

**DEBORAH BITTENCOURT MOTHÉ FRAGA**

**AVALIAÇÃO DE DOIS PROTOCOLOS PARA SINCRONIZAÇÃO DE  
OVULAÇÃO EM REBANHO LEITEIRO**

**Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Zootecnia, para  
obtenção do título de “Magister  
Scientiae”.**

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2001**

**DEBORAH BITTENCOURT MOTHÉ FRAGA**

**AVALIAÇÃO DE DOIS PROTOCOLOS PARA SINCRONIZAÇÃO DE  
OVULAÇÃO EM REBANHO LEITEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

**APROVADA: 23 de março de 2001.**

---

**José Reinaldo Mendes Ruas**

---

**Prof<sup>a</sup>. Simone Eliza F. Guimarães**

---

**Prof. José Domingos Guimarães  
(Conselheiro)**

---

**Prof. Eduardo Paulino da Costa  
(Conselheiro)**

---

**Prof. Ciro Alexandre Alves Torres  
(Orientador)**

A Deus, por estar sempre ao meu lado.

A meu pai Fernando (*in memoriam*), por ter sido um pai maravilhoso, pelo amor e carinho a mim dedicados, pelo exemplo de vida e ensinamentos deixados, e pelo apoio incondicional e imprescindível para a realização deste experimento.

## **AGRADECIMENTO**

A minha mãe Maria Lúcia, pelo amor, pela amizade, e pelo apoio, assumindo tantas vezes meu papel de mãe, durante a execução deste experimento.

Ao meu marido Ubiracy, pelo amor, pela compreensão, pelo apoio e incentivo.

A minha filha Carolina, razão da minha vida, minha maior conquista e a quem devo minha alegria, por existir e iluminar tanto a minha existência.

As minhas irmãs Danielle e Luciana, pelo amor, pela amizade, pelo carinho, incentivo e apoio, em todos os momentos.

Aos meus sobrinhos Fernando e Ana Luiza, pela alegria e pelo amor que muitas vezes fizeram brotar em meu coração nos momentos mais difíceis de minha vida.

Aos meus cunhados Carlos Frederico e João Carlos, pela amizade, pelo carinho e apoio sempre.

A Maria Lúcia, pelo amor, carinho e pela dedicação.

Ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização deste Curso.

A CAPES e a FAPEMIG, pelo financiamento da pesquisa e pela concessão da bolsa de estudos.

A Hoescht, pela doação de seus produtos.

Ao meu tio Cláudio, pelo apoio e pela permissão para utilização de seus animais durante o estudo.

Ao professor Ciro Alexandre Alves Torres, pela orientação, amizade, paciência e pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Aos professores José Domingos Guimarães e Eduardo Paulino da Costa, pelas valiosas sugestões, pelo apoio, pela amizade e participação na banca examinadora.

À professora Rita Flávia Miranda de Oliveira, pela colaboração na execução do experimento, e pelas sugestões ao trabalho.

Ao Dr. José Reinaldo Mendes Ruas e a professora Simone Eliza F. Guimarães, pela participação na banca examinadora.

Aos amigos e “irmãos” Vitor e Larissa, pela amizade sincera, pelas conversas intermináveis, pelo convívio, pela inestimável colaboração durante a realização do experimento e execução da tese, e pelo auxílio nos momentos de dificuldades.

A amiga Fabienne, por sua amizade sincera, pelas conversas intermináveis, pelo convívio e auxílio, nas horas mais difíceis.

Ao Breno, pelo convívio, pela amizade e valiosa colaboração, durante a realização do experimento.

Ao Alan, pelas valiosas sugestões na execução da tese.

Ao amigo Mário. pela acolhida em Viçosa, todas as vezes que precisei, pela amizade e colaboração na execução da tese.

A Leccicia, que tantas vezes me encheu de alegria com sua luz, nos momentos difíceis, da realização deste trabalho.

Aos amigos Anselmo, Jefferson, Luciene, Lívio, Carlos, Waltinho, Neto, Cleber, Cristiane e Flávia, pelo convívio e pela amizade.

A minha sogra Nilzette, pela amizade e pelo incentivo.

Aos funcionários da Fazenda do Retiro e da Cutieira, pela colaboração na realização do experimento.

A Celeste, Adilson, Raimundo, e demais funcionários do Departamento de Zootecnia, pela presteza e disposição durante o Curso.

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Deborah Bittencourt Mothé Fraga, filha de Fernando Barcelos Mothé e Maria Lúcia Bittencourt Mothé, nasceu na cidade do Rio de Janeiro, em 02 de fevereiro de 1974.

Graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em fevereiro de 1997.

De março de 1997 a março de 1998, cursou a Especialização em Reprodução Animal do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

Em setembro de 1998, iniciou o Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal de Viçosa, sob orientação do Professor Ciro Alexandre Alves Torres, concentrando seus estudos na área de Fisiologia da Reprodução.

Em 23 de março de 2001, submeteu-se à defesa de tese para a obtenção do título de “Magister Scientiae”.

## RESUMO

FRAGA, Deborah Bittencourt Mothé, M. S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2001. **Avaliação de dois protocolos para sincronização de ovulação em rebanho leiteiro.** Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres. Conselheiros: José Domingos Guimarães e Eduardo Paulino da Costa.

Objetivou-se avaliar dois protocolos para sincronização de ovulação em gado de leite. Os animais foram alocados em dois tratamentos (T1 e T2), sendo que as fêmeas do T1 receberam busarelina (análogo do GnRH) (10 $\mu$ g, Dia 0), PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (250 mg, Dia 7) e busarelina (10 $\mu$ g, Dia 9), e as fêmeas do T2 receberam semelhante tratamento, mas no lugar da segunda dose de busarelina receberam 1 mg de benzoato de estradiol (BE) no Dia 8. Os animais do T1 foram inseminados 24 horas após a segunda aplicação de busarelina e os do T2 foram inseminados 35 horas após a aplicação de benzoato de estradiol. A dinâmica folicular e a concentração de progesterona plasmática foram monitoradas em oito vacas de cada tratamento. A primeira administração de GnRH induziu a ovulação em 31% das vacas (5/16) e a atresia folicular ocorreu em 56% das vacas tratadas (9/16). A emergência de uma nova onda folicular ocorreu 1,93 $\pm$ 1,23 dias após a administração do GnRH em 87,5% das vacas (14/16). Após a administração de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  ocorreu luteólise completa em 56% das vacas (9/16). O diâmetro máximo dos folículos ovulatórios foi similar nos animais dos dois tratamentos. A ovulação dos animais do T1 foi observada

31,0 ± 8,19 horas após a aplicação do GnRH e nos do T2 decorridas 40,74 ± 3,96 horas após a aplicação do BE. Nas vacas do T1, a sincronização de ovulação ocorreu dentro de um intervalo de 20 horas após a segunda aplicação de GnRH versus a sincronização mais precisa das vacas do T2, que ocorreu dentro de 9 horas. Nesse experimento, observou-se 100% de ovulação no T1 após a aplicação do GnRH e 87,5% no T2 após a aplicação de BE. Porém, apesar dos excelentes resultados encontrados na sincronização de ovulação, as taxas de gestação obtidas nos animais deste experimento foram baixas nos dois tratamentos, no T1 foi de 16,7% e no T2 de 17,4% diagnosticadas aos 139 dias. Os folículos dominantes dos animais do experimento tiveram seus períodos de dominância prolongados, apresentando aproximadamente 7 dias nos dois tratamentos. Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que os dois tratamentos foram efetivos em sincronizar a ovulação dos animais tratados, porém resultaram em baixas taxas de gestação, provavelmente decorrente do prolongamento da duração do período de dominância que foi observado nos animais de ambos os tratamentos e que pode ter levado a queda da qualidade dos ovócitos derivados desses folículos.

## ABSTRACT

FRAGA, Deborah Bittencourt Mothé Fraga, M. S., Universidade Federal de Viçosa, March, 2001. **Evaluation of two protocols for synchronization of ovulation in dairy cattle.** Adviser: Ciro Alexandre Alves Torres. Committee members: José Domingos Guimarães and Eduardo Paulino da Costa.

The objective of this study was to evaluate two protocols in order to synchronize the ovulation in dairy cattle. The dairy cows were assigned into two treatments (T1 e T2), the animals from T1 received buserelin (10 $\mu$ g, Day 0), PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (250 mg, Day 7) and buserelin (10 $\mu$ g, Day 9), and the animals from T2 received the same treatment, but 1 mg of estradiol benzoate on day 8 replaced the injection of GnRH on day 9. The animals from T1 were inseminated 24 hours after the second buserelin and the T2 ones were inseminated 35 hours after the estradiol benzoate injection. The follicle development and the plasma progesterone concentration were monitored in eight cows of each treatment. The first administration of GnRH induced ovulation in 31% of the cows (5/16) and follicle atresia in 56% of treated cows (9/16). The emergence of a new follicle wave occurred 1.93 $\pm$ 1.23 days after GnRH administration in 87.5% of the cows (14/16). A complete luteolysis occurred after PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  administration in 56% of the cows (9/16). The ovulatory follicle maximum diameter was similar in the two treatments. The ovulation time of the animals from T1 was 31.0  $\pm$  8.19 hours after the GnRH administration and time for T2 40.74  $\pm$  3.96 hours after

BE administration. The ovulation time for the cows of T1 occurred within 20 hours from the end of treatment versus the ovulation time for the T2 cows that occurred within 9 hours in a shorter time than the first ones. The animals from T1 showed 100.0% ovulation rate after GnRH administration and 87.5% in T2, after BE administration. Despite, the excellent results of the ovulation time the pregnancy rates were low in the animals from both treatments of this experiment, being 16.7 and 17.4%, respectively, detected on day 139. The dominant follicles extended their life for about 7 days in the two treatments. Based on the results of this experiment, it is concluded that the two treatments were effective in synchronizing ovulation of the treated animals, but the low pregnancy rates, probably occurred because of the extended life of the dominant follicle from the cows of both treatments, which could be the cause of the decreased in oocytes quality of these follicles.

## ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Dinâmica folicular em bovinos.....	3
2.2. “Ovsynch”.....	5
2.3. GnRH - PGF <sub>2α</sub> - Benzoato de estradiol.....	9
2.4. Concentração de progesterona durante o ciclo estral.....	10
2.5. Duração do período de dominância do folículo pré-ovulatório.....	11
2.6. Influência dos fatores climáticos na fertilidade.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Local do experimento.....	17
3.2. Animais e alimentação.....	17
3.3. Tratamentos.....	18
3.4. Sincronização de ovulação.....	19
3.5. Avaliação ultra-sonográfica.....	19
3.6. Coleta de amostras de sangue e dosagem hormonal.....	20
3.7. Diagnóstico de gestação.....	21
3.8. Medições das temperaturas ambientais.....	21
3.9. Análise estatística .....	21

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5. CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
APÊNDICE.....	49

## 1. INTRODUÇÃO

O sucesso dos programas de inseminação artificial (IA) está diretamente relacionado com a eficiência na detecção de estros, que requer tempo e pessoal treinado. Falhas na observação e detecção do estro constituem uma das causas mais comuns da baixa fertilidade em rebanhos em que se emprega IA. Rotineiramente, a observação de estro de animais submetidos a programas de IA, utilizando o Sistema de Trimberg, é realizada diariamente em dois períodos, manhã e tarde. Entretanto, diversos trabalhos demonstram que essa prática é insuficiente, à medida que a taxa de detecção do estro é inferior a 50% (SENGER, 1994), podendo apresentar variações de 20% (verão) a 50% (inverno), nos rebanhos manejados em condições subtropicais (THATCHER et al., 1995). Além disso, as falhas na interpretação dos sinais de estro também podem contribuir para a baixa fertilidade dos animais inseminados. Isto pode ser demonstrado, utilizando-se métodos de análise de progesterona no sangue e no leite, que têm mostrado variação de 5% a 30% de animais inseminados, sem estar em estro no momento (ALVAREZ, 1990).

As dificuldades na detecção de estro têm estimulado o desenvolvimento de métodos alternativos para induzi-lo de forma controlada. As drogas mais utilizadas são os agentes luteolíticos como a prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) e análogos sintéticos que podem ou não ser associados a substâncias que prolongam artificialmente o estado funcional do corpo lúteo (progesterona e progestágenos) ou que induzam à ovulação como estrógenos, hormônio

liberador de gonadotrofinas (GnRH) e gonadotrofina coriônica humana (hCG).

Uma das formas de facilitar a detecção do estro é a utilização de protocolos de sincronização de estros, que implicam na manipulação do ciclo estral, visando agrupar em um curto período de tempo uma grande porcentagem de fêmeas, para que possam ser inseminadas cerca de 12 h após a observação dos sinais de estro. Alternativamente, pode-se utilizar inseminações em tempo pré-fixado, sem a necessidade de observação de estro (ODDE, 1990).

O uso de protocolo que permita o uso efetivo da IA em tempo pré-fixado pode melhorar a eficiência do manejo reprodutivo nos rebanhos com aptidão leiteira. Entretanto, nenhum protocolo disponível até o momento conseguiu realmente sincronizar o estro com precisão suficiente que permita sucesso da IA em tempo pré-fixado. Dessa forma, PURSLEY et al. (1995) concluem que deva ser realizada a sincronização de ovulações e não a sincronização de estros.

Pesquisadores americanos desenvolveram um protocolo experimental de sincronização de ovulação denominado “Ovsynch”, que utiliza a administração de duas doses de GnRH intercaladas com uma aplicação de  $PGF_{2\alpha}$ , com o objetivo de realização da IA em tempo pré-fixado.

A inseminação artificial em tempo pré-determinado tem a vantagem de reduzir a mão-de-obra, além de não requerer manejo para a detecção de estro. Adicionalmente, proporciona o controle do nascimento de bezerras, a fim de se obter produção de leite uniforme, ao longo do ano, ou mesmo concentrar os nascimentos em épocas determinadas. Porém, a sincronização não é amplamente utilizada, por causa do custo elevado e de seus resultados variáveis quanto às respostas dos animais (MACMILLAN, 1999).

Atualmente se utiliza o esquema de IA em tempo pré-fixado, com substituição da segunda dose de GnRH por benzoato de estradiol (BE) para reduzir os custos, viabilizando a utilização de sincronização de ovulação.

Este estudo teve como objetivo avaliar dois protocolos de sincronização de ovulação: Ovsynch e GnRH- $PGF_{2\alpha}$ -BE, quanto à eficiência e o comportamento da dominância folicular, além de verificar a influência da temperatura nos parâmetros avaliados.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Dinâmica folicular em bovinos**

Durante o ciclo estral ocorrem importantes mudanças morfológicas e fisiológicas no córtex ovariano, como: o crescimento e a atresia foliculares, a ovulação, a manutenção do corpo lúteo e a luteólise (BARROS et al., 1998).

