

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINARIA E ZOOTECNIA**

**EFICIÊNCIA DE DIFERENTES DOSES DE ACETATO DE FERTIRELINA NA
SINCRONIZAÇÃO DA EMERGÊNCIA DA ONDA FOLICULAR E INDUÇÃO DA
OVULAÇÃO EM VACAS LEITEIRAS.**

MARILÚ MARTINS GIOSO

BOTUCATU-SP

Junho 2006

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINARIA E ZOOTECNIA**

**EFICIÊNCIA DE DIFERENTES DOSES DE ACETATO DE FERTIRELINA NA
SINCRONIZAÇÃO DA EMERGÊNCIA DA ONDA FOLICULAR E INDUÇÃO DA
OVULAÇÃO EM VACAS LEITEIRAS.**

MARILÚ MARTINS GIOSO

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Doutor

Orientadora: Profa. Dra. Eunice Oba
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Antônio
de Carvalho Fernandes

BOTUCATU-SP
Junho 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU – UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Gioso, Marilú Martins.

Eficiência de diferentes doses de acetato de Fertirelina na sincronização da emergência da onda folicular e indução da ovulação em vacas leiteiras / Marilú Martins Gioso. – 2006.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.

Orientador: Eunice Oba

Assunto CAPES: 50504002

1. Bovino - Reprodução 2. Reprodução animal 3. Inseminação artificial

CDD 636.20824

Palavras-chave: Acetato de Fertirelina; Bovinos; Onda folicular; Ovulação; Sincronização

A DEUS

“Por vezes, senti meu corpo fraquejar, e tu estendeste tua mão e ergueste-me.

Por vezes, senti minha alma se abater, e tu me deste coragem de prosseguir.

Por vezes, senti meu espírito desvanecer, e tu enviaste o teu próprio Espírito para me consolar.

Hoje, humilde, a vitória é minha... e a ti, Meu Deus, toda Honra e toda Glória, Eternamente.

Amém. “

Aos meus pais, por tudo.

Agradecimento

A Deus, Nossa Senhora e Anjo da Guarda, por todos os momentos ao meu lado, iluminando, protegendo e ensinando a humildade, carinho e amor pela vida e meu trabalho.

Aos meus pais Antonio Maria Gioso e Ana Maria Martins Gioso, as duas pessoas mais importantes da minha vida, que me ensinaram a trilhar caminhos e fizeram o possível para a realização dos meus sonhos. Eu os amo.

Aos meus avós Alice Andrade Gioso (in memorian) e Leopoldo Gioso Sobrinho (in memorian), pelos caminhos que me abriram, pelos esforços e conselhos, sei que estão comigo sempre, eu sinto, eu acredito, eu os amo.

A família Martins, por me dar a honra de lhe pertencer. Sei que as batalhas foram difíceis e às vezes incompreensíveis, mas serei eternamente grata pelo afeto, carinho, ajuda que sempre me proporcionaram. Pelos esforços e conselhos, broncas e sorrisos, muito obrigada.

A Universidade Estadual Paulista – Julio de Mesquita Filho, pela oportunidade de realização deste curso.

A minha orientadora Eunice Oba, que esteve ao meu lado sempre e que muito ajudou nesta jornada, além de professora, uma excelente amiga. Professora, seus exemplos são para ser seguidos por todos os seus orientados, pois nunca esqueceu de ninguém e esteve à disposição quando precisamos. Obrigada por tudo, a senhora realmente merece nosso reconhecimento, gratidão e carinho.

Ao professor Carlos Antonio de Carvalho Fernandes, um excelente professor e co-orientador que muito ajudou e confiou no meu trabalho. Agradeço pelos incentivos e conquistas. Aprendi e aprendo muito com o seu talento, trabalho, confiança e bom humor sempre. Um exemplo no profissional e como ser humano.

Aos amigos e colegas de profissão Eduardo, Marco Antonio e Thales, pela paciência e ajuda não só nos experimentos, mas também pela disposição, amizade e conselhos.

Ao Professor e amigo Eduardo Paulino da Costa. Não irei esquecer o que fez por mim. Tenha a certeza que terá uma orientada e amiga para sempre. Meu segundo pai.

Aos professores Cesinande de Meira, João Carlos Pinheiro Ferreira, Nereu Carlos Prestes e Sony Dimas Bicudo pelas excelentes orientações, exemplos, carinho e paciência.

Às minhas queridas irmãs Brunna, Regina, Karina e Juliana. Vocês foram e serão partes da minha vida. Aprendi e aprendo muito com vocês. Luz azul sempre.

Aos grandes amigos e companheiros Fabi, Bel, Cris, Vivi, Luciana, Carla, Gustavo e Alexandre, pelo carinho, apoio, amizade, exemplo e atenção disponibilizados.

Aos irmãozinhos Edmilson e Adriano, pelo carinho e atenção em todos os momentos. Pela grande amizade sempre.

Aos eternos companheiros e irmãos João Paulo, Mônica, Fabiana, Pati, Marcela, Fabíola, Bruno, Yone, Maurício, Graziela e Mellito pela cumplicidade, companheirismo, conselhos, sorrisos, broncas, paciência, por tudo. Obrigada por existirem.

