.

LÜTTGENAU, J.; BOLLWEIN, H. Evaluation of bovine luteal blood flow by using color Doppler ultrasonography. **Reproductive Biology**, v.14, n.2, p.103-109, 2014.

MIHM, M.; BAGUISI, A.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. **Reproduction**, v. 102, n. 1, p. 123-130, 1994.

OLIVEIRA, M.E.F.; BARTLEWSKI, P.M.; JANKOWSKI, N.; PADILHA-NAKAGHI, L.C.; OLIVEIRA, L.G.; BICUDO, S.D.; FONSECA, W.R.R.; VICENTE, W.R.R. Relationship of antral follicular blood flow velocity to superovulatory responses in ewes. **Animal Reproduction Science**, v.182, p.48-55, 2017.

PERRY, G.A.; SMITH, M.F.; ROBERTS, A.J.; MACNEIL, M.D.; GREARY, T.W. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. **Journal Animal Science**, v.85, p.684-689, 2007.

PINAFFI, F.L.V.; SANTOS, E.S.; SILVA, M.G.; MATURANA FILHO, M.; MADUREIRA, E.H.; SILVA, L.A. Follicle and corpus luteum size and vascularity as predictors of fertility at the time of artificial insemination and embryo transfer in beef cattle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n.5, p.470-476, 2015.

PUGLIESI, G.; DE MELO, G.D.; SILVA, J.B.; CARVALHÊDO, A.S.; LOPES, E.; DE SIQUEIRA FILHO, E.; SILVA, L.A.; BINELLI, M. Use of color-Doppler ultrasonography for selection of recipients in timed-embryo transfer programs in beef cattle. **Theriogenology**, v.135, p.73-79, 2019.

RIBEIRO FILHO, A de. L.; FERRAZ, P.A.; RODRIGUES, A.S.; BITTENCOURT, T.C.B.S.C.; LOIOLA, M.V.G.; CHALHOUB, M. Diâmetro do folículo no momento da inseminação artificial em tempo fixo e taxa de concepção em vacas Nelore. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, n.4, p.501-507, 2013.

RUSSELL, L. Emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.4. 2019. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans> [Acesso em: 21/01/2020].

SIDDIQUI, M.A.R.; ALMAMUN, M.; GINTHER, O.J. Blood flow in the wall of the preovulatory follicle and its relationship to pregnancy establishment in heifers. **Animal Reproduction Science**, v.113, n.1, p.287-292, 2009.

SILVA, L.A.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Relationship between vascularity of the preovulatory follicle and establishment of pregnancy in mares. **Animal Reproduction**, v.3, n.3, p.339-346, 2006.

TARSO, S.G.S.; APGAR, G.A.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E. Relationships between follicle and corpus luteum diameter, blood flow, and progesterone production in beef cows and heifers: preliminary results. **Animal Reproduction**, v.13, n.2, p. 81-92, 2016.

TARSO, S.G.S.; GASTAL, G.D.A.; BASHIR, S.T.; GASTAL, M.O.; APGAR, G.A.; GASTAL, E.L. Follicle vascularity coordinates corpus luteum blood flow and progesterone production. **Reproduction, Fertility and Development**, v.29, n.3, p.448-457, 2017.

TAYLOR, R. Interpretation of the correlation coefficient: a basic review. **Journal of Diagnostic Medical Sonography**, v.6, n.1, p.35-39, 1990.

THIJSSSEN, J.M.; HERZOG, K.; WEIJERS, G.; BROCKHAN-LUEDEMANN, M.; STARKE, A.; NIEMANN, H.; BOLLWEIN, H.; DE KORTE, C.L. Ultrasound image analysis offers the opportunity to predict plasma progesterone concentrations in the estrous cycle in cows: A feasibility study. **Animal Reproduction Science**, v.127, n.1-2, p.7-15, 2011.

VARUGHESE, E.E.; BRAR, P.S.; GHUMAN, S.S. Vascularization to preovulatory follicle and corpus luteum-a valuable predictor of fertility in dairy cows. **Theriogenology**, v.103, p.59-68, 2017.

VASCONCELOS, J.L.M.; PEREIRA, M.H.C.; MENEGHETTI, M.; DIAS, C.C.; SÁ FILHO, O.G.; PERES, R.F.G.; RODRIGUES, A.D.P.; WILTBANK, M.C. Relationships between growth of the preovulatory follicle and gestation success in lactating dairy cows. **Animal Reproduction**, v.10, n.3, p. 206-214, 2013.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O temperamento excitável em fêmeas Nelores é uma característica importante com repercussões nas concentrações de cortisol que afetam as estruturas ovarianas com menor fluxo sanguíneo folicular e redução no tamanho dos folículos pré-ovulatórios e dos corpos lúteos. Embora tais características sejam reportadas na literatura como preditores de fertilidade, a concentração de progesterona e as taxas de sincronização, ovulação e concepção não foram afetadas pelo temperamento dos animais no presente estudo.

O presente estudo, além de reforçar a importância do temperamento, incrementa os aspectos fisiológicos envolvidos com vascularização do trato reprodutivo e abre caminho para mais estudos, para compreender mais especificamente de que maneira o temperamento excitável e o estresse interferem nas estruturas ovarianas e nas condições reprodutivas de fêmeas bovinas, permitindo até extrapolar para outras espécies mamíferas, inclusive humanos.

As relações entre fluxo sanguíneo, funcionalidade e morfologia das estruturas ovarianas foram confirmadas, porém técnicas complementares de avaliação do fluxo, como avaliação da intensidade podem prover mais informações e aumentar a acurácia do exame. A partir do estudo observou-se que folículos pré-ovulatórios menores apresentam menor quantidade e intensidade de fluxo sanguíneo, menor chance de sofrer ovulação e também originam corpos lúteos menores e menos vascularizados, com fluxo sanguíneo menos intenso e menor capacidade de produzir progesterona. No entanto, tais características não levaram a uma menor taxa de concepção.

A intensidade de fluxo evidenciou correlações com características morfológicas do folículo e do CL que não foram encontradas na avaliação somente da quantidade de pixels. Esta pode ser utilizada como avaliação complementar do fluxo sanguíneo das estruturas ovarianas, devendo ser trabalhada e estudada também de maneira subjetiva e mais prática do que a contagem de pixel de tons claros para auxiliar na predição de fertilidade na rotina de programas reprodutivos.