O processo contínuo de crescimento e regressão folicular ovariana, que resulta no desenvolvimento do folículo pré-ovulatório, é conhecido como dinâmica folicular. O desenvolvimento folicular se inicia com a fase de recrutamento, onde um grupo de folículos começa a crescer sob a ação do hormônio folículo estimulante (FSH) (LUCY et al., 1992). Dentre os folículos recrutados, um se destaca e passa a crescer mais que os outros (fase de seleção). Ao mesmo tempo, há uma queda nas concentrações circulantes de FSH, inibindo o crescimento dos demais folículos (folículos subordinados) que são, ativa ou passivamente, conduzidos à regressão e à atresia. Fatores como o tamanho folicular, as concentrações de estradiol e de progesterona podem ser importantes para estabelecer qual folículo será dominante, durante a fase de seleção, que nos bovinos é o momento no qual um folículo estrógeno-ativo promove seu crescimento e inibe o crescimento dos demais. O folículo selecionado passa a ser dependente do hormônio luteinizante (LH) e continua a se desenvolver até tornar-se dominante, impedindo o recrutamento de um novo grupo de folículos (fase de dominância) (GINTHER et al., 1996).

Para que o folículo dominante ovule, é essencial que ocorra a regressão do corpo lúteo, com conseqüente queda nas concentrações plasmáticas de progesterona. Se a luteólise ocorre na presença de um folículo dominante em crescimento, haverá a ovulação (LUCY et al., 1992; GINTHER et al., 1996).

Em bovinos e ovinos a luteólise é causada pela produção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  endometrial (Horton e Poyser, 1975, citados por BARROS et al., 1998), cujo sinal hormonal de sua liberação é o estradiol dos folículos ovarianos. O folículo ovulatório produz estradiol em concentrações críticas que estimulam o hipotálamo a aumentar a freqüência e amplitude dos pulsos de GnRH e, conseqüentemente, a freqüência e amplitude dos pulsos de LH e FSH, que completarão a maturação folicular, culminando em um pico estrogênico, principalmente de  $17\beta$ -estradiol. Aproximadamente 24 horas após, observa-se o estro, seguido do pico ovulatório de LH (WALTERS e SCHALLENBERGER, 1984).

Em vacas, o desenvolvimento folicular ocorre em forma de ondas que, normalmente, se apresentam em número de duas ou três por ciclo estral. A maioria das raças européias apresenta duas (PIERSON e GINTHER, 1989) ou três (SAVIO et al., 1988) ondas de desenvolvimento folicular e, raras vezes, podem também ser observadas uma ou quatro ondas (SAVIO et al., 1988). Em fêmeas da raça Nelore, ocorre o predomínio de duas ondas foliculares para as vacas, enquanto nas novilhas, há maior freqüência de três ondas (BARROS et al., 1995). Nas fêmeas da raça Gir (vacas) e mestiças Girolando (vacas e novilhas), foi observado o predomínio de três ondas foliculares (BARROS et al., 1997).

Para os ciclos de duas ondas, o primeiro folículo dominante é anovulatório, e o segundo, ovulatório. No caso de três ondas, apenas o último folículo dominante é ovulatório. Na espécie bovina, o surgimento das ondas foliculares ocorre aproximadamente a cada dez dias (varia de seis a quinze dias), sendo verificadas nos dias 0 (dia da ovulação) e 10 e 0, 9 e 16, para os ciclos com duas e três ondas, respectivamente (GINTHER et al., 1989). O número de ondas por ciclo parece estar associado com o comprimento do ciclo estral e com a duração da fase luteínica (FORTUNE, 1993).

## 2.2. “Ovsynch”

BROWN e REEVES (1983) demonstraram a ausência de receptores para GnRH no ovário bovino e, posteriormente, descobriu-se que o GnRH e seus análogos agem diretamente induzindo a liberação de LH e FSH, que promovem alterações no desenvolvimento dos folículos ovarianos e do corpo lúteo. A administração do GnRH aumenta as concentrações plasmáticas de LH e FSH de 2 a 4 horas após sua aplicação (CHENAULT et al., 1990).

No final da década de oitenta, quando o advento da ultra-sonografia permitiu a caracterização do desenvolvimento folicular bovino, THATCHER et al. (1989) utilizaram um análogo do GnRH para alterar a dinâmica folicular e forneceram a base para o desenvolvimento de um novo sistema de sincronização do estro.

Com base nesses estudos, pesquisadores americanos desenvolveram um protocolo experimental de sincronização de ovulação denominado “Ovsynch”, que utiliza uma aplicação de  $PGF_{2\alpha}$  em animais previamente tratados (6 a 7 dias) com GnRH. O tratamento com GnRH realizado em qualquer fase do ciclo estral pode induzir à ovulação do folículo funcionalmente dominante (quando na fase de crescimento ou na fase estática) ou a atresia (fase de regressão folicular), resultando na emergência de nova onda de crescimento folicular, cerca de 2 a 3 dias após sua administração (BADINGA et al., 1994, WOLFENSON et al., 1994, PURSLEY et al., 1995, SCHMITT et al., 1996). A emergência dessa onda folicular está relacionada à liberação de FSH induzida pelo GnRH, que ocorre dentro de 2 a 4 horas após o tratamento hormonal, e pelo efeito desse hormônio em promover a ovulação ou atresia do folículo dominante. Desse modo, a associação desses eventos leva a aumento da concentração de FSH, que promove o recrutamento de uma nova onda (TWAGIRAMUNGU et al., 1995a). Assim, o GnRH sincroniza o padrão de desenvolvimento folicular, levando à homogeneidade no estágio de desenvolvimento dos folículos ovarianos no momento da indução da luteólise. Conseqüentemente, a precisão na detecção do estro e a sincronização do pico de LH entre os animais são melhorados significativamente (TWAGIRAMUNGU et al., 1992a).

A aplicação de análogos do GnRH promove o crescimento dos folículos de tamanho intermediário (3,6 a 8,5 mm) que na maioria dos casos se tornam atresícos. Esse efeito provavelmente ocorre pela falta de suporte gonadotrófico promovido pelo GnRH, já que o aumento do FSH induzido pelo tratamento com agonistas de GnRH ocorre momentos após a sua aplicação (CHENAULT et al., 1990) ou após a remoção do folículo dominante (KO et al., 1991).

A manifestação do estro em bovinos está associada a concentrações de progesterona inferiores a 1ng/mL, bem como a presença de um folículo dominante com diâmetro superior a 9mm. Esse folículo produz 17 $\beta$ -estradiol em elevadas concentrações, sendo responsável pelo feedback positivo no eixo hipotálamo-hipofisário, culminando na liberação de GnRH e na onda pré-ovulatória de LH, que leva à ovulação do folículo dominante (SIROIS e FORTUNE, 1988).

THATCHER et al. (1989) e TWAGIRAMUNGU et al. (1992b) verificaram que os análogos do GnRH promovem redução na ocorrência espontânea de estro no período de 6 a 7 dias após o tratamento hormonal. Os estudos ultrassonográficos e histológicos mostram que isso ocorre por causa de alterações funcionais no maior folículo presente no período de tratamento. O maior folículo ovula ou torna-se atresíco (dependendo de seu estágio de desenvolvimento) em resposta ao tratamento com o GnRH, inibindo a ocorrência de estros espontâneos (TWAGIRAMUNGU et al., 1994). A ovulação não ocorre em todos os casos após o tratamento com GnRH, pois esse tratamento altera o diâmetro do maior folículo somente durante a fase de crescimento ou na fase estática, porém não durante a fase de regressão. Assim, a habilidade do folículo em ovular depende do estágio de desenvolvimento no início do tratamento (SILCOX et al., 1993). Corroborando, ROLLOSSON et al. (1994) observaram diminuição no número de receptores para LH do folículo dominante nas fases estática e de regressão, o que se acentua com o início da ocorrência de atresia folicular. Esses eventos explicam por que a ovulação não ocorre em muitos casos.

Para o sucesso do protocolo de sincronização “Ovsynch”, é particularmente crítica a ovulação de um dos folículos após a primeira aplicação de GnRH, na fase luteal do ciclo estral. Caso o folículo não ovule durante esse período, o animal pode ciclar normalmente e retornar ao estro

antes da segunda aplicação de GnRH, o que leva ao insucesso do protocolo (PURSLEY et al., 1997a).

Após o tratamento com GnRH, nova onda de crescimento folicular surge dentro de 3 a 4 dias, em função do aumento transitório do FSH que ocorre após 2 a 4 horas da aplicação do hormônio, e, ou, em consequência do efeito de um aumento atrasado nas concentrações de FSH que ocorre depois de 1 a 2 dias após o desaparecimento do folículo dominante, que contém fatores inibidores de FSH como a inibina (TWAGIRAMUNGU et al., 1994).

A remoção do maior folículo por meio da ovulação ou atresia estimula em seguida o crescimento de folículos médios (CHENAULT et al., 1990, TWAGIRAMUNGU et al., 1994). Subseqüentemente ocorre aumento na proporção de atresia dos folículos médios que tiveram crescimento induzido pelo GnRH. A atresia ocorre provavelmente em razão da falta de suporte de gonadotropinas (CHENAULT et al., 1990 e KO et al., 1991). Além disso, esse aumento no nível de atresia decorre do processo corrente de seleção do folículo dominante, que ocorre nesse período.

O recrutamento independe da fase do ciclo estral no momento da administração hormonal, bem como, se houve ou não ovulação induzida pelo GnRH. Conseqüentemente, a precisão do estro após o tratamento com o luteolítico e a sincronia do surgimento do pico de LH entre os animais são aumentados. De fato, o pré-tratamento com agonista do GnRH 6 a 7 dias antes da luteólise produzida pela  $PGF_{2\alpha}$  resulta na sincronização de estro entre 70 a 83% das vacas dentro de um período de quatro dias (TWAGIRAMUNGU et al., 1995a).

Pesquisas demonstram que o destino dos folículos selecionados após o tratamento com GnRH e  $PGF_{2\alpha}$  depende do grau de luteólise induzida. Assim, quando a luteólise for completa (concentrações de progesterona abaixo de 1ng/mL), o estro e a subseqüente ovulação ocorrem, fazendo com que a concentração de estradiol seja reduzida. Em contraste, quando a luteólise é imperfeita e a concentração de progesterona está acima de 1ng/mL, o estro não ocorre e a concentração elevada de estradiol é mantida, uma vez que o folículo dominante torna-se persistente. Concentração subluteal de progesterona por período prolongado está associada ao aumento da freqüência de pulsos de LH, à inibição da ocorrência da onda pré ovulatória de LH, e ao

desenvolvimento de folículos dominantes persistentes. Desse modo, a falta de sincronia em muitos animais não é causada pelo desenvolvimento impróprio dos folículos, mas sim por luteólise imperfeita (TWAGIRAMUNGU et al., 1994).

Alguns animais podem apresentar estro no intervalo das aplicações do GnRH e da PGF<sub>2α</sub>. Entretanto, a maioria dos animais (60 a 70%) é detectada em estro nos quatro primeiros dias após a aplicação de PGF<sub>2α</sub> (TWAGIRAMUNGU et al., 1995a, THATCHER et al., 1995). A sincronia do estro e da ovulação pode ser aumentada consideravelmente (>90%) após a administração de uma segunda dose de GnRH, cerca de 24 a 48 horas após a PGF<sub>2α</sub>. Esta aplicação concentra as ovulações dentro de um período de 8 a 12 horas, permitindo a realização da IA com tempo fixo cerca de 16 a 24 horas após a segunda dose de GnRH. A associação de duas aplicações de análogos de GnRH com o agente luteolítico, como proposto por PURSLEY et al. (1994), aumenta a precisão do surgimento do estro com conseqüente aumento da taxa de fertilidade, quando comparado com outros métodos de sincronização que utilizam a inseminação artificial em tempo pré-determinado.

PURSLEY et al. (1997 a e b) não encontraram diferenças na taxa de gestação de vacas leiteiras após a utilização do protocolo de sincronização “Ovsynch” com a inseminação artificial em tempo pré-fixado, e a inseminação após a observação de estro. Também, não acharam diferença na taxa de fertilidade e houve redução média de 19 dias no intervalo parto-concepção, quando se comparou o Ovsynch com os manejos reprodutivos clássicos. Todavia, a sincronização não é amplamente utilizada, dado o custo elevado e a variabilidade nas respostas individuais (MACMILLAN, 1999). Dentre os fatores que determinam o valor econômico da sincronização de ovulação, estão a mão-de-obra, as drogas utilizadas na sincronização e o custo do sêmen ou da monta natural (Pace, 1985, citado por ODDE, 1990). A inseminação artificial em tempo pré-determinado tem a vantagem de reduzir a mão-de-obra, além de não requerer manejo para a detecção do estro. A sincronização ganha importância para manejo do gado com aptidão leiteira, ao minimizar o trabalho de observação do estro, além de controlar o nascimento de bezerros, permitindo a obtenção de produção de leite uniforme ao longo do ano, ou

mesmo concentrando os nascimentos em épocas de melhores preços para o leite.

### **2.3. GnRH – PGF<sub>2α</sub> – Benzoato de estradiol**

Outro protocolo de sincronização de ovulação com emprego de IA em horários pré-fixados é a substituição da segunda dose de GnRH pelo estradiol, propiciando o controle das ondas foliculares e a indução da ovulação (MARTINEZ et al., 1999). Segundo BARROS e FERNANDES (1998), a substituição da segunda dose de GnRH pelo benzoato de estradiol (BE), associada a IA cerca de 30 a 34 h após o BE, resultou em taxa de prenhez similar àquela obtida com a segunda aplicação do GnRH, com a vantagem de o custo do BE ser inferior ao do GnRH, o que reduz o custo total do tratamento, viabilizando sua utilização em rebanhos comerciais. FERNANDES et al. (1997), usando os protocolos GnRH-PGF<sub>2α</sub>-GnRH e GnRH-PGF<sub>2α</sub>-BE, sincronizaram a ovulação e realizaram a IA pré-fixada, obtendo-se taxa de prenhez de 45% para os dois tratamentos.

LEMASTER et al. (1999), trabalhando com novilhas, concluíram que o benzoato de estradiol acelera ocorrência e reduz o tempo de ovulação, quando comparado aos animais que receberam progesterona e prostaglandina. Isso se deve ao fato de o benzoato de estradiol agir como estímulo primário para a onda pré ovulatória de LH, antecipando a ovulação em bovinos (HENRICKS et al., 1971, SHORT et al., 1973, CHRISTENSEN et al., 1974, CASTILHO et al., 1998). Há relatos de que estrógenos exógenos induzem a liberação de LH entre 16 e 20 horas após sua administração (BO et al., 1994), e é eficiente na indução da ovulação em presença de um folículo dominante (SANTOS et al., 1997).