Aos queridos José Luis, André e Xaveirinho. Nem sei como agradecer pelo afeto, carinho e amor que forneceram aos meus filhotes e por tudo que fizeram por mim. Vocês são mais que especiais, são pessoas maravilhosas que terão minha eterna amizade. Muito obrigada.

Ao Carlos Alberto, meu amor. Obrigada por tudo.

Aos funcionários e amigos do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – UNESP, Botucatu, pela alegria, ajuda, amizade, carinho.

Às funcionárias e amigas do setor de Pós-graduação em Medicina Veterinária – UNESP, Botucatu, pela paciência, amizade e ajuda sempre disponibilizada a todos os pós-graduandos. Vocês realmente merecem nosso aplauso.

Ao laboratório Schering Plough pela doação dos medicamentos e disponibilidade de realização deste trabalho.

Aos senhores proprietários e funcionários das fazendas São Matheus – MG, Ponte Grande-MG e Ipê-MG, pela abertura de portas, dedicação, credibilidade e apoio prestados.

À CAPES, pela bolsa de pesquisa fornecida.

Aos diretores, colegas de profissão e funcionários dos Departamentos de Veterinária e Ciências Agrárias da Universidade de Alfenas-UNIFENAS, pela atenção, alegria e exemplo de profissionalismo.

Aos problemas e obstáculos, pelos desafios e conquistas.

A todos que direta ou indiretamente participam do meu trabalho e vida –

DEDICO

HOMENAGEIO

AGRADEÇO

Resumo

Vários produtos à base de GnRH são efetivos em protocolos de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF). Entretanto, o Acetato de Fertirelina é um análogo deste hormônio cujas informações sobre sua ação na dinâmica folicular dos bovinos são poucas, principalmente nas condições brasileiras. Este trabalho teve como objetivo comparar a eficiência de duas doses de Acetato de Fertirelina para sincronização da emergência da onda de desenvolvimento folicular e ovulação, em vacas leiteiras submetidas ao protocolo “Ovsynch”. Utilizaram-se 77 vacas, a partir dos 60 dias pós-parto e escore corporal entre 2,5-4,0. Os animais apresentavam população folicular e corpo lúteo (CL) característico (Classe 1) ou ausência de CL, porém presença de pelo menos um folículo com diâmetro ≥ 10 mm (Classe 2). As fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em quatro tratamentos: (1)- 100 μ g de Fertirelina (Fertigen[®], Schering Plough, Brasil) no dia 0, 530 μ g de PGF2 α (Ciosin[®], Schering Plough, Brasil) no dia 8 e 100 μ g de Fertirelina no dia 10; (2)- 100 μ g de Fertirelina no dia 0, 530 μ g de PGF2 α no dia 8 e 50 μ g de Fertirelina no dia 10; (3)- 50 μ g de Fertirelina no dia 0, 530 μ g de PGF2 α no dia 8 e 100 μ g de Fertirelina no dia 10 e (4)- 50 μ g de Fertirelina no dia 0, 530 μ g de PGF2 α no dia 8 e 50 μ g de Fertirelina no dia 10. Executaram-se avaliações ultra-sonográficas e colheitas de sangue para análises de progesterona (P4) e estradiol (E2) séricos nos dias -1; 0; 2; 8; 10 e 12. As dosagens da P4 e E2 foram executadas por radioimunoensaio utilizando-se kits comerciais (DPC Medlab[®]) com coeficientes de variação intra-ensaio de 7,9% e 15% para P4 e E2, respectivamente. Todos os animais receberam a inseminação artificial (IA) entre 16 e 20 horas após última aplicação da Fertirelina. Os diagnósticos de gestação foram realizados por palpação transretal aos 50-60 dias após inseminação artificial (IA). Para as variáveis taxas de indução de uma nova onda folicular, da ovulação e gestação, utilizou-se o teste χ^2 . Para os efeitos dos tratamentos e classes nos diferentes dias de análise sobre as concentrações de progesterona e estradiol, bem como dias pós-parto, análise de variância (ANOVA) ou teste Kruskal-Wallis. As taxas de sincronização da onda e ovulação foram de 70,0% e 66,2%, respectivamente não apresentando diferença entre os tratamentos ou classes ($P > 0,05$). Os valores de progesterona nos dias 0 (1,29 \pm 0,19 ng/mL), 2 (1,39 \pm 0,20 ng/mL), 8 (1,29 \pm 0,15 ng/mL), 10 (0,12 \pm 0,02 ng/mL) e 12 (0,14 \pm 0,03