## 2.4. Concentração de progesterona durante o ciclo estral

Após a ovulação, o tecido folicular remanescente inicia um processo de reorganização para formar o corpo lúteo, cuja função primária, de produzir progesterona, é fundamental para os processos reprodutivos (BORGES, 1999).

As concentrações plasmáticas de progesterona aumentam entre o 3<sup>o</sup> e o 7<sup>o</sup> dia do ciclo estral (dia 0 = estro), alcançando valores máximos no 10<sup>o</sup> dia e mantendo-se elevadas até o 17<sup>o</sup> dia. Nos animais em que não ocorre a concepção, observa-se a ocorrência de luteólise, e a concentração plasmática de progesterona retorna aos valores observados durante os quatro primeiros dias do ciclo estral (VACA et al., 1983).

A concentração de progesterona varia durante o ciclo estral, com valores abaixo de 1 ng/mL nos dias próximos ao estro, e aumento pronunciado da concentração a partir do quarto dia do ciclo, até valores entre 3,6 e 7,6 ng/mL registrados entre os dias 7 e 15 do ciclo estral (ADEYEMO e HEATH, 1980, JIMÉNEZ et al., 1988), com relatos de valores extremos na literatura, variando de 2,3 (AGARWAL et al., 1977) a 16,0 ng/mL (BADINGA et al., 1994).

Segundo VACA et al. (1983), a concentração de progesterona fica abaixo de 0,5 ng/mL durante os quatro primeiros dias do ciclo, logo após aumenta progressivamente e atinge valor máximo nos dias nove e dez, continuando com pequena variação até o dia 16. A concentração de progesterona começa a diminuir no dia 17 e, próximo ao dia 18, atinge valor similar àquele observado nos quatro primeiros dias do ciclo.

O tratamento com análogo de GnRH leva a aumento na concentração de progesterona plasmática três dias após sua aplicação (WOLFENSON et al., 1994), dada a luteinização dos grandes folículos e ao efeito luteotrópico do LH induzido pelo GnRH nas pequenas células luteínicas, transformando-as em grandes células luteínicas. Em vacas, os receptores luteais de  $PGF_{2\alpha}$  encontram-se localizados principalmente nas grandes células luteínicas, e o aumento no número dessas células indica que os corpos lúteos dos animais tratados com buserelina devem apresentar luteólise mais completa após a aplicação de  $PGF_{2\alpha}$  (TWAGIRAMUNGU et al., 1995b).

De acordo com TWAGIRAMUNGU et al. (1992b e 1994), a ocorrência de ovulação após os tratamentos com GnRH e PGF<sub>2α</sub> depende do grau de luteólise induzida que foi alcançado. Quando a luteólise é completa (progesterona < 1,0 ng/mL), ocorre o estro e a subsequente ovulação do folículo dominante selecionado. Em contraste, quando a luteólise é incompleta (progesterona > 2,0 ng/mL - 10 a 20% das vacas), o estro não ocorre e o folículo dominante torna-se persistente.

STOCK e FORTUNE (1993) afirmam que a concentração plasmática de progesterona regula o padrão de crescimento folicular por meio de feedback negativo à secreção de LH. Assim, quando a concentração de progesterona atinge valores baixos (1,5-2,3 ng/mL), não ocorre a ovulação do folículo dominante e, se ocorre o inverso, o folículo permanece em crescimento.

## **2.5. Duração do período de dominância do folículo pré-ovulatório**

STOCK e FORTUNE (1993) observaram que a onda de LH é suprimida quando a progesterona é mantida em baixa concentração para prolongar a dominância folicular, e TAFT et al. (1996) mostraram que a frequência dos pulsos de LH é importante na manutenção do folículo dominante, e a extensão com que a progesterona inibe a secreção de LH determina a duração da dominância folicular.

BIGELOW et al. (1997) relataram que vacas tratadas com progesterona, a fim de se manter concentração subluteal de progesterona para prevenir a ovulação e prolongar o ciclo estral, desenvolveram folículos dominantes que cresceram por período de tempo prolongado. A concentração plasmática de estradiol e a frequência pulsátil de LH estiveram aumentadas durante o prolongamento da dominância folicular, e a fertilidade foi comprometida após a ovulação de folículos dominantes persistentes. Os mesmos autores observaram que folículos dominantes persistentes em novilhas tratadas com dispositivo intravaginal de liberação de progesterona (CIDR) tiveram maior persistência, atingiram maior diâmetro, apresentaram maior número de células da granulosa e teca interna que os folículos dominantes das novilhas controle. BIGELOW et al. (1997) observaram que o aumento na frequência pulsátil de

LH pode induzir a luteinização prematura em folículos dominantes persistentes, o que pode contribuir para reduzir a fertilidade de vacas em que esses folículos ovularam.

O tempo ideal entre o início do período de dominância e a ovulação não é conhecido; porém, observa-se redução na fertilidade, quando ocorre período de dominância superior a 4 dias (MIHM et al., 1994). A dominância de 4 a 8 dias provocou queda progressiva na qualidade do ovócito e quando ultrapassou 10 dias levou a uma taxa de gestação de 0%.

A persistência do folículo dominante resultou em queda significativa na taxa de gestação de 65% para 37% em vacas com aptidão leiteira (Savio et al., 1992, citado por MIHM et al. 1994), e de 75 para 40% em vacas e novilhas com aptidão para produção de carne (SANCHEZ et al., 1993).

STOCK e FORTUNE (1993) concluíram que pequenos aumentos na frequência pulsátil de LH promovem prolongamento do crescimento e da dominância folicular, associados com aumento do estradiol plasmático. Porém, esse aumento na secreção pulsátil de LH não atinge o padrão normal para o final da maturação do folículo pré-ovulatório. Este estudo também conclui que o crescimento folicular prolongado está associado com baixa fertilidade. Mantendo-se a concentração plasmática de progesterona entre 1-2 ng/mL, isto é, em valor subluteal, não ocorre a formação de ondas foliculares contínuas, mas há o prolongamento do crescimento do folículo dominante da última onda, que é acompanhado por elevadas concentrações periféricas de  $17\beta$ -estradiol e pela ausência completa de outros folículos de 5 mm ou maiores. Os autores observaram que os corpos lúteos derivados dos folículos dominantes persistentes sintetizam a progesterona em concentração normal e, dessa forma, a baixa fertilidade não pode ser atribuída à insuficiência luteal.

MIHM et al. (1994) compararam a taxa de gestação entre animais tratados ou não (controle) com progestágenos, para prolongar o período de dominância folicular e obtiveram maior taxa de prenhez para o grupo controle (77%) que para os animais tratados (23%). Neste estudo, a ovulação dos folículos dominantes persistentes levou à formação de corpos lúteos funcionais, questionando-se a qualidade dos ovócitos provenientes de folículos dominantes persistentes.

A resposta para este questionamento foi dada por REVAH e BUTLER (1996) quando aspiraram ovócitos derivados de folículos dominantes persistentes e observaram que os *cumulus oophorus* se expandiram, os cromossomos se condensaram e a meiose progrediu para metáfase II antes da onda de LH, levando-os a concluir que os ovócitos maturaram prematuramente *in vivo*.

Em ratos, o atraso da ovulação do folículo pré-ovulatório por dois dias resultou em redução das taxas de fertilidade, das taxas de implantação, aumento da ocorrência de morte embrionária precoce e elevação da incidência de anormalidades cromossômicas por causa de alterações no ovócito pré-ovulatório (Fugo e Butcher, 1966 e Butcher e Fugo, 1967, citados por REVAH e BUTLER, 1996). Adicionalmente, AHMAD et al. (1995) relataram que embriões obtidos de vacas que ovularam folículos dominantes persistentes apresentaram baixa qualidade, reduzindo a probabilidade de alcançarem o estágio de 16 células.

## **2.6. Influência dos fatores climáticos na fertilidade**

Os mamíferos são homeotérmicos e, por isso, são capazes de manter a temperatura corporal relativamente constante, apesar das variações térmicas ambientais. Esta capacidade de mantê-la estável é fundamental para reações bioquímicas e processos fisiológicos associados ao metabolismo (GWAZDAUKAS, 1985).

As mensurações térmicas ambientais podem ser indicativas quanto à caracterização do ambiente térmico animal (GWAZDAUKAS, 1985).

Vários fatores climáticos, como: temperatura, umidade, radiação e ventos, afetam o “ambiente animal”. As variações nesses fatores, que alteram a transferência de calor entre o animal e o ambiente, podem levá-lo à condição de estresse, prejudicando assim a sua fertilidade (GWAZDAUKAS, 1985), em razão de alterações na maturação dos ovócitos, no desenvolvimento embrionário e na função uterina, prejudicados na função metabólica.

Os bovinos, dependendo da raça e do nível de produção, possuem uma zona térmica considerada ótima para seu desempenho (zona de conforto).

Para as raças com aptidão leiteira, o limite superior da zona de conforto situa-se entre as temperaturas ambiente de 18 a 21°C, nas quais a temperatura corporal mantém-se constante, com o mínimo de esforço do sistema termorregulador, podendo maximizar a eficiência de produção e reprodução (MULLER, 1989). Numa maior amplitude da temperatura ambiente (5 a 25 °C), conhecida como zona termoneutra, os animais mantêm a homeotermia por meio de trocas de calor com o ambiente, utilizando-se de mecanismos fisiológicos, comportamentais e metabólicos.

A sensação de conforto, no entanto, também está relacionada com a umidade do ar. A temperatura ambiente associada à umidade relativa do ar são combinadas num indicador de conforto térmico conhecido por Índice de Temperatura e Umidade (THI) (MACHADO, 1998). Este índice é utilizado como guia para determinar o estresse calórico em gado com aptidão leiteira (ARMSTRONG, 1994). O THI entre 64 e 71 não indica estresse para os animais, porém superior a 72 é indicativo de estresse térmico, e, a partir de 76, há queda acentuada na produção animal, valores superiores a 80 indicam estresse moderado, enquanto, acima de 90, estresse severo. Como consequência do estresse térmico, os animais apresentam menor desempenho reprodutivo, com taxas de concepção inferiores a 20% (MACHADO, 1998).

INGRAHAM et al. (1976) afirmaram que o THI nos dois dias que antecedem a inseminação artificial é de grande importância para a fertilidade dos animais, apesar dos índices climáticos registrados até onze dias antes da cobertura estarem relacionados com a taxa de concepção.

Segundo WOLFENSON et al. (2000), o estresse térmico provocado pelas altas temperaturas no verão é o fator que mais contribui para a baixa fertilidade das vacas leiteiras nesta estação do ano. Esse fato constitui um problema mundial, provocando grandes perdas econômicas e afetando aproximadamente 60% do gado com aptidão leiteira mundial.

Segundo BADINGA et al. (1994), embora as vacas com aptidão leiteira ovulem e sejam inseminadas ou cobertas por monta natural durante todo ano, diferenças sazonais marcantes podem ser observadas em ambientes tropicais ou subtropicais. As taxas de concepção no gado leiteiro são consideravelmente mais baixas no verão que na primavera e no inverno. O estresse térmico pode reduzir a fertilidade agindo no ambiente endócrino e, ou, no embrião.

O estresse térmico afeta a reprodução de vacas com aptidão leiteira, inicialmente provocando dificuldade na dissipação de calor, com elevação na temperatura corporal (PUTNEY, 1988) e na temperatura uterina, criando um ambiente hostil para o embrião, o que compromete a produção de fatores do reconhecimento da gestação e a secreção de proteínas e prostaglandinas pelo endométrio, podendo levá-lo à morte (COLLIER, 1982, MALAYER, 1988, PUTNEY, 1988).

A temperatura também pode afetar a qualidade dos ovócitos. Assim, o desenvolvimento folicular dura um período de 60 dias, e qualquer estresse pode interferir na taxa de fecundação por até dois meses posteriormente ao evento (COLLIER, 1982). A dominância do maior folículo fica suspensa durante o estresse térmico e a capacidade esteroidogênica das células da teca e da granulosa são comprometidas (WOLFENSON et al., 2000). Esses fatos podem ter importante significado fisiológico, porque a emergência prematura de folículos pré-ovulatórios pode resultar na ovulação de folículos excessivamente maduros, isto é, que podem ter concluído a meiose prematuramente e, ou, que estejam em processo de degeneração. A duração do período de dominância do folículo pré-ovulatório é negativamente correlacionada com a fertilidade em vacas leiteiras (MIHM et al., 1994). Essa queda na qualidade dos ovócitos pode explicar a baixa fertilidade das vacas com aptidão leiteira no início do período de outono, apesar da temperatura ser mais amena.

Segundo WOLFENSON et al. (2000), protocolos de manipulação hormonal que permitam a inseminação artificial em tempo pré-fixado podem aumentar a taxa de gestação e reduzir o número de dias em aberto durante o verão. Isso se deve ao fato de que o estresse calórico reduz a duração e a intensidade do estro, levando a redução no número de vacas detectadas em estro. Por isso, uma estratégia, para reduzir o impacto do estresse calórico na reprodução bovina, seria a utilização de inseminação artificial em horário pré-determinado, eliminando a necessidade de detecção de estro antes da inseminação, não sendo importante nem fator limitante a baixa eficiência na detecção de estro no verão (ARÉCHIGA et al., 1998).

Assim, DE LA SOTA et al. (1998) utilizaram o tratamento "Ovsynch" em rebanhos leiteiros no verão da Flórida e obtiveram maior taxa de gestação nas vacas tratadas (27,0 %) que no grupo controle (16,5 %). Embora o protocolo de

inseminação artificial em tempo pré-fixado melhora o manejo reprodutivo no verão, não protege o embrião dos efeitos deletérios das altas temperaturas, porém elimina as limitações de manejo impostas pelo estresse térmico na detecção de estro (DE LA SOTA et al. 1998 e WOLFENSON et al., 2000).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Local do experimento**

O experimento foi conduzido em duas propriedades rurais, na Fazenda Cutieira, localizada no município de Além Paraíba e na Fazenda do Retiro, localizada no município de Santo Antônio do Aventureiro, ambas na região da Zona da Mata do estado de Minas Gerais, no período de 1<sup>o</sup>/12/1999 a 02/05/2000.

Embora as propriedades se encontrem em municípios distintos, estes são vizinhos e as fazendas são próximas, com condições climáticas semelhantes.