ng/mL) apresentaram-se similares entre os tratamentos ($P>0,05$), bem como os valores de estradiol nos dias 0 ($3,21\pm 0,27\text{pg/mL}$), 2 ($2,98 \pm 0,23\text{pg/mL}$), 8 ($3,38 \pm 0,17\text{pg/mL}$), 10 ($4,05\pm 0,26\text{pg/mL}$) e 12 ($2,79\pm 0,16\text{pg/mL}$; $P>0,05$). Porém, no dia 10, as concentrações de E2 apresentaram diferença em relação aos outros dias de análise ($P<0,05$). Sobre os diâmetros dos folículos pré-ovulatórios no Dia 10, não houve diferenças entre os tratamentos ($1,64\pm 0,09\text{mm}$; $1,70\pm 0,12\text{mm}$; $1,63\pm 0,11\text{mm}$; $1,82\pm 0,10\text{ mm}$, respectivamente), porém houve diferença em relação às classes 1 e 2 ($1,63\pm 0,06\text{ mm}$ versus $1,84\pm 0,09\text{ mm}$, $P<0,05$). As taxas de prenhez também foram similares entre os tratamentos ($P>0,05$) com média geral de 28,37%. Em conclusão, as concentrações séricas de progesterona e estradiol, taxas de sincronização, ovulação e prenhez demonstraram que o Acetato de Fertirelina foi eficiente em provocar a emergência da onda folicular e induzir a ovulação, nas doses de 50 ou 100 μg , sugerindo que doses de 50 μg de Fertirelina podem ser indicadas sem comprometimento nos resultados finais do programa.

Palavras-chave: Acetato de Fertirelina, “Ovsynch”, vacas leiteiras, sincronização, onda folicular, ovulação, inseminação artificial.

Abstract

Many similar products to GnRH are effective in protocols of fixed timed artificial insemination (FTAI). However, Fertirelin Acetate is an analog of this hormone whose information about action in the bovine follicular dynamics is inconsistent, mainly in Brazilian conditions. Therefore, the objective of this work was to compare the efficiency of two doses of Fertirelin used for synchronization of follicular wave emergence and ovulation, in dairy cows submitted to "Ovsynch" protocol. Seventy seven lactating dairy cows, on over of 60 days postpartum and body score of 2.5 to 4.0. The animals presenting a reasonable number of follicles either a presence of CL (group 1) or without CL but at least ≥ 10 mm follicles (group 2). The females were randomly distributed in four treatments: (1) - 100 μg of Fertirelin (Fertigen®, Schering Plough, Brazil) at day 0, PGF2 α (530 μg ; Ciosin®, Schering Plough, Brazil) at day 8 and 100 μg of Fertirelin at day 10. (2) - 100 μg of Fertirelin at day 0, PGF2 α (530 μg) at day 8 and 50 μg of Fertirelin at day 10. (3) - 50 μg of Fertirelin at day 0, PGF2 α at day 8 and 100 μg of Fertirelin at day 10. (4) - 50 μg of Fertirelin at day 0, PGF2 α (530 μg) at day 8 and 50 μg of Fertirelin at day 10. Ultrasound evaluations and blood collections were accomplished on days -1; 0; 2; 8; 10 and 12. Progesterone and Estradiol seric concentrations were determined by a radioimmunoassay (DPC Medlab®). The intra-assay coefficients of variation were 7.9% and 15.0% for progesterone and estradiol, respectively. Animals were submitted an artificial insemination (AI) at 16-20 hours after last Fertirelin administration and pregnant diagnosis were realized by transretal examination at 60 days after AI. Follicular wave induction rates, ovulation rates and pregnancy rates were compared by Qui-square test. The effects of the treatments and groups in the different days of analysis about the P4, E2 concentrations and days post partum were submitted by ANOVA or Kruskal Wallis test. The synchronization rates of the follicular wave and ovulation were: 70.0% and 66.2%, respectively, with no difference among the groups ($P > 0.05$). The mean P4 concentrations were similar among treatments ($P > 0.05$) on day 0 (1.29 ± 0.19 ng/mL), day 2 (1.39 ± 0.20 ng/mL), day 8 (1.29 ± 0.15 ng/mL), day 10 (0.12 ± 0.02 ng/mL) and day 12 (0.14 ± 0.03 ng/mL). The mean values of estradiol on day 0 (3.21 ± 0.27 pg/mL), day 2 (2.98 ± 0.23 pg/mL), day 8 (3.38 ± 0.17 pg/mL), day 10 (4.05 ± 0.26 pg/mL) and day 12 (2.79 ± 0.16 pg/mL) were similar among treatments

($P < 0.05$), however the values of estradiol at day 10 showed statistic difference than others days of analyze ($P < 0.05$). About the maximal diameter of preovulatory follicles at the day 10, there were no differences among the treatments (1.64 ± 0.09 mm, 1.70 ± 0.12 mm, 1.63 ± 0.11 mm, 1.82 ± 0.10 mm, respectively), however in the groups 1 and 2 was difference (1.63 ± 0.06 mm versus 1.84 ± 0.09 mm, $P < 0.05$). The pregnancy rates were also similar ($P > 0.05$) with mean of 28.37%. In conclusion, Progesterone and Estradiol concentrations, follicular wave synchronization, induction of ovulation and pregnant rates demonstrate that Fertirelin was efficient in inducing a new follicular wave emergency, as well as the induction of the ovulation at the end of the protocol, using the dose of either $50 \mu\text{g}$ or $100 \mu\text{g}$, suggesting that $50 \mu\text{g}$ of Fertirelin can be useful without compromising the final results.

Key words: Fertirelin Acetate; "Ovsynch"; dairy cattle; synchronization; follicular wave; ovulation; artificial insemination.

Lista de ilustrações

- Figura 1:** Animais utilizados durante o experimento. Vacas de raça Holandesa Preto e Branco em lactação.....55
- Figura 2:** Protocolo “Ovsynch” utilizado para sincronização da emergência de onda folicular e ovulação em vacas HPB. (D): Dias após início dos protocolos, referentes às aplicações dos hormônios. (US): avaliações ultra-sonográficas. Colheitas de sangue (sangue) e Inseminação Artificial (IA). Modificado de Pursley et al. (1995)..55
- Figura 3:** Imagens ultra-sonográficas dos ovários de vacas HPB em lactação utilizadas no experimento a) corpo lúteo; b) folículo (f) com diâmetro ≥ 10 mm.....57
- Figura 4:** Escore corporal médio das vacas HPB utilizadas no experimento, submetidas ao protocolo “Ovsynch”, de acordo com os grupos.....60
- Figura 5:** Eficiência média de diferentes doses de Fertirelina (μg) para sincronização de onda de desenvolvimento folicular em vacas leiteiras submetidas ao protocolo “Ovsynch”63
- Figura 6:** Eficiência média de diferentes doses de Acetato de Fertirelina (μg) para indução de ovulação em vacas leiteiras submetidas ao protocolo “Ovsynch”.....66
- Figura 7:** Valores médios de progesterona sérica (ng/mL) nos dias 0, 2, 8,10 e 12 após início do protocolo “Ovsynch”, em vacas leiteiras, de acordo com os tratamentos.....75
- Figura 8:** Valores médios de progesterona sérica (ng/mL) nos dias 0, 2, 8,10 e 12 após início do protocolo “Ovsynch”, em vacas leiteiras, de acordo com as classes.....76
- Figura 9:** Valores médios de estradiol sérico (ng/mL) nos dias 0, 2, 8, 10 e 12 após início do protocolo “Ovsynch”, em vacas leiteiras, de acordo com os grupos de tratamento.....78
- Figura 10:** Valores médios de estradiol sérico (pg/mL) em vacas leiteiras submetidas ao protocolo “Ovsynch”, de acordo com as classes.....79

Lista de tabelas

- Tabela 1:** Esquema de tratamento nas vacas Holandesas Preto e Branco, em lactação, submetidas ao protocolo “Ovsynch”, de acordo com os grupos de tratamento.....56
- Tabela 2:** Taxas de sincronização da emergência da onda folicular após primeira administração de Fertirelina (D0) e taxas de ovulação após a segunda aplicação (Dia 10) de acordo com grupos de tratamento, em vacas HPB submetidas ao protocolo “Ovsynch”.....62
- Tabela 3:** Taxas de sincronização da emergência de onda folicular em vacas leiteiras, submetidas ao protocolo “Ovsynch”, de acordo com as classes. Classe 1: animais que apresentavam P4 >1,0 ng/mL no início dos tratamentos. Classe 2: animais com P4 <1,0 ng/mL no início dos tratamentos.....64
- Tabela 4:** Taxas de ovulação após administração do análogo Acetato de Fertirelina nos animais que apresentavam P4 >1,0 ng/mL (classe 1) ou P4 <1,0 ng/mL (classe 2) no início dos tratamentos.....66
- Tabela 5:** Vacas leiteiras, submetidas ao protocolo “Ovsynch”, que apresentavam P4 > 1ng/mL no momento da aplicação de Cloprostenol (Dia 8 após o início dos protocolos), de acordo com os tratamentos.....68
- Tabela 6:** Vacas leiteiras submetidas ao protocolo “Ovsynch” que apresentaram P4 > 1ng/mL no momento da aplicação de prostaglandina (Dia 8 após o início dos tratamentos) e que sofreram luteólise após a administração, de acordo com as classes.....69
- Tabela 7:** Vacas leiteiras submetidas ao protocolo “Ovsynch” que ovularam antes do final do protocolo (entre os dias 8 e 10), de acordo com os tratamentos.....70
- Tabela 8:** Vacas leiteiras submetidas ao protocolo “Ovsynch” que ovularam antes do término dos protocolos (entre os dias 8 e 10), de acordo com as classes. Classe 1 = P4 > 1,0 ng/mL no dia 0; classe 2 = P4 < 1,0 ng/mL no dia 0.....71