#### **3.2. Animais e alimentação**

Foram utilizadas 47 vacas com grau de sangue variando de meio sangue Holandês-zebu a holandesas puras por cruza (HPC) não-gestantes, com o mínimo de 50 dias de pós-parto e pelo menos um estro observado após o parto. As vacas foram previamente selecionadas por exame ginecológico, realizado por palpação via transretal e avaliação do muco por vaginoscopia. O histórico clínico dos animais foi analisado desde o final do período seco, descartando-se todos os animais que apresentaram parto distócico,

acompanhado ou não de retenção de placenta, distúrbios de origem metabólica e diferentes graus de endometrite puerperal, diagnosticados clinicamente.

O manejo nutricional das fêmeas foi em regime semi-intensivo, com suplementação volumosa fornecida duas vezes ao dia, utilizando-se silagem de milho, e pasto de braquiária no período em que não estavam no estábulo. A ração concentrada foi fornecida misturada ao volumoso na proporção de 1 kg de concentrado (22% PB) para cada 3,0 kg de leite produzido. Os animais foram alimentados em lotes, atendendo-se às exigências de manutenção e produção. O sal mineralizado e a água estiveram disponíveis à vontade (“ad libitum”).

As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia, às 6 h e às 15 h, respectivamente.

### **3.3. Tratamentos**

Dos 47 animais utilizados no experimento, 12 foram da Fazenda Cutieira e 35 da Fazenda do Retiro, permanecendo esses animais nas respectivas fazendas, durante todo o período experimental. As 12 fêmeas da Fazenda Cutieira foram divididas, sendo seis para o T1 e seis para o T2. Na Fazenda do Retiro, as 35 vacas foram divididas entre os dois tratamentos, sendo 17 para o T1 e 18 para o T2. Dos animais da Fazenda do Retiro, foram selecionadas aleatoriamente oito vacas de cada tratamento para realização de ultrasonografia e dosagem hormonal. Os animais das duas propriedades foram distribuídos igualmente em dois tratamentos: 1) No T1 (n=24, sendo 7 da Fazenda Cutieira e 17 da Fazenda do Retiro), os animais foram tratados segundo o protocolo de sincronização de ovulação (Ovsynch), e oito vacas deste tratamento foram submetidas à ultrasonografia e coleta diária de sangue para dosagem de progesterona; 2) no T2 (n=23, sendo 5 da Fazenda Cutieira e 18 da Fazenda do Retiro), os animais foram tratados segundo o protocolo de sincronização de ovulação por GnRH-PGF<sub>2α</sub>-BE, e também foram utilizadas oito vacas desse tratamento para realização de ultrasonografia e coleta diária de sangue para dosagem de progesterona. Assim, 16 e 15 vacas de T1 e T2, respectivamente, foram avaliadas somente em relação à fertilidade.

### 3.4. Sincronização de ovulação

O protocolo de sincronização de ovulação (Ovsynch) utilizado no tratamento 1 foi:

1. Aplicação intramuscular (IM) de 10 µg de acetato de buserelina (análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas GnRH), sem o conhecimento da fase do ciclo estral (dia zero).
2. Aplicação IM de 250 mg de PGF<sub>2α</sub> sete dias após a buserelina.
3. No nono dia, foi aplicada a segunda dosagem de acetato de buserelina (10 µg) pela via IM.

Todas as aplicações de hormônios foram realizadas às 17 h.

4. A inseminação foi realizada por um único técnico, 24 horas após a terceira aplicação hormonal (17 h), no décimo dia, sem o monitoramento do comportamento estral.

No Tratamento 2, o protocolo de sincronização de ovulação (GnRH-PGF<sub>2α</sub>-BE) consistiu de:

1. Idem ao tratamento 1.
2. Idem ao tratamento 1.
3. No oitavo dia, foi aplicado 1,0 mg de benzoato de estradiol pela via IM.  
Todas as aplicações de hormônios foram realizadas às 20 h.
4. A inseminação foi realizada 35 horas após a terceira aplicação hormonal, às 7 h do décimo dia, sem o monitoramento do comportamento estral.

### 3.5. Avaliação ultra-sonográfica

Com o objetivo de observar o efeito dos tratamentos (T1 e T2) sobre a dinâmica folicular, foram realizados exames ultra-sonográficos pela via transretal, utilizando-se um aparelho de ultra-som portátil da marca Pie-Medical, modelo ScanVet 200, acoplado a um transdutor linear de 7,5 MHz.

Os animais de cada tratamento foram subdivididos em dois lotes, sendo esses lotes examinados em dias alternados. O primeiro exame ultra-sonográfico foi realizado no dia da aplicação da primeira dose de GnRH.

Posteriormente, os exames foram realizados a cada 48 horas para avaliação da dinâmica folicular, registrando-se os diâmetros máximos do maior e do segundo maior folículos presentes em cada ovário, o número de folículos  $\geq 4$  mm, a presença de outros folículos  $< 4$  mm e a presença ou ausência de corpo lúteo (cavitário ou não). Após a segunda aplicação do GnRH ou do BE, a ultra-sonografia foi realizada a cada 6 horas, com o objetivo de identificar o momento da ovulação.

O diâmetro máximo foi definido como o maior diâmetro medido entre dois pontos da cavidade antral de folículos (SIROIS e FORTUNE, 1988).

O folículo dominante da onda foi definido como aquele que cresceu até no mínimo 8 mm e excedeu o diâmetro de todos os outros folículos da onda (BARROS et al., 2000).

O dia de origem ou emergência de uma nova onda foi determinado como o dia em que, pela primeira vez, foi detectado um folículo de 4-5 mm, que, posteriormente, foi identificado como folículo dominante. Caso esse folículo não tenha sido observado antes de ter atingido 6 ou 7 mm, o dia anterior foi designado como seu dia de origem (BARROS et al., 2000).

A ovulação foi determinada pelo desaparecimento do folículo considerado dominante, sendo que o horário da ovulação foi determinado como a média entre a hora em que foi visto pela última vez e a hora em que pela primeira vez não foi mais observado pelo exame ultra-sonográfico (BARROS et al., 2000). Os folículos que ovularam até 48 horas após a primeira aplicação de GnRH foram considerados responsivos ao primeiro tratamento com o GnRH.

### **3.6. Coleta de amostras de sangue e dosagem hormonal**

As amostras de sangue para dosagem de progesterona plasmática ( $P_4$ ) foram feitas por punção da veia ou artéria coccígea, diariamente, utilizando-se tubos a vácuo contendo EDTA como anticoagulante.

O sangue foi centrifugado a 2.400 rpm, por 10 minutos, e o plasma obtido foi armazenado e congelado a  $-18^\circ\text{C}$ , até o momento das dosagens.

A dosagem de  $P_4$  foi realizada pelo método de radioimunoensaio em fase sólida, utilizando-se kits comerciais.

### **3.7. Diagnóstico de gestação**

O diagnóstico de gestação foi realizado 139 dias após a inseminação artificial, por meio de exame ultra-sonográfico.

### **3.8. Medições das temperaturas ambientais**

A temperatura ambiente foi monitorada durante o período do experimento em que foram realizadas as sincronizações de ovulação, realizando-se leituras a cada duas horas, de 6 h às 18 h. Mediu-se a temperatura de globo negro, de bulbo seco (BS) e de bulbo úmido, cujos valores foram utilizados para o cálculo do índice de temperatura e umidade (THI), seguindo a fórmula abaixo, citada por BACCARI (1998):

$THI = TS - 0,55 (1 - UR) (TS - 58)$ , sendo

TS = temperatura em °F (Fahrenheit), e

UR = Umidade relativa.

As temperaturas máximas e mínimas foram medidas diariamente às seis horas da manhã.

### **3.9. Análise estatística**

As variáveis qualitativas, vacas com ovulação sincronizada após a segunda aplicação de GnRH ou de benzoato de estradiol e taxa de gestação foram analisadas por análise de dados em tabela de contingência e testadas por meio do teste de qui-quadrado, considerando-se o nível de 5% de significância. As variáveis quantitativas, diâmetro do maior folículo, tempo decorrido entre a aplicação de PGF<sub>2α</sub> e a ovulação, o tempo decorrido entre a segunda aplicação de GnRH ou de benzoato de estradiol e a ovulação, e o intervalo da inseminação à ovulação foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) e as médias testadas pelo teste F (Student Newman Keuls), a 5% de probabilidade.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros reprodutivos e seus resultados são apresentados na Tabela 1. A taxa de ovulação após a primeira administração de GnRH foi de 31%, ou seja, 5 de 16 vacas ovularam. Resultados similares da ordem de 33% de ovulação após a primeira aplicação de GnRH, utilizando Ovsynch em vacas da raça Nelore, foram observados por BARROS et al. (2000), contudo, em um segundo experimento, obtiveram 60% de ovulação após a primeira aplicação de GnRH, que foi superior ao obtido neste experimento. Também, VASCONCELOS et al. (1999) obtiveram 64% de ovulação após a primeira aplicação de GnRH em vacas tratadas segundo o protocolo “Ovsynch”, e sugeriram que a grande variação nas respostas depende do estágio do ciclo estral em que o animal se encontra no início do tratamento, com baixas taxas de ovulação entre os dias 14 (23%) e altas taxas quando entre os dias 5-9 do ciclo estral (96%). Provavelmente, a maioria dos animais do presente experimento se encontravam em um estágio menos responsivo, isto é, menos favorável para indução da ovulação, pois se desconhecia a fase do ciclo estral em que os animais se encontravam antes da primeira aplicação de GnRH.

A emergência de uma nova onda folicular ocorreu  $1,93 \pm 1,23$  dias após a primeira administração do GnRH, e a taxa de ocorrência de uma nova onda de crescimento folicular após a primeira aplicação de GnRH foi de 87,5% (14/16) das vacas, e a não-ocorrência de uma nova onda folicular foi de 12,5% (2/16) das vacas, que tiveram persistência do folículo dominante durante todo o

tratamento (Tabela 1), ou seja, estes continuaram a crescer após a administração do GnRH.

Tabela 1 – Parâmetros reprodutivos (% e médias) observados em animais submetidos a dois protocolos para sincronização de ovulação

Parâmetros Reprodutivos	
Taxa de ovulação após a primeira aplicação de GnRH – porcentagem (proporção)*	31 (5/16)
Emergência da nova onda folicular após a primeira aplicação de GnRH – dias (média $\pm$ desvio-padrão)	1,93 $\pm$ 1,23
Taxa de ocorrência de uma nova onda folicular após a primeira aplicação de GnRH – porcentagem (proporção)	87,5 (14/16)
Taxa de ovulação antes da aplicação do BE ou do segundo GnRH - porcentagem (proporção)**	6 (1/16)
Taxa de animais com luteólise completa após a aplicação de PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> - porcentagem (proporção)	56 (9/16)

\* até 48 horas depois da aplicação de GnRH.

\*\* a partir de 48 horas depois da primeira aplicação de GnRH.

BARROS et al. (2000) realizaram dois experimentos utilizando Ovsynch em vacas da raça Nelore, e obtiveram resultados semelhantes aos observados neste experimento: 79% e 90% das vacas iniciaram uma nova onda folicular após 1,79 e 1,6 dias da primeira aplicação de GnRH, respectivamente.

A efetividade do GnRH em iniciar nova onda folicular é essencial para o sucesso da sincronização da ovulação, pois garante a presença de um folículo dominante com potencial ovulatório no momento da indução da luteólise pela PGF<sub>2 $\alpha$</sub> .

A taxa de ovulação antes da aplicação de BE ou da segunda aplicação de GnRH foi de 6% (1/16) das vacas. Após a administração de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  ocorreu luteólise completa, isto é redução da concentração de progesterona para valores abaixo de um ng/mL, em 9 das 16 vacas (56%) (Tabela 1).

Todas as vacas apresentaram baixa concentração de progesterona no dia da aplicação do segundo GnRH ou BE, pois além de a PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  ter sido efetiva, os animais que não apresentaram luteólise também apresentaram baixas concentrações de progesterona no dia da aplicação da PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . Esses

resultados corroboram os de VASCONCELOS et al. (1999) que observaram 93% das vacas com baixas concentrações de progesterona na segunda aplicação do GnRH.

Porém, o sucesso da sincronização de ovulação requer não somente o controle da vida útil do corpo lúteo, mas também a presença de um folículo dominante funcionalmente normal ao final do tratamento.

No presente estudo, os sete dias de intervalo da primeira aplicação de GnRH à  $PGF_{2\alpha}$  foram suficientes para o desenvolvimento de um novo folículo dominante (>8mm).

Todos os animais do T1 e 94% do T2 apresentaram folículo pré-ovulatório no dia da aplicação da  $PGF_{2\alpha}$  corroborando os resultados obtidos por BARROS et al. (2000) que obtiveram taxas de 83% no tratamento em que utilizou Ovsynch e 90% no que utilizou GnRH -  $PGF_{2\alpha}$  - BE, cujas vacas apresentaram folículos dominantes no dia 7.

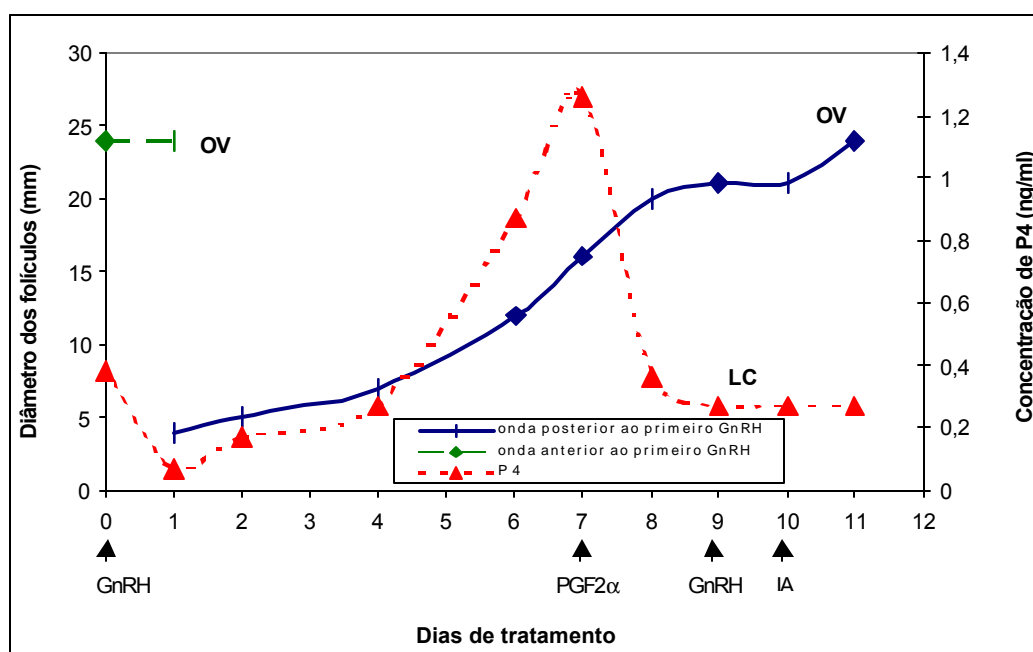


Figura 1 – Padrão de desenvolvimento folicular e comportamento da concentração de progesterona plasmática em uma vaca tratada com buserelina (10  $\mu$ g, Dia 0),  $PGF_{2\alpha}$  (250 mg, Dia 7) e buserelina (10  $\mu$ g, Dia 9). LC = luteólise completa, OV = ovulação.