| | |
|---|----|
| Tabela 9: Vacas leiteiras, submetidas ao protocolo “Ovsynch” que apresentaram duplas ovulações após a segunda administração do Acetato de Fertirelina, de acordo com os tratamentos..... | 71 |
| Tabela 10: Vacas leiteiras, submetidas ao protocolo “Ovsynch”, que apresentaram duplas ovulações após a segunda administração do Acetato de Fertirelina, de acordo com as classes..... | 72 |
| Tabela 11: Valores médios \pm erro padrão de Progesterona sérica (ng/mL) nos dias 0, 2, 8, 10 e 12, em vacas leiteiras submetidas ao protocolo “Ovsynch”, de acordo com os tratamentos..... | 75 |
| Tabela 12: Valores médios \pm erro padrão de Progesterona sérica (ng/mL) nos dias 0, 2, 8, 10 e 12 após o início do protocolo “Ovsynch”, em vacas leiteiras, de acordo com as classes: Classe 1 = P4 > 1,ng/mL no dia 0; Classe 2 = P4 < 1,ng/mL no dia 0.... | 76 |
| Tabela 13: Valores médios \pm erro padrão de Estradiol sérico (pg/mL) nos dias 0, 2, 8, 10 e 12 do protocolo “Ovsynch”, em vacas leiteiras, de acordo com os grupos de tratamento..... | 78 |
| Tabela 14: Valores médios \pm erro padrão de Estradiol sérico (pg/mL) nos dias 0, 2, 8, 10 e 12 do protocolo “Ovsynch”, em vacas leiteiras, de acordo com as classes: classe 1 = P4 > 1,ng/mL no dia 0; classe 2 = P4 < 1,ng/mL no dia 0..... | 79 |
| Tabela 15: Valores médios \pm erro padrão das concentrações séricas de Estradiol e Progesterona nos dias 0, 2, 8, 10 e 12 do protocolo “Ovsynch”, em vacas leiteiras. Para Progesterona (P4), classe 1 representa valores > 1,0 ng/mL no dia 0 e classe 2 representa valores < 1,0 ng/mL no dia 0..... | 80 |
| Tabela 16: Diâmetro médio \pm erro padrão (mm) dos folículos dominantes em vacas leiteiras submetidas ao protocolo “Ovsynch”, nos dias 8 e 10 do protocolo, de acordo com os grupos de tratamento..... | 82 |
| Tabela 17: Diâmetro médio \pm erro padrão (mm) dos folículos dominantes em vacas leiteiras submetidas ao protocolo “Ovsynch”, nos dias 8 e 10 do protocolo, de acordo com as classes..... | 82 |

Tabela 18: Dias pós-parto± erro padrão e taxas de gestação, em vacas leiteiras, submetidas ao protocolo “Ovsynch”, de acordo com os grupos de tratamento.....84

Tabela 19: Taxas de gestação dos animais submetidos ao protocolo “Ovsynch”, de acordo com as classes.....85

Tabela 20: Taxas de gestação em vacas leiteiras submetidas ao protocolo “Ovsynch”, de acordo com os dias pós-parto no início dos grupos de tratamento....87

Sumário

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

| | |
|--|----|
| 1 - Introdução..... | 16 |
| 2 - Objetivos..... | 18 |
| 3 - Revisão da literatura..... | 19 |
| 3.1 - Dinâmica Folicular na espécie bovina..... | 19 |
| 3.1.1 - Ondas de crescimento folicular..... | 19 |
| 3.1.2 - Surgimento do FSH e estimulação das ondas (Emergência)..... | 20 |
| 3.1.3 - Divergência folicular e seleção do folículo dominante. | 21 |
| 3.2 - Desenvolvimento do Corpo Lúteo (CL) e aspectos gerais dos mecanismos associados à luteólise..... | 24 |
| 3.2.1 - Desenvolvimento do Corpo Lúteo (CL)..... | 24 |
| 3.2.2 - Rota Esteroidogênica Luteal..... | 26 |
| 3.2.3 - Aspectos gerais dos mecanismos associados à luteólise..... | 28 |
| 3.2.4 - Refratariedade do CL..... | 31 |
| 3.2.5 - Importância da PGF2 α e seus análogos para a sincronização..... | 32 |
| 3.3 - Fatores que afetam a detecção de estro e principais vantagens da IATF..... | 33 |
| 3.3.1 - Vantagens da IATF..... | 35 |
| 3.4 - Utilização do GnRH, eventos hormonais e ovarianos relacionados com a administração deste hormônio em protocolos de IATF – “Ovsynch”..... | 36 |
| 3.4.1 - Etapa 1: Sincronização da onda de desenvolvimento folicular..... | 36 |
| 3.4.2 - Etapa 2: Administração de análogo a PGF2 α | 38 |
| 3.4.3 - Etapa 3: Sincronização da ovulação e inseminação artificial em tempo pré determinado (IATF)..... | 38 |
| 3.5 - Taxas de sincronização da emergência de onda e ovulação com a utilização do protocolo “Ovsynch”..... | 39 |
| 3.6 - Aplicações do GnRH e principais análogos utilizados em programas de IATF..... | 41 |
| 3.6.1 - Aplicações práticas do GnRH..... | 41 |
| 3.6.2 - Principais análogos do GnRH e suas potências biológicas..... | 42 |
| 3.7 - Redução das doses de análogos do GnRH no protocolo “Ovsynch”..... | 43 |