Na Figura 1, observa-se uma vaca que possuía um folículo apto à ovulação, quando ocorreu a primeira aplicação de GnRH. Este veio a ovular no dia seguinte a esta aplicação, formando um corpo lúteo que elevou a concentração plasmática de progesterona a valores superiores a 1 ng/mL. Começou então o recrutamento de uma nova onda folicular e um novo folículo dominante foi se desenvolvendo. No dia 7, houve a aplicação de PGF<sub>2α</sub> que provocou a queda da concentração de progesterona de aproximadamente 1,2ng/mL, conseqüência da luteólise funcional do corpo lúteo formado após a ovulação provocada pela primeira aplicação de GnRH. A luteólise foi completa, reduzindo a concentração plasmática de progesterona para valores próximos a zero, e permitindo a ovulação do folículo dominante da nova onda que surgiu após a primeira aplicação de GnRH. Esse comportamento foi observado em vários dos animais e exemplificado por esta vaca, e parece ser o comportamento de dinâmica folicular ideal para o êxito da sincronização de ovulação.

Na Figura 2, observa-se a presença de um folículo de diâmetro elevado no dia da primeira aplicação de GnRH. Porém, esse folículo não ovulou após a aplicação, entrando em atresia. A concentração plasmática de progesterona encontrava-se elevada no dia da primeira aplicação de GnRH, demonstrando a presença de um corpo lúteo funcional que continuou produzindo progesterona até o dia 7, quando se aplicou a PGF<sub>2α</sub>, que provocou a luteólise completa, reduzindo a concentração plasmática de progesterona para próximo a zero.

Com a atresia do folículo dominante da onda anterior ao primeiro GnRH, houve o surgimento de uma nova onda folicular, com recrutamento e seleção de um novo folículo dominante que ovulou no dia 10, após a segunda aplicação de GnRH. Esse comportamento também foi apresentado por alguns animais e exemplificado pelo gráfico desta vaca.

Na Figura 3, observa-se que no dia da primeira aplicação de GnRH a concentração plasmática de progesterona encontrava-se baixa, não havendo então corpo lúteo funcional, nos ovários haviam dois folículos de diâmetro elevado, sendo que após o tratamento com GnRH um deles entrou em atresia e o outro continuou a se desenvolver.

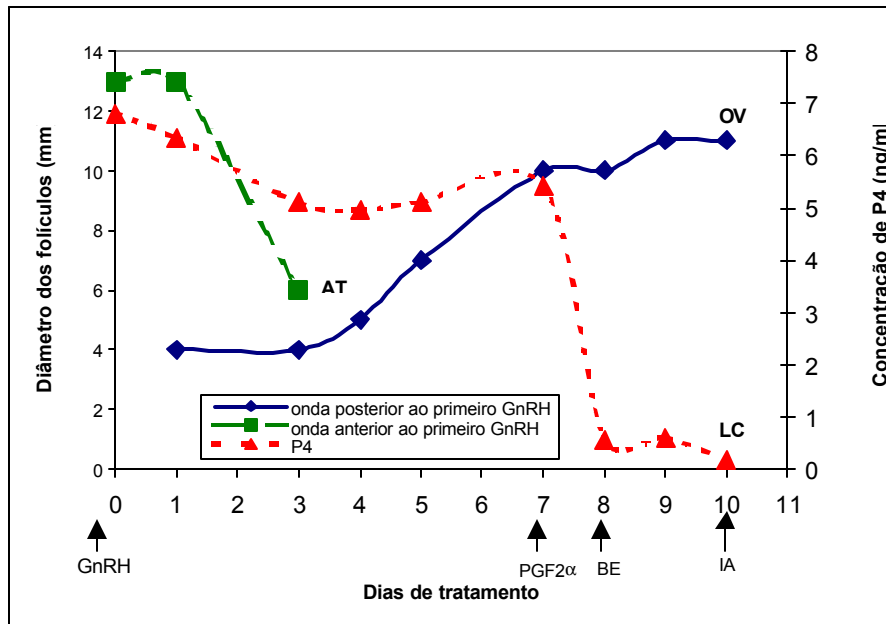


Figura 2 – Padrão de desenvolvimento folicular e comportamento da concentração de progesterona plasmática em uma vaca tratada com buserelina (10 µg, Dia 0), PGF<sub>2α</sub> (250 mg, Dia 7) e benzoato de estradiol (1 mg, Dia 8). LC = luteólise completa, OV = ovulação, AT = atresia.

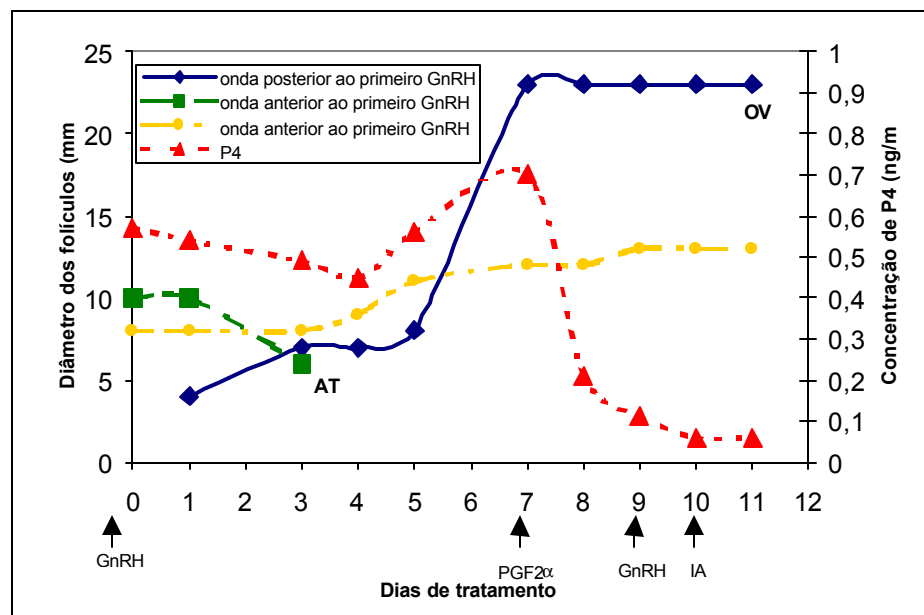


Figura 3 – Padrão de desenvolvimento folicular e comportamento da concentração de progesterona plasmática em uma vaca tratada com buserelina (10 µg, Dia 0), PGF<sub>2α</sub> (250 mg, Dia 7) e buserelina (10 µg, Dia 9). OV = ovulação, AT = atresia.

Neste animal, observa-se o comportamento descrito no texto anteriormente em que apesar da concentração plasmática de progesterona estar baixa e permanecer todo tempo abaixo de 1 ng/mL, ocorreu um pequeno aumento da concentração e posteriormente sua queda, quando da aplicação de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

Apesar de um folículo da onda anterior a primeira aplicação de GnRH continuar se desenvolvendo, ocorreu o recrutamento e seleção de um novo folículo dominante de uma nova onda folicular que ovulou no dia 11, após a segunda aplicação de GnRH. Para exemplificar o comportamento dos animais, pode-se observar na Figura 1 uma vaca que ovulou após a aplicação do primeiro GnRH. Na Figura 2, observa-se uma vaca que apresentou atresia do folículo dominante após o primeiro GnRH; e na Figura 3, observa-se uma vaca com persistência do folículo dominante da onda anterior à primeira aplicação de GnRH, com concomitante surgimento de uma nova onda folicular.

Conforme pode ser visto nas Figuras 2 e 3, as vacas que não ovularam após a primeira aplicação de GnRH também tiveram pequeno aumento na concentração plasmática de progesterona, provavelmente por causa do aumento no número de grandes células luteínicas, decorrente da liberação de LH induzida pela busserelina, que pode provocar a luteinização das células da granulosa, que levará a elevação da concentração de progesterona. Como nas vacas, os receptores para  $\text{PGF}_{2\alpha}$  se localizam principalmente nas grandes células luteínicas dos corpos lúteos, o aumento no número dessas células indica que o corpo lúteo dos animais tratados com busserelina deve apresentar maior número de luteólises completas após a aplicação de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (TWAGIRAMUNGU et al., 1995b).

Na Figura 4, observa-se uma vaca que no dia da primeira aplicação de GnRH possuía um folículo de diâmetro elevado e baixa concentração plasmática de progesterona. Após a aplicação, o folículo entrou em atresia e uma nova onda folicular surgiu com a seleção de um novo folículo dominante que ovulou no dia 10, após a aplicação de benzoato de estradiol.

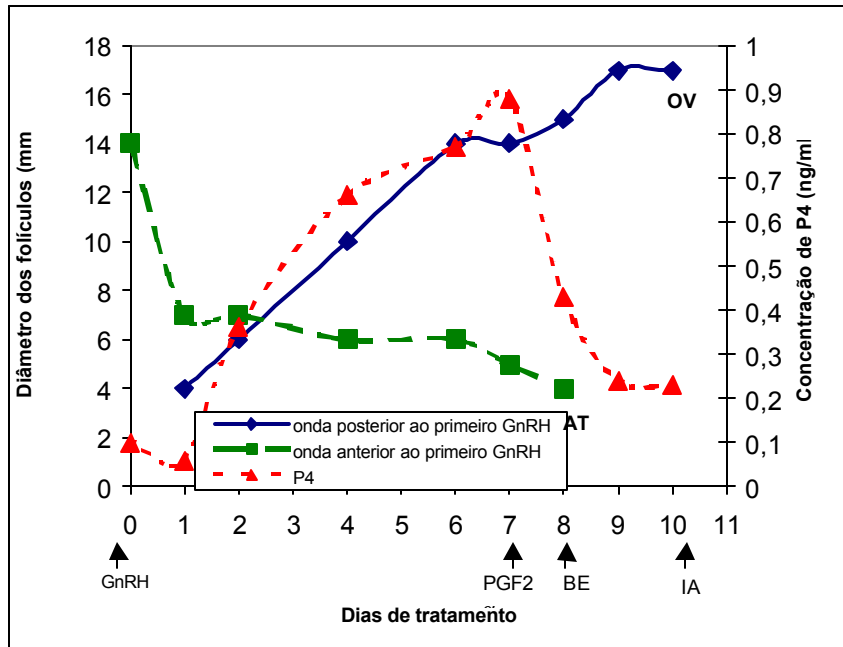


Figura 4 – Padrão de desenvolvimento folicular e comportamento da concentração de progesterona plasmática em uma vaca tratada com busarelina (10 µg, Dia 0), PGF<sub>2α</sub> (250 mg, Dia 7) e benzoato de estradiol (1 mg, Dia 8). OV = ovulação, AT = atresia.

A concentração plasmática de progesterona apesar de aumentar de menos de 0,1 ng/mL para quase 0,9 ng/mL do dia 1 ao dia 7, sofreu uma queda para menos de 0,3 ng/mL no dia 9, permanecendo, durante todo o período de tratamento, inferior a 1 ng/mL.

Como se observa pelas Figuras 1 e 2, conforme já descrito no texto, em 9 das 16 vacas (56%), houve um aumento da concentração de progesterona, e após a aplicação de PGF<sub>2α</sub> essa concentração reduziu novamente para valores próximos a zero.

As demais não possuíam e não formaram corpo lúteo após a primeira aplicação de GnRH, permanecendo com a concentração plasmática de progesterona abaixo de 1 ng/mL durante todo o tratamento (Figuras 3, 4 e 5). O gráfico da Figura 4 representa o comportamento de algumas das vacas que permaneceram com a concentração plasmática de progesterona abaixo de 1 ng/mL durante o período de sincronização de ovulação. Nesses animais, houve ligeiro aumento na concentração plasmática de progesterona,

provavelmente decorrente do fato de o tratamento com busirelina aumentar o número de grandes células luteínicas e o volume do corpo lúteo, quando presente no período do tratamento. Então, mesmo em animais com poucas células luteínicas, estas são aumentadas, observando-se pequena elevação na concentração plasmática de progesterona após a aplicação do GnRH (TWAGIRAMUNGU et al., 1995b).

O tratamento com GnRH induziu a ovulação ou a atresia dos folículos dominantes na maioria dos animais, induziu o início sincronizado de uma nova onda folicular, e aumentou a concentração de progesterona aproximadamente 4 dias após sua aplicação (Figuras 1, 2, 3 e 4). Também se pode observar que o tratamento com PGF<sub>2α</sub> foi efetivo, pois houve 100% de luteólise nos animais que apresentavam corpo lúteo funcional ou alta concentração de progesterona no dia da aplicação de PGF<sub>2α</sub>.

A Figura 5 também representa as vacas que mantiveram concentração plasmática de progesterona abaixo de 1 ng/mL durante o período de sincronização de ovulação. Porém, no caso dessa vaca e nas de comportamento semelhante não se observou aumento significativo da concentração de progesterona, somente uma ligeira elevação da concentração e queda após a aplicação de PGF<sub>2α</sub>. Nessa vaca, ocorreu a atresia do folículo dominante da onda anterior a primeira aplicação de GnRH e o surgimento de uma nova onda folicular com o desenvolvimento de dois folículos, sendo que um deles entrou em atresia, enquanto o outro se desenvolveu e ovulou no dia 10, após a segunda aplicação de GnRH.

A Figura 6 retrata o gráfico da dinâmica ovariana de uma vaca que ovulou (6% dos animais) no dia da aplicação da PGF<sub>2α</sub>, isto é, antes da aplicação de benzoato de estradiol, deveria estar, provavelmente, no final do ciclo estral e não ovulou após a primeira aplicação de GnRH. O folículo não deveria estar apto à ovulação, quando da aplicação de GnRH, e cresceu suficientemente no intervalo da aplicação de GnRH à de PGF<sub>2α</sub> para induzir o estro seguido de ovulação, antes da aplicação de benzoato de estradiol. Isto também foi encontrado por VASCONCELOS et al. (1999), com alta incidência (18%) de vacas ovulando antes da segunda aplicação de GnRH, quando se encontravam na fase final do ciclo estral.

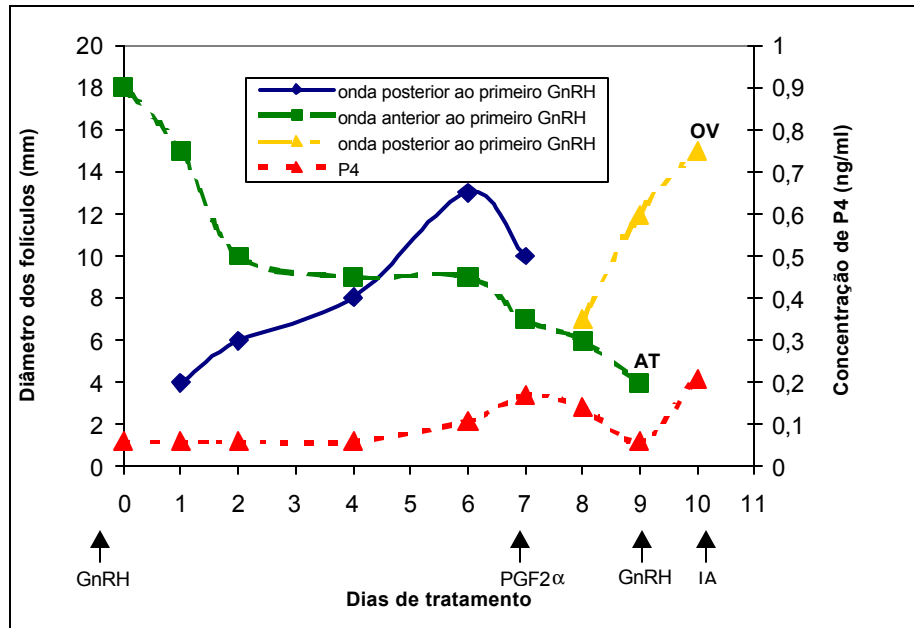


Figura 5 – Padrões de desenvolvimento folicular e comportamento da concentração de progesterona plasmática em uma vaca tratada com buserelina (10 $\mu$ g, Dia 0), PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (250 mg, Dia 7) e buserelina (10 $\mu$ g, Dia 9). OV = ovulação, AT = atresia.

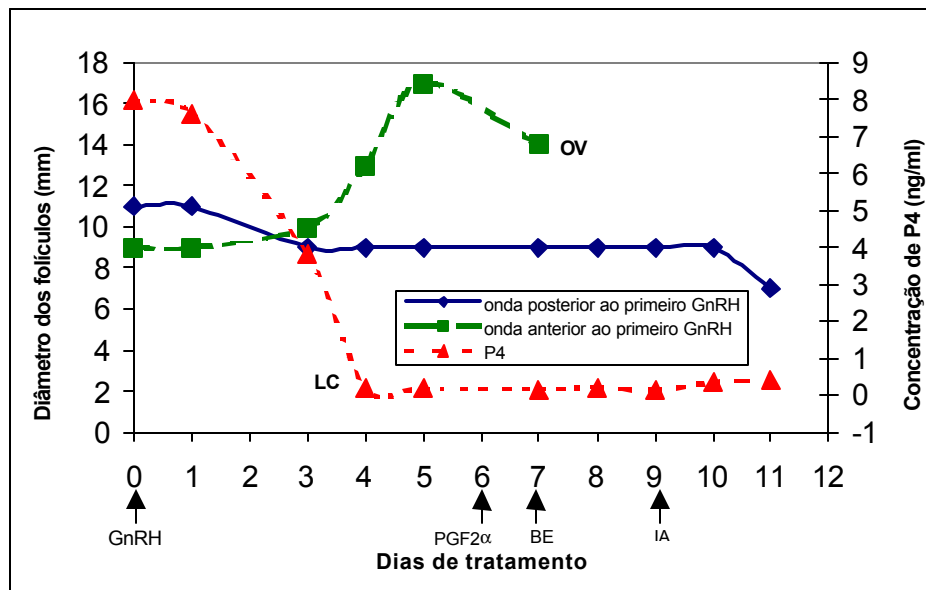


Figura 6 – Padrões de desenvolvimento folicular e comportamento da concentração de progesterona plasmática em uma vaca tratada com buserelina (10 $\mu$ g, Dia 0), PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (250 mg, Dia 7) e buserelina (10 $\mu$ g, Dia 9). OV = ovulação, LC = luteólise completa.

No dia da primeira aplicação de GnRH a concentração plasmática de progesterona encontrava-se alta e havia dois folículos de diâmetro elevado nos ovários. Nenhum deles ovulou após o primeiro GnRH; um desses folículos entrou em atresia e o outro continuou se desenvolvendo até sua ovulação no dia da aplicação da PGF<sub>2α</sub>. A concentração plasmática de progesterona foi reduzida antes da aplicação da PGF<sub>2α</sub>, ou seja, a luteólise já havia ocorrido quando houve a aplicação. Logo, a concentração de progesterona já estava baixa permitindo a ocorrência da ovulação no dia 7.

Taxas similares (6% e 8%) de animais que ovularam antes da segunda aplicação de GnRH. Porém, a partir de 48 horas depois da primeira aplicação de GnRH, foram observadas por VASCONCELOS et al. (1999) e BARROS et al. (2000), respectivamente. Como esse comportamento é indesejável para o êxito da sincronização de ovulação, e essa vaca ovulou antes da aplicação de BE, não respondendo à primeira aplicação de GnRH, foi excluída de todas as análises relativas a intervalos de ovulação e tamanho e idade do folículo pré-ovulatório, entrando somente na análise da fertilidade.

A Figura 6 também mostra a inatividade da PGF<sub>2α</sub> e GnRH sobre folículos de onda anterior ao primeiro GnRH, com diâmetros acima de 10 mm, que poderiam ter seus receptores para LH já saturados e, portanto, se apresentarem não-responsáveis à aplicação do GnRH, mantendo então um diâmetro ou uma persistência folicular anômala.

As médias dos parâmetros de dinâmica folicular e reprodutivas dos animais submetidos aos dois protocolos para sincronização da ovulação encontram-se na Tabela 2.

O diâmetro máximo dos folículos ovulatórios foi similar nos dois tratamentos ( $P > 0,05$ ). Embora BARROS et al. (2000) também não tenham encontrado diferença entre o diâmetro dos folículos em vacas submetidas aos mesmos tratamentos empregados neste estudo, os valores aqui registrados foram maiores em valores absolutos (1,5-1,7 cm) aos observados por BARROS et al. (2000) (1,1-1,2 cm).

Tabela 2 – Parâmetros de dinâmica folicular e reprodutivos (médias e desvios-padrão) observados em animais submetidos a dois protocolos para sincronização de ovulação

Parâmetros	T1	T2
Diâmetro do folículo ovulatório (cm) <sup>1</sup>	1,7±0,41 <sup>a</sup>	1,5±0,21 <sup>a</sup>
Intervalo segundo GnRH ou BE – ovulação (h) <sup>1</sup>	31,08±8,19 <sup>a</sup>	40,74±3,96 <sup>b</sup>
Intervalo da IA à ovulação (horas) <sup>1</sup>	7,50±8,09 <sup>a</sup>	8,38±7,65 <sup>a</sup>
Taxa de ovulação após administração de GnRH ou BE (%) <sup>2</sup>	100,0 <sup>a</sup>	87,5 <sup>a</sup>
Taxa de gestação (%) <sup>2</sup>	16,7 <sup>a</sup>	17,4 <sup>a</sup>
Idade do folículo ovulatório (dias) <sup>1</sup>	7,37±1,59 <sup>a</sup>	7,42±1,71 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> (a, b) As médias seguidas por letras diferentes, dentro da mesma linha, diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Student Newman Keuls.

<sup>2</sup> (a, b) As médias seguidas por letras diferentes, dentro da mesma linha, diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste do Qui-quadrado.

Alguns pesquisadores têm associado à ocorrência de folículos ovulatórios maiores com reduções na taxa de gestação, quando comparado àqueles folículos ovulatórios menores. VASCONCELOS et al. (1999) obtiveram maior taxa de gestação em animais submetidos ao protocolo de “Ovsynch”, apresentando folículos pré-ovulatórios menores (42%) que aqueles que possuíam folículos maiores (32%). Esses autores concluíram que houve correlação negativa entre o tamanho do folículo ovulatório e a taxa de gestação.

Os dois tratamentos utilizados neste experimento foram eficientes em promover a sincronização da ovulação após a aplicação de GnRH ou BE. A ovulação dos animais do T1 foi observada, em média, 31,08 ± 8,19 horas após a aplicação do GnRH, e nos animais do T2 registraram-se 40,74 ± 3,96 horas após a aplicação do BE, sendo esta diferença significativa (P < 0,05). Essa diferença na resposta aos dois tratamentos também foi observada por BARROS et al. (2000), que obtiveram intervalo de 31,70 ± 1,8 horas para o tratamento em que foi utilizado “Ovsynch” e de 45,38 ± 2,03 horas para os animais em que foi utilizado GnRH - PGF<sub>2α</sub> - BE. Essa diferença pode ser

explicada pelo fato de que o BE induz a onda de LH aproximadamente 16 a 24 horas após sua administração, em animais com concentração basal de progesterona ( $< 1,0$  ng/mL) (BO et al., 1995 e LAMMOGLIA et al., 1998), enquanto o GnRH aumenta a concentração plasmática de LH e FSH dentro de 2 a 4 horas após a sua administração (CHENAULT et al., 1990 e STEVENSON et al., 1993). Essa diferença no horário da ocorrência do pico de LH deve explicar o maior intervalo encontrado da aplicação do BE à ovulação em relação ao GnRH, uma vez que o pico de LH pré-ovulatório ocorre mais tardiamente nos animais tratados com BE que nos animais em que foi aplicado o GnRH.

SILCOX et al. (1995) sincronizaram a ovulação de vacas com aptidão leiteira e observaram a ocorrência da ovulação aproximadamente 26 horas após a segunda aplicação de GnRH. PURSLEY et al. (1995) observaram que a ovulação ocorreu de 24 a 32 horas após a segunda aplicação de GnRH, cujo intervalo é semelhante ao observado do início do estro à ovulação de animais em um ciclo estral normal.

Relacionando-se o momento de ovulação com o melhor horário para IA, observou-se que nos dois tratamentos este intervalo esteve próximo do valor ideal, ou seja, aproximadamente 8 horas da inseminação artificial à ovulação (Tabela 2), esse intervalo permite a realização da capacitação espermática antes da ovulação, capacitando os espermatozóides para fecundarem os ovócitos após a ovulação.

Porém, PURSLEY et al. (1998), utilizando diferentes horários para IA (0, 8, 16, 24 e 32 horas), após a segunda aplicação de GnRH, não observaram diferença nas taxas de gestação, quando foram comparados os intervalos de 0, 8, 16 e 24 horas (30% de gestação), mas houve diferença na taxa de gestação para o grupo de 32 horas. Logo, os piores resultados de taxa de gestação obtidos no experimento realizado por esses autores podem ter decorrido do intervalo da segunda aplicação de GnRH à ovulação observada ser maior que 31 horas, o que levou a IA a ser realizada após a ovulação, demonstrando assim a necessidade de um melhor intervalo da inseminação à ovulação para a capacitação espermática.

Neste experimento, observou-se 100% de ovulação no T1 após a aplicação do GnRH e 87,5% no T2 após a aplicação de BE (Tabela 2). Esses

resultados são semelhantes aos de outros autores que obtiveram taxas entre 87 a 100% respectivamente (PURSLEY et al., 1995 e VASCONCELOS et al., 1997 e 1999) e superiores aos de BARROS et al. (2000) que obtiveram 76% de ovulação para o grupo tratado com “Ovsynch” e 70% no grupo tratado com GnRH - PGF<sub>2α</sub> - BE. Pode-se afirmar que os dois tratamentos deste experimento foram eficientes em sincronizar a ovulação, e que não houve diferença na resposta dos animais aos dois tratamentos ( $P > 0,05$ ).

Apesar dos excelentes resultados quanto à sincronização de ovulação, as taxas de gestação obtidas neste experimento foram baixas para os animais dos dois tratamentos: 16,7% (T1) e 17,4% (T2), não diferindo entre si ( $P > 0,05$ ) (Tabela 2). Também trabalhando em regiões de clima quente e no verão, ARÉCHIGA et al. (1998) e DE LA SOTA et al. (1998) obtiveram índices de gestação semelhantes aos observados neste experimento (16,6 e 13,9% respectivamente).

ALVAREZ et al. (1999) obtiveram baixa taxa de gestação (16,7%) utilizando o método “Ovsynch”, quando comparado com outros estudos realizados no exterior (40 a 50%), quando questionaram a eficiência do método “Ovsynch” em sistemas de produção comercial sob condições tropicais.

PURSLEY et al. (1997a) utilizaram o esquema de sincronização de ovulação “Ovsynch” em 310 vacas em lactação e obtiveram 38% de taxa de gestação, enquanto STEVENSON et al. (1999) e VASCONCELOS et al. (1999) obtiveram taxas de gestação de 22% e 37%, respectivamente. Estes índices são superiores aos obtidos neste experimento. A diferença encontrada entre as taxas de gestação desses autores e a obtida neste experimento podem ter decorrido do uso de intervalos de 30-36 h das aplicações de PGF<sub>2α</sub> e GnRH. E neste estudo, assim como nos de ARÉCHIGA et al. (1998), DE LA SOTA et al. (1998) e ALVAREZ et al. (1999) que obtiveram resultados semelhantes aos deste experimento, foram utilizadas 48 horas de intervalo, o que, provavelmente, deve ter adiantado a ocorrência da ovulação e levado a uma redução no período de dominância do folículo pré ovulatório nos experimentos realizados por PURSLEY et al. (1997a), STEVENSON et al. (1999) e VASCONCELOS et al. (1999). STOCK e FORTUNE (1993) concluíram que o crescimento folicular prolongado estaria associado à baixa fertilidade. MIHM et

al. (1994) afirmaram que a fertilidade é progressivamente reduzida com o aumento do período de dominância folicular.

Resultados superiores ao deste experimento também foram obtidos por BURKE et al. (1996), que realizaram “Ovsynch” em 171 vacas em lactação e obtiveram 29% de gestação, enquanto STEVENSON et al. (1999), em um segundo experimento realizado com 115 vacas em lactação, obtiveram 35% de taxa de gestação. Todavia, esses pesquisadores utilizaram menor intervalo (16 horas) da última aplicação de GnRH a IA que o utilizado neste estudo (24 horas), o que pode ter acarretado maior taxa de gestação. PURSLEY et al. (1998) definiram que o melhor horário para IA seria em torno de 16 horas após a segunda aplicação de GnRH.