| | |
|---|-----|
| 3.8 - Taxas de concepção e prenhez com a utilização do protocolo “Ovsynch”..... | 45 |
| 3.9 - Principais problemas encontrados em animais submetidos à sincronização da ovulação..... | 48 |
| 3.9.1 - Diâmetros dos folículos ovulatórios e taxas de concepção..... | 48 |
| 3.9.2 - O “status” folicular ovariano (dia do ciclo estral) no início do protocolo pode afetar a não-sincronização ou redução de fertilidade..... | 49 |
| 3.9.3 - Perda embrionária precoce..... | 52 |
| 4 - Material e método..... | 54 |
| 4.1- Avaliações ultra-sonográficas..... | 56 |
| 4.2- Esquema de colheita de sangue..... | 57 |
| 4.3- Avaliação do escore de condição corporal..... | 57 |
| 4.4 - Dosagem de progesterona e estradiol..... | 58 |
| 4.5 -Inseminação artificial..... | 58 |
| 4.6 -Diagnóstico de gestação..... | 58 |
| 5 - Análises estatísticas..... | 59 |
| 6 - Resultados e discussão..... | 60 |
| 6.1 - Taxas de sincronização da emergência de onda folicular e ovulação..... | 60 |
| 6.1.2 - Ovulações antes do término dos tratamentos..... | 69 |
| 6.2 - Dosagens de progesterona e estradiol..... | 73 |
| 6.3 - Avaliações ultra-sonográficas da dinâmica folicular..... | 81 |
| 6.4 - Taxas de gestação..... | 83 |
| 7 - Conclusões..... | 88 |
| 8 - Referências bibliográficas..... | 89 |
| 9 - Apêndice..... | 112 |

1 - Introdução

A relação custo-benefício é a principal variável a ser observada na incorporação de novas tecnologias em qualquer setor produtivo. Sem as informações corretas sobre esta condição, a aplicação de certas técnicas, em determinadas situações, pode trazer resultados diferentes dos esperados, o que, às vezes, faz com que diminua a credibilidade e o interesse para tal.

O Brasil tem o maior potencial do mundo para evolução de tecnologias em reprodução de bovinos. Possui o maior rebanho bovino mundial, existe uma grande demanda por animais geneticamente superiores, não há limitação territorial para criação e as tecnologias estão dominadas, com índices semelhantes aos de outros países. Estas condições levaram o país à grande evolução da técnica de inseminação artificial e de transferência de embriões em bovinos, nos últimos 10 anos.

Segundo a Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA), cerca de 7% das fêmeas bovinas do rebanho de leite e corte são inseminadas. Pode parecer um percentual baixo, porém ao considerarmos o tamanho efetivo, contabiliza-se pelos menos 7,0 milhões de fêmeas.

Nas estatísticas de 2004 do IETS (International Embryo Transfer Society), o Brasil já figura como o segundo colocado em aplicação da técnica de transferência de embriões.

Embora experimentando apreciável crescimento, a utilização da inseminação artificial (IA) e tecnologia de embriões, visando à multiplicação de genótipos superiores, é pequena, ao considerar-se que o país possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo.

Informações adicionais a respeito de biotécnicas da reprodução bovina como a Sincronização do estro e a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), que visam melhorar os índices reprodutivos e facilitar a disseminação destes procedimentos, são particularmente importantes.

Existem no mercado, inúmeros fármacos que são empregados para a sincronização da ovulação objetivando a IATF, dentre eles, destacam-se os produtos análogos ao GnRH.

O Acetato de Fertirelina é um análogo ao GnRH cuja composição química é $C_{55}H_{76}N_{16}O_{12} \cdot C_2H_4O_2$. Este fármaco foi amplamente utilizado e indicado para

ações terapêuticas como os tratamentos de cistos ovarianos (Nakao et al., 1992; Osawa et al., 1995). Porém, a despeito da utilização deste produto já há algum tempo, as informações sobre a eficiência de doses integrais ou menores de Fertirelina sobre a dinâmica folicular em bovinos são muito inconsistentes. Desta maneira, poucos são os trabalhos que avaliam a eficiência do produto tendo como objetivo a sincronização da onda de crescimento folicular e da ovulação, indispensáveis para qualquer programa de IATF.

Na revisão de literatura, o único trabalho que aborda este tema é o de Yamada et al. (2002), que estudaram a ação do fármaco principalmente em vacas em anestro, o que não é a proposta do presente trabalho. Adicionalmente, tais pesquisadores tentaram avaliar a eficiência da Fertirelina em doses inferiores à convencional em animais ciclando regularmente, porém, utilizaram poucas repetições, o que não conferiu análise estatística.

A relação entre diferentes doses de Fertirelina e taxas de concepção também tem sido pouco estudada bem como os efeitos do decréscimo da dose deste análogo na taxa de sincronização de onda folicular, taxa de sincronização da ovulação, nas concentrações de estradiol e progesterona séricos durante os tratamentos e na função luteal, principalmente em condições brasileiras.

Para tais finalidades, a intenção ao empregar o protocolo “Ovsynch” (OVS), neste presente trabalho, demonstra a preocupação em encontrar o verdadeiro papel do produto na atividade folicular ovariana dos animais, pelo acompanhamento da dinâmica folicular, com o auxílio da ultra-sonografia e dosagem de esteróides séricos e, não apenas por aspectos empíricos, como taxas de gestação. Adicionalmente, a utilização do protocolo “Ovsynch” leva a reduzir outros efeitos que poderiam comprometer a fidelidade do experimento, como o uso de progesterona (dispositivos intravaginais) ou, até mesmo, produtos à base de estradiol.

A utilização de doses menores de análogos sintéticos do GnRH, como a Fertirelina, caso sejam eficientes, nas duas etapas de utilização, podem representar uma redução substancial nos custos destes e de outros protocolos que dependem do mesmos mecanismos de ação. Qualquer alteração, porém, nos protocolos, seja por utilização de novos fármacos, ou por redução da dose, visando diminuição dos custos, merece estudo prévio para se determinar a eficiência, principalmente pela avaliação na dinâmica folicular.