GEARY et al. (1998) aplicaram o esquema de sincronização de ovulação Ovsynch em 220 vacas de corte, separando o bezerro das vacas no dia da aplicação de  $PGF_{2\alpha}$  e obtiveram 54% de taxa de gestação e FERNANDES et al. (1997) compararam o esquema de sincronização de ovulação Ovsynch e a aplicação de GnRH-  $PGF_{2\alpha}$ -BE em vacas Nelore e obtiveram taxas de gestação em torno de 45% para os dois grupos, índices superiores aos obtidos neste experimento. Porém, esses estudos foram realizados em gado com aptidão para produção de carne e não em gado com aptidão leiteira como utilizado neste experimento, e embora o esquema de sincronização de ovulação, utilizando uma única inseminação com horário pré-determinado venha sendo largamente testado em gado com aptidão para produção de carne e gado com aptidão leiteira. Este tratamento teve os piores resultados em vacas com aptidão leiteira. Isto deve ocorrer pelo fato de vacas em lactação apresentarem padrões de desenvolvimento folicular mais variáveis em relação aos animais não-lactantes.

Os folículos dominantes neste experimento tiveram seus períodos de dominância prolongados (aproximadamente 7 dias), não apresentando diferença entre os animais dos dois tratamentos (Tabela 2).

Correlacionando-se a alta taxa de ovulação, a baixa taxa de gestação e o prolongamento da dominância dos folículos pré-ovulatórios observados neste experimento, é provável que tenha ocorrido queda na qualidade dos ovócitos derivados desses folículos, dado o maior tempo de duração em seus estádios de dominância folicular. MIHM et al. (1994) detectaram que a ocorrência de

aumento no período de dominância do folículo leva à redução na taxa de prenhez. A indução da persistência do folículo dominante da primeira onda resultou em queda da taxa de concepção em novilhas com aptidão leiteira (SAVIO, 1993) e em vacas e novilhas com aptidão para produção de carne (SANCHEZ et al., 1993).

REVAH e BUTLER (1996) avaliaram o efeito do prolongamento do tempo de dominância do folículo ovulatório na qualidade do ovócito, e verificaram que os ovócitos de folículos com maior período de dominância iniciavam a ativação prematura da meiose. Esta pode ser a causa da menor fertilidade após a sincronização de estro com progestágenos por mais de sete dias.

Esta alteração na qualidade dos ovócitos pode ser responsável pela baixa fertilidade após a sincronização de estro em vacas tratadas com progestágenos e que prolongam a vida do folículo dominante. A dominância prolongada parece ser responsável por alterar o microambiente necessário para o desenvolvimento normal do ovócito e conseqüentemente reduzir as chances de sucesso do desenvolvimento embrionário e da gestação (REVAH e BUTLER, 1996). Altas concentrações de estradiol, dada a presença de folículos persistentes, poderiam influenciar as condições das tubas uterinas e, ou, do útero, podendo ser a causa da menor fertilidade, quando da presença de folículos persistentes (AHMAD et al., 1995).

É possível que, em vacas, o aumento na freqüência pulsátil de LH resultante de baixas concentrações de progesterona afete lentamente as lacunas das gap junctions entre as células da granulosa e o *cumulus oophorus*. A deterioração dessas junções pode permitir que o ovócito finalize a meiose ainda dentro do folículo. REVAH e BUTLER (1996) afirmaram que manter os folículos em dominância prolongada pode levar a ovulação de ovócitos maduros, isto é, ovócitos que terminaram a meiose, acarretando baixa fertilidade após a inseminação.

Como pôde ser observado, a redução da fertilidade não resultou da ausência de ovulação, mas três fatores podem ter sido responsáveis segundo MIHM et al. (1994), pela redução da taxa de gestação após a ovulação de um folículo com maior período de dominância. Primeiro, a produção aumentada de estradiol durante o prolongamento do período de dominância pode ter

provocado alterações nos ambientes intrafolicular, tubárico e uterino, causando o transporte acelerado do ovócito ou morte embrionária precoce. Segundo, as alterações intrafoliculares durante o crescimento prolongado possivelmente influenciaram o ovócito do folículo persistente e, após a ovulação, esses ovócitos estavam inaptos à fertilização ou podem ter ocorrido distúrbios no desenvolvimento precoce. Por último, o aumento da frequência pulsátil de LH pode ter dissociado o fim da meiose da onda de LH e da ovulação, e desencadeado o término do processo de meiose, levando à ovulação um folículo maduro com a meiose finalizada.

Nos animais do T1 a sincronização de ovulação ocorreu em intervalo de 20 horas (28 a 48 horas após o GnRH) versus a sincronização mais precisa das vacas do grupo T2 que ocorreu em intervalo de 9 horas (38 a 47 horas após o BE) (Tabela 3). Esta diferença na resposta dos dois tratamentos pode ter decorrido ao fato de que duas vacas do grupo T1 tiveram comportamento atípico e ovularam depois do intervalo normalmente observado da aplicação de GnRH à ovulação (Figuras 1 e 3). Além disso, os animais do T1 tiveram um comportamento diferente do observado por PURSLEY et al. (1995), quando a segunda dose de GnRH sincronizou a ovulação em um período de 8 horas. Corroborando resultados desses pesquisadores, BARROS et al. (2000) encontraram um intervalo de 12 horas para os grupos tratados tanto com “Ovsynch” quanto com GnRH - PGF<sub>2α</sub> - BE.

Ao se avaliar o período do ano em que foi realizada a sincronização de ovulação neste experimento, verifica-se que não ocorreu estresse térmico e desconforto animal durante o período experimental (Figura 7), pois durante todo o período os valores ficaram abaixo do valor de THI limite em relação à zona de conforto.

Tabela 3 – Taxa de ovulação observada em animais submetidos a dois protocolos para sincronização de ovulação

Tratamento 1	Média em horas após a administração de GnRH ou BE					
	24	26	28	30	32	>32
Nº de animais que ovularam	6					2*
Tratamento 2	Média em horas após a administração de GnRH ou BE					
	35	38	41	44	47	>47
Nº de animais que ovularam	1		4	2		

\* Um animal ovulou 39,9 horas depois da administração de GnRH e outro 47,8.

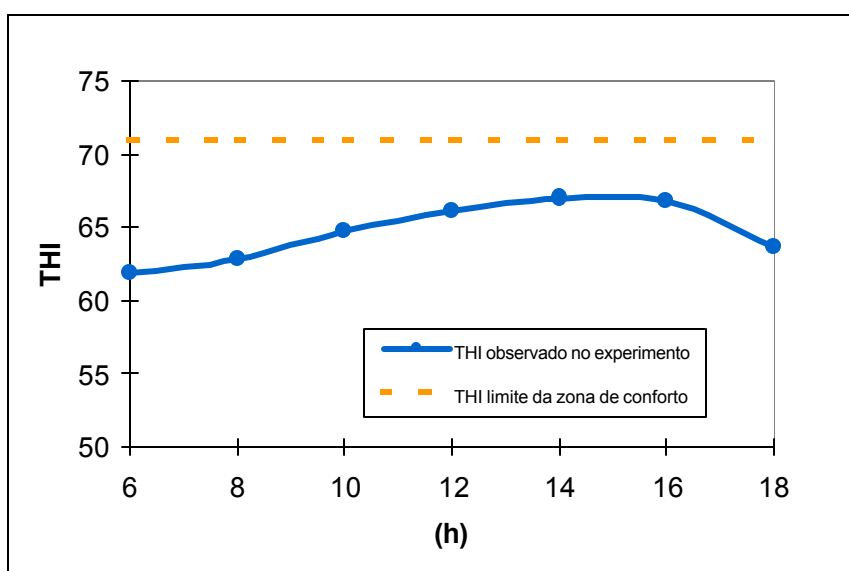


Figura 7 – Índice de temperatura e umidade (THI) diário para o período experimental. A linha contínua indica o limite ideal de conforto térmico para gado com aptidão leiteira (THI = 71).

Logo, pode-se concluir que apesar das sincronizações de ovulação terem sido realizadas em dezembro, um mês rotineiramente quente, parece não ter ocorrido estresse térmico nos animais durante o período experimental, não tendo então provavelmente ocorrido interferência das condições climáticas nas baixas taxas de gestação observadas neste experimento.

Com base nos resultados obtidos neste experimento, observa-se que os dois tratamentos foram efetivos em sincronizar a ovulação dos animais tratados. Porém, resultaram em baixas taxas de gestação, provavelmente decorrente do aumento da duração do período de dominância que foi observado em ambos os tratamentos.

Serão necessários novos estudos para melhor investigar a correlação direta entre o tamanho dos folículos pré-ovulatórios, a duração de seu período de dominância e a fertilidade, além da necessidade de se encontrar metodologias que possam reduzir o tamanho e o período de dominância dos folículos ovulatórios, possibilitando o aumento das taxas de gestação, quando da utilização da inseminação artificial em horário pré-determinado.

## **5. CONCLUSÕES**

Os dois protocolos de sincronização da ovulação foram efetivos em sincronizar a ovulação dos animais tratados, porém com baixas taxas de gestação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEYEMO, O., HEATH, E. Plasma progesterone concentration in *Bos taurus* and *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v. 14, n. 6, p. 411-420, 1980.
- AGARWAL, S. P., RAHMAN, S. A., LAUMAS, K. R., AGARWAL, V. K., AHMAD, A. Studies on steroid hormones: Progesterone concentration in the blood serum of zebu cows during oestrus cycle. **Indian J. Anim. Sci.**, v. 47, n. 11, p. 715-719, 1977.
- AHMAD, R. R., SCHRICK, F. N., BUTCHER, R. L., INSKEEP, E. K. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. **Biol. Reprod.**, v. 52, p. 1129-1135, 1995.
- ALVAREZ, R. H. Aplicações práticas da dosagem de progesterona no leite de vaca pelo teste imuno-enzimático (ELISA). **Zootecnia**, v. 28, p. 15-23, 1990.
- ALVAREZ, R. H., ARCARO, J. R. P., MASCHIO, W. Inseminação artificial em tempo pré-fixado em rebanho Holandês. Ineficiência do tratamento "OvSynch" ? **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 23, n. 3, p. 326-328, 1999.
- ARÉCHIGA, F. C., STAPLES, C. R., MACDOWELL, L. R., HANSEN, P. J. Effects of timed insemination and supplemental  $\beta$ -carotene on reproduction and milk yield of dairy cows under heat stress. **J. Dairy Sci.**, v. 81, p. 390-402, 1998.
- ARMSTRONG, D. V. Heat stress interaction with shade and cooling. **J. Dairy Sci.**, v. 77, p. 2044-2050, 1994.
- BACCARI, F. Jr. Adaptação de sistemas de manejo na produção de leite em clima quente. In: Anais do 1º Simpósio Brasileiro de Ambiência na Produção de Leite, p. 24-67. FEALQ, Piracicaba, São Paulo, 1998.

- BADINGA, L., THATCHER, W. W., WILCOX, C. J. Effect of season on follicular dynamics and plasma concentrations of estradiol-17 $\beta$ , progesterone and luteinizing hormone in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, v. 42, p. 1263, 1994.
- BARROS, C. M., FIGUEIREDO, R. A., PINHEIRO, O. L. Estro, ovulação e dinâmica folicular em zebuínos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 19, p. 9-22, 1995.
- BARROS, C. M., CASTILHO, C., GAMBINI, A. L. G., MOREIRA, M. B. P. Follicular dynamics and synchronization of ovulation in Girolando heifers with GnRH-PGF-hCG treatment. **Biol. Reprod.**, v. 56 (suppl. 1), p. 195, 1997. (abstract)
- BARROS, C. M., FERNANDES, P. Sincronização da ovulação e inseminação artificial com tempo pré-determinado (fixo). In: Anais do 3<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de raças zebuínas, p. 112-127, 1998.
- BARROS, C. M., MOREIRA, M. B. P., FERNANDES, P. Pharmacological manipulation of the estrous cycle to improve artificial insemination or embryo transfer programs. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v. 26, n. 1, 1998 (Supl.).
- BARROS, C. M., MOREIRA, M. B. P., FIGUEIREDO, R. A., TEIXEIRA, A. B., TRINCA, L. A. Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using GnRH, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 53, p. 1121-1134, 2000.
- BIGELOW, K. L., EVANS, A. C. O., FORTUNE, J. E. Effects of prolonged dominance on follicular steroidogenesis in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 142, 1997. (Abstract)
- BO, G. A., ADAMS, G. P., PIERSON, R. A., TRIBULO, H. E., CACCIA, M., MAPLETOFT, R. J. Follicular wave dynamics after estradiol-17 $\beta$  treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v. 41, p. 1555 – 1569, 1994.
- BO, G. A., ADAMS, G. P., CACCIA, M., MARTINEZ, M., PIERSON, R. A., MAPLETOFT, R. J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 39, p. 193-204, 1995.
- BORGES, A. M. **Dinâmica folicular e superovulação em novilhas mestiças tratadas com somatotropina bovina (rBST) e efeito da temperatura na qualidade dos embriões.** Viçosa, MG: UFV, 1999, 100 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- BROWN, J. L., REEVES, J. J. Absence of specific luteinizing hormone releasing hormone receptors in ovine, bovine and porcine ovaries. **Biol. Reprod.**, v. 29, p. 1179-1184, 1983.

- BURKE, J. M., DE LA SOTA, R. L., RISCO, C. A., STAPLES, C. R., SCHMITT, E. J. P., THATCHER, W. W. Evaluation of timed insemination using a gonadotropin-releasing hormone agonist in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v. 79, p. 1385-1393, 1996.
- CASTILHO, C., GAMBINI, L. G., MOREIRA, M. B. P., BARROS, C. M. Ineficiência do tratamento GnRH-PGF2 $\alpha$ -Estradiol para sincronizar a ovulação de novilhas girolando. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v. 26, n. 1, 1998 (Supl.).
- CHENAULT, J. R., DRATZER, D. D., RZEPKOWSKI, R. A., GOODWIN, M. C. LH and FSH response of Holstein heifers to fertirelin acetate, gonadorelin and buserelin. **Theriogenology**, v. 34, p. 81-91, 1990.
- CHRISTENSEN, D. S., HOPWOOD, M. L., WILTBANK, J. N. Levels of hormones in the serum of cycling beef cows. **J. Anim. Sci.**, v. 38, p. 577-583, 1974.
- COLLIER, R. J. Effects of heat stress during pregnancy on maternal hormone concentration, calf birth weight and postpartum milk yield of Holstein cows. **J. Anim. Sci.**, v. 54, p. 309-319, 1982.
- DE LA SOTA, R. L., BURKE, J. M., RISCO, C. A., MOREIRA, F., DELORENZO, M. A., THATCHER, W. W. Evaluation of timed insemination during summer heat stress in lactating dairy cattle. **Theriogenology**, v. 49, p. 761-770, 1998.
- FERNANDES, P., GAMBINI, A. L. G., MOREIRA, M. B. P., BARROS, C. M. Inseminação artificial com tempo fixo em vacas da raça nelore. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v. 25, n. 1, p.222-223, 1997.
- FORTUNE, J. E. Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: A limiting factor in improvement of fertility ? **Anim. Reprod. Sci.**, v. 33, p. 111-125, 1993.
- GEARY, T. W., WHITTIER, J. C., DOWNING, E. R., LE FEVER, D. G., SILCOX, R. W., HOLLAND, M. D., NETT, T. M., NISWENDER, G. D. Pregnancy rates of postpartum beef cows that were synchronized using Syncro-Mate-B or the Ovsynch protocol. **J. Anim. Sci.**, v. 76, p. 1523-1527, 1998.
- GINTHER, O. J., KNOPF, L., KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and three follicular waves. **J. Reprod. Fertil.**, v. 87, p. 223-230, 1989.
- GINTHER, O. J., WILTBANK, M. C., FRIKE, P. M. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biol. Reprod.**, v. 55, p. 1187-1194, 1996.
- GWAZDAUKAS, F. C. Effects of climate on reproduction in cattle. **J. Dairy Sci.**, v. 68, p. 1568-1578, 1985.