2 - Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

- Investigar a eficiência de duas doses distintas de um análogo ao GnRH, o Acetato de Fertirelina, sobre a sincronização da emergência de onda folicular e indução da ovulação, através da avaliação ultra-sonográfica seqüencial, e quantificar as concentrações de progesterona e estradiol séricos, via radioimunoensaio, em vacas leiteiras, submetidas ao protocolo “Ovsynch”.
- Além disso, pretendeu-se avaliar e comparar as taxas de gestação decorrentes de tais tratamentos.

3 - Revisão da literatura

3.1 - Dinâmica Folicular na espécie bovina.

3.1.1 - Ondas de crescimento folicular.

O processo contínuo de crescimento e regressão de folículos antrais que leva ao desenvolvimento do folículo pré-ovulatório no ovário é conhecido como dinâmica folicular ovariana, o que envolve o desenvolvimento sincrônico de um grupo de folículos, denominado onda folicular (Ginther et al., 1989).

O período do ciclo estral dos bovinos contém em média 21 dias, com variações de 17 a 24 dias, e apresenta, geralmente, uma ou duas ondas de crescimento folicular não ovulatórias e uma onda ovulatória. Para o padrão de duas ondas, a primeira começa no dia 0 (dia da ovulação) e a segunda no dia 10, e para o padrão de três ondas, as emergências ocorrem, em média, nos dias 0, 9 e 16, sendo as duas primeiras anovulatórias (Ginther et al., 1996). O número de ondas por ciclo estral parece estar associado com o comprimento do ciclo e com a duração da fase luteínica (Ginther et al., 1989). Figueredo et al. (1997) comentaram sobre a existência de uma variabilidade individual nos dias de emergência de cada onda, ainda que não haja diferenças na fertilidade de animais que apresentam duas ou três ondas. Adicionalmente, citam ainda que a quantidade de ondas foliculares e os dias do período interovulatório podem variar entre os animais e, também, em um mesmo animal.

Além disso, em bovinos, o número de ondas foliculares pode ser modificado pela estação do ano, dieta ingerida, ordem de parição, estágio lactacional e outros fatores ambientais (Murphy et al., 1991; Lucy et al., 1992b; Wolfenson et al., 1995).

As interações hormonais dentro de uma onda, envolvem gonadotrofinas hipofisárias (LH e FSH), proteínas e peptídeos de origem folicular (inibina A, folistatina), bem como esteróides de origem folicular (estradiol 17 β) ou luteal (progesterona; Mihn et al., 2002), com a PGF2 α uterina apresentando efeito sobre a onda ovulatória (Wiltbank et al., 1998).

Dentro de uma onda folicular, três fenômenos são morfológica e fisiologicamente caracterizados: emergência (recrutamento), seleção (desvio) e

dominância folicular. Sabe-se que as gonadotrofinas hipofisárias, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) atuam na manifestação, manutenção e suspensão destes eventos. Todavia, do ponto de vista hormonal, relatam-se quatro estádios, de acordo com a atividade hormonal “predominante”: (1) gonadotrofina independente, (2) FSH predominante, (3) FSH - LH dependente e (4) LH predominante (Ginther et al., 1996).

Durante uma onda de crescimento folicular, um grupo de folículos emerge, com diâmetros em torno de dois a três milímetros. Nos próximos dias, uma parte destes folículos cresce para 4-6 mm, sendo que, apenas em torno de cinco folículos maiores do grupo continuarão seu desenvolvimento, enquanto outros regridem (Ginther et al., 1996). Deste último grupo, pelo menos um continua o desenvolvimento, tornando-se o dominante. Este termo deve-se ao efeito de dominância sobre os outros folículos da onda, apresentando taxa de crescimento superior aos demais (Ginther et al., 2001).

O folículo ovulatório é formado a partir da última onda folicular do ciclo estral, ao passo que folículos dominantes de ondas anteriores entram em processo de atresia. Esta atresia é determinada pela presença de um corpo lúteo (CL) ativo no ovário, com ampla produção de progesterona. Este hormônio, por sua vez, exerce um efeito de retro-alimentação negativa no eixo *sistema nervoso central-hipotálamo-hipófise-ovário*, reduzindo a amplitude e frequência dos pulsos de LH, o que inviabiliza os processos de maturação final do folículo e ovulação (Ginther et al., 1996). Desta maneira, o folículo dominante será anovulatório se ocorrer durante a fase luteal e ovulatório na fase folicular (Ginther et al., 1996).

O LH tem ação importante no crescimento e desenvolvimento do folículo dominante. Em torno do quarto dia após a ovulação, quando o folículo dominante apresenta aproximadamente 9,0 mm de diâmetro, ocorre a transição da dependência do FSH para LH. Este estágio é crítico para continuar o crescimento do folículo dominante e regressão dos subordinados (Ginther et al., 1996).

3.1.2 - Surgimento do FSH e estimulação das ondas (Emergência).