- HENRICKS, D. S., DICKEY, J. F., HILL, J. R. Plasma estrogen and progesterone levels in cows prior to and during estrus. **Endocrinology**, v. 89, p. 1350-1355, 1971.
- INGRAHAM, R. H., STANLEY, R. W., WAGNER, W. C. Relationship of temperature and humidity to conception rate of Holstein cows in Hawaii. **J. Dairy Sci.**, v. 59, n. 12, p. 2086-2090, 1976.
- JIMÉNEZ, F., GALINA, C. S., DUCHATEAU, A., FIERRO-NAVARRO, R. Levels of LH, progesterone and estradiol-17 $\beta$  during natural and PGF $_{2\alpha}$  induced estrus in Indubrazil and Brown Swiss cows in the tropics. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 16, p. 199-206, 1988.
- KO, J. C. H., KASTELIC, J. P., DEL CAMPO, M. R., GINTHER, O. J. Effect of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. **J. Reprod. Fertil.**, v. 91, p. 511-517, 1991.
- LAMMOGLIA, M. A., SHORT, R. E., BELLOWS, R. E., BELLOWS, R. A., MACNEIL, M. D., HAFS, H. D. Induced and synchronized estrus in cattle: dose titration of estradiol benzoate in peripubertal heifers and postpartum cows after treatment with an intravaginal progesterone-releasing insert and prostaglandin F $_{2\alpha}$ . **J. Anim. Sci.**, v. 76, p. 1662-1670, 1998.
- LEMASTER, J. W., YELICH, J. V., KEMPFER, J. R., SCHRICK, F. N. Ovulation and estrus characteristics in crossbred Brahman heifers treated with intravaginal progesterone-releasing insert in combination with prostaglandin F and estradiol benzoate. **J. Anim. Sci.**, v. 77, p. 1860-1868, 1999.
- LUCY, M. C., SAVIO, J. D., BADINGA, L. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 70, p. 3615-3626, 1992.
- MACHADO, P. F. Efeitos da alta temperatura sobre a produção, reprodução e sanidade de bovinos leiteiros. In: 1<sup>o</sup> Simpósio Brasileiro de Ambiente na Produção de Leite. FEALQ, Piracicaba, São Paulo, 1998. Anais. Piracicaba, 1998, p. 179-188.
- MACMILLAN, K. L. Pharmacological control of the oestrus cycle to improve the reproductive performance of cattle. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 23, n. 2, p. 61-64, 1999.
- MALAYER, J. R. Effect of day of oestrus cycle, side of reproductive tract and heat shock on *in vitro* protein secretion by bovine endometrium. **J. Reprod. Fertil.**, v. 84, p. 567-578, 1988.
- MARTINEZ, M. F., KASTELIC, J. P., ADAMS, G. P., COOK, R. B., MAPLETOLF, R. J. Synchronization of ovulation for fixed-time insemination in heifers. **Theriogenology**, v. 51, p. 412, 1999.

- 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. **J. Reprod. Fertil.**, v. 102, p. 123-130, 1994.
- MULLER, R. P. **Bioclimatologia aplicada aos animais domésticos**, 3 ed., Porto Alegre: Sulina, 1989. 262 p.
- ODDE, K. G. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 68, p. 817-830, 1990.
- PIERSON, R. A., GINTHER, O. J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, v. 29, p. 21-37, 1989.
- PURSLEY, J. R., KOSOROK, M. R., WILTBANK, M. C. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. **J. Dairy Sci.**, v. 77, p. 69, 1994. (Abstract).
- PURSLEY, J. R., MEE, M. O., WILTBANK, M.C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF<sub>2α</sub> and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, p. 915-923, 1995.
- PURSLEY, J. R., WILTBANK, M. C., STEVENSON, J. S., OTTOBRE, J. S., GARVERICK, H. A., ANDERSON, L. L. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. **J. Dairy. Sci.**, v. 80, p. 295-300, 1997a.
- PURSLEY, J. R., KOSOROK, R. M., WILTBANK, M. C. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. **J. Dairy Sci.**, v. 80, p. 301-306, 1997b.
- PURSLEY, J. R., SILCOX, R. W., WILTBANK, M. C. Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratios after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v. 81, p. 2139-2144, 1998.
- PUTNEY, D. J. Heat stress-induced alterations in the synthesis and secretion of proteins and prostaglandins by cultured bovine conceptuses and uterine endometrium. **Biol. Reprod.**, v. 39, p. 717-728, 1988.
- REVAH, I., BUTLER, W. R. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. **J. Reprod. Fertil.**, v. 106, p. 39-47, 1996.
- ROLLOSSON, M. M., CRIM, J. W., SILCOX, R. W., KISER, T. E. Density of [<sup>125</sup>I]hCG binding to the dominant follicle of the first wave of the estrous cycle in cows. **J. Dairy. Sci.** v. 77 (Suppl 1), p. 231, 1994. (Abstract).

- SANCHEZ, T., WERHMAN, M. E., BERGFELD, E. G., PETERS, K. E., KOJIMA, F. N., CUPP, A. S., MARISCAL, V., KITTOK, R. J., RASBY, R. J., KINDER, J. E. Pregnancy rate is greater when the corpus luteum is present during the period of progestin treatment to synchronize time of estrus in cows and heifers. **Biol. Reprod.**, v. 49, p. 1102-1107, 1993.
- SANTOS, L. P., MORAES, J. C. F., JAUME, C. M. Indução de ovulação precoce em vacas de corte com estradiol em presença ou não de um folículo dominante. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 21, n. 2, p. 2-4, 1997.
- SAVIO, J. D., KEENAN, L., BOLAND, M. P., ROCHE, J. F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **J. Reprod. Fertil.**, v. 83, p. 663-671, 1988.
- SAVIO, J. D. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. **J. Reprod. Fertil.**, v. 98, p. 77-84, 1993.
- SCHMITT, E. J. P., DIAZ, T., DROST, M., THATCHER, W. W. Use of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 74, p. 1084-1091, 1996.
- SENGER, P. L. The estrus detection problem: new concepts, technologies, and possibilities. **J. Dairy Sci.**, v. 77, p. 2745-2750, 1994.
- SHORT, R. E., HOWLAND, B. E., RANDEL, R. D., CHISTENSEN, D. W., BELLOWES, R. A. Induced LH release in spayed cows. **J. Anim. Sci.**, v. 37, p. 551-557, 1973.
- SILCOX, R. W., POWELL, K. L., KISER, T. E. Ability of dominant follicles to respond to exogenous GnRH administration is dependent on their stage of development. **J. Anim. Sci.**, v. 71, n. 1, p. 219, 1993.
- SILCOX, R. W., POWELL, K. L., PURSLEY, J. R., WILTBANK, M. C. Use of GnRH to synchronize ovulation in Holstein cows and heifers treated with GnRH and prostaglandin. **Theriogenology**, v. 43, p. 325, 1995. (Abstract)
- SIROIS, J., FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real time ultra-sonography. **Biol. Reprod.**, v. 39, p. 308-317, 1988.
- STEVENSON, J. S., PHATAK, A. P., RETTMER, I. Post-insemination administration of receptal : follicular dynamics, duration of cycle, hormonal responses, and pregnancy rates. **J. Dairy Sci.**, v. 76, p. 2536-2547, 1993.
- STEVENSON, J. S., KOBAYASHI, Y., THOMPSON, K. E. Reproductive performance of dairy cows in various programmed breeding systems including Ovsynch and combinations of gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin F<sub>2α</sub>. **J. Dairy Sci.**, v. 82, p. 506-515, 1999.

- STOCK, A. E., FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. **Endocr.**, v. 132, n. 3, p. 1108-1114, 1993.
- TAFT, R., AHMAD, N., INSKEEP, E. K. Exogenous pulses of luteinizing hormone cause persistence of the largest bovine ovarian follicle. **J. Anim. Sci.**, v. 74, p. 2985-2991, 1996.
- THATCHER, W. W., MACMILLAN, K. L., HANSEN, P. J., DROST, M. Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. **Theriogenology**, v. 31, p. 149-158, 1989.
- THATCHER, W. W., SCHMITT, E. J. P., DE LA SOTA, R. L. Dynamics and control of follicular and luteal development in cattle to optimize fertility. In: *Curso sobre estresse térmico, problemas reprodutivos e transferência de embriões em bovinos*. FCAVJ-UNESP, Jaboticabal, SP, 1995.
- TWAGIRAMUNGU, H., GUILBAULT, L. A., PROULX, J. G., VILLEUVE, P., DUFOUR, J. J. Synchronization of estrus and fertility in beef cattle with two injections of buserelin and prostaglandin. **Theriogenology**, v. 38, p. 1131-1144, 1992a.
- TWAGIRAMUNGU, H., GUILBAULT, L. A., PROULX, J. G., DUFOUR, J. J. Effects of synchro-mate B and prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  on estrus synchronization and fertility in beef cattle. **Can. J. Anim. Sci.** v. 31, p. 31-38, 1992b.
- TWAGIRAMUNGU, H., GUILBAULT, L. A., PROULX, J. G., DUFOUR, J. J. Influence of corpus luteum and induced ovulation on ovarian follicular dynamics in postpartum cyclic cows treated with buserelin and cloprostenol. **J. Anim. Sci.**, v. 72, p. 1796-1801, 1994.
- TWAGIRAMUNGU, H., GUILBAULT, L. A., DUFOUR, J. J. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: a review. **J. Anim. Sci.**, v. 73, p. 3141-3151, 1995a.
- TWAGIRAMUNGU, H., GUILBAULT, L. A., PROULX, J. G., DUFOUR, J. J. Busereline alters the development of the corpora lutea in cyclic and early postpartum cows. **J. Anim. Sci.**, v. 73, p. 805-814, 1995b.
- VACA, L. A., GALINA, C., FERNÁNDEZ-BACA, S., ESCOBAR, J., RAMÍREZ, B. Progesterone levels and relationship with the diagnosis of a corpus luteum by rectal palpation during the estrous cycle in zebu cows. **Theriogenology**, v. 20, n.1, p. 67-76, 1983.
- VASCONCELOS, J. L. M., SILCOX, R. W., PURSLEY, J. R., WILTBANK, M. C. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and conception rate after synchronization of ovulation with GnRH on different days of the estrous cycle. **J. Dairy Sci.**, v. 80 (Supl. 1), p. 178, 1997. (Abstract)

- VASCONCELOS, J. L. M., SILCOX, R. W., ROSA, G. J. M., PURSLEY, J. R., WILTBANK, M. C. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in dairy cows. **Theriogenology**, v. 52, p. 1067-1078, 1999.
- WALTERS, D. L., SCHALLENBERGER, E. Pulsatile secretion of gonadotropins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the periovulatory phase of the oestrous cycle in the cow. **J. Reprod. Fertil.**, v. 71, p. 503-512, 1984.
- WOLFENSON, D., THATCHER, W. W., SAVIO, J. D. The effect of GnRH analogue on the dynamics of follicular development and synchronization of estrus in lactating cyclic dairy cows. **Theriogenology**, v. 42, p. 633-644, 1994.
- WOLFENSON, D., ROTH, Z., MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, p. 535-547, 2000.

## APÊNDICE

## APÊNDICE

Quadro 1 - Resumo da análise de variância para o intervalo da administração de  $PGF_{2\alpha}$  à ovulação

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio	F
Tratamento	1	765,56	18,15*
Resíduo	13	42,17	

C.V.=8,97.

Quadro 2 - Resumo da análise de variância para o intervalo da administração do segundo GnRH ou do Benzoato de estradiol (BE) à ovulação

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio	F
Tratamento	1	348,80	8,04*
Resíduo	13	43,37	

C.V.=18,50.

Quadro 3 - Resumo da análise de variância para a duração do período de dominância dos folículos ovulatórios

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio	F
Tratamento	1	0,10	0,00 <sup>ns</sup>
Resíduo	13	2,73	

C.V.=22,35.

Quadro 4 - Resumo da análise de variância para o diâmetro do folículo ovulatório

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio	F
Tratamento	1	0,14	1,29 <sup>ns</sup>
Resíduo	13	0,11	

C.V.=21,14

Quadro 5 - Resumo da análise de variância para o intervalo da IA à ovulação

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio	F
Tratamento	1	2,83	0,04 <sup>ns</sup>
Resíduo	13	62,27	

C.V.=99,69

Quadro 6 – Relação dos animais utilizados no experimento em relação ao grau de sangue Holandês - Zebu

TRATAMENTO 1		TRATAMENTO 2	
VACA	GRAU DE SANGUE	VACA	GRAU DE SANGUE
Dengosa	7/8	Sanfona	7/8
Indiana	1/2	Serenata	3/4
Clara	7/8	Angustura	3/4
Carolina	3/4	Francesa	3/4
Renize	7/8	Princesa	7/8
Gaúcha	3/4	Morena	3/4
Viçosinha	15/16	Estrela	1/2
Deborah	3/4	Melissa	3/4
Angola	3/4	Carina	7/8
Roberta	3/4	Barrosa	3/4
Virna	3/4	Sabiá	3/4
Garota	7/8	Ponte Alta	7/8
Araça	3/4	Elisa	7/8
Ubá	7/8	Julieta	7/8
Danielle	1/2	Beleza	3/4
Cachorrinha	1/2	Natália	3/4
Luciana	1/2	Lembrança	1/2
Luana	3/4	Lambada	3/4
Chinesa	1/2	Brahma	3/4
Clara	7/8	Africana	1/2
Sasha	7/8	Hilma	3/4
Verônica	3/4	Isadora	7/8
Asa Branca	7/8	Vanda	7/8
Renata	3/4		