O mecanismo que regula a dinâmica folicular é embasado nas respostas diferenciais ao FSH e LH (Ginther et al., 1996) além da exposição aos níveis

elevados de progesterona, que parecem ser pré-requisitos para uma expressão normal do estro e para uma fase luteal normal (Wiltbank, 1998).

O folículo dominante de uma onda pré ovulatória secreta estradiol e inibina e, após a ovulação, as concentrações destes hormônios decrescem permitindo o aumento do FSH favorecendo a emergência de uma nova onda de crescimento folicular (Adams et al., 1992; Fortune, 1994, Ginther et al., 1996; Ginther, 2000). Ginther et al. (1989) mencionaram os surgimentos do FSH antecedendo as ondas foliculares independentemente se forem duas, três ou quatro ondas, sendo que este aumento na concentração de FSH ocorre por um período de dois a três dias. O pico de FSH é alcançado no momento que folículos atingem 4 mm de diâmetro (Ginther, 2000).

Ginther et al. (1996) relataram a média de 24 (8-41) folículos de 3 mm de diâmetro emergentes por onda e sua viabilidade foi estabelecida pelo seu subsequente crescimento a um diâmetro maior que 4 mm. O diâmetro máximo obtido pelos 24 folículos foi de 4 mm em 11 folículos, 5 mm em 6 folículos, e diâmetros superiores a 6 mm, em 7 folículos. Ainda Ginther (2000) sugestionou que, todos os folículos acima de 5 mm, contribuíram para o declínio das concentrações de FSH.

Em média, o futuro folículo dominante emerge 10 horas mais cedo que o segundo maior folículo (Ginther et al., 1996). Estes achados indicam que o folículo selecionado leva uma vantagem de tamanho e, de certo modo, ele é o folículo que alcança um diâmetro ou estágio decisivo anterior ao segundo maior; e esta vantagem no desenvolvimento (diâmetro) do maior folículo ocorre ou inicia-se antes da detecção ultra-sonográfica da emergência da onda folicular.

3.1.3 - Divergência folicular e seleção do folículo dominante.

Alguns autores (Ginther et al., 1996, Ginther, 2000, Ginther et al., 2001) estudaram os fatores reguladores intragonadais que intervêm no controle autócrino ou parácrino da função ovariana. Estes pesquisadores relataram que o estradiol e a inibina apresentam uma importante ação durante a divergência do folículo dominante, e que estes hormônios têm a habilidade em reduzir as concentrações circulantes de FSH e, desta maneira, os folículos subordinados começam a regredir. Ainda, esta onda de FSH que é suprimida por um feedback negativo dos produtos

dos folículos em crescimento (principalmente estradiol e inibina), leva a prevenir a emergência de uma nova onda (Ginther et al., 1996; Ginther, 2000).

Colaborando com estas informações, Kaneko et al. (1997) mencionaram que a inibina é um potente regulador da secreção de FSH mesmo na presença de altas concentrações de estradiol e progesterona. Ela é de significância fisiológica na regulação da secreção de FSH em qualquer estágio do ciclo estral.

Quando o maior folículo alcança aproximadamente 8,5-9,0 mm, há a divergência folicular, um folículo, usualmente o maior, continua a crescer, desenvolvendo-se até folículo dominante. Os outros folículos da onda tornam-se subordinados e regridem (Ginther et al., 1996; Ginther, 2000). Esta divergência dos folículos é definida como o momento em que se inicia a maior diferença na taxa de crescimento (mudança no diâmetro entre dois exames consecutivos) entre os dois maiores folículos. Esta definição permite designar o momento da divergência em cada onda de crescimento folicular, como sendo o principal evento no processo de seleção (Ginther et al., 1996).

Após a seleção do folículo dominante, este pode seguir crescendo, pois ele é mais eficiente na utilização do pouco FSH circulante e na aquisição de receptores de LH nas células da granulosa (mais do que se encontram na teca). Assim, o folículo destinado a ser dominante aparentemente tem mais receptores ao LH, o que o designa a uma vantagem competitiva sobre os outros folículos subordinados, permitindo sobreviver em baixos níveis de FSH (Ginther et al., 1996).

Portanto, um outro aspecto a ser considerado do mecanismo de divergência é a mudança na ênfase da dependência das gonadotrofinas do folículo dominante selecionado, o qual continua seu desenvolvimento dirigido pelo LH circulante que suporta seu crescimento por toda a fase de pós-divergência (Ginther et al., 1998; 2001).

As funções principais do LH são: a estimulação da maturação folicular final, a ativação do ovócito para que reinicie a meiose (prófase I para metáfase II), a ovulação e a luteinização das células da granulosa e da teca que formarão o CL (revisado por Bó et al., 2000).

Existem outras substâncias, além do estradiol, inibina, FSH e LH, que necessitam de maiores estudos. O folículo dominante também produz IGF-I, ativina e outros fatores parácrinos ou autócrinos, que estimulam a atividade da aromatase, prolongando a fase de dominância e a atividade estroídogênica folicular, apesar das

concentrações basais de FSH. Simultaneamente, ocorre a atresia do restante dos folículos subordinados (Fortune et al., 2001; Ginther et al., 2001).

O IGF-I é um modulador importante no crescimento folicular, que possui receptores nas células da granulosa e tecais e atua amplificando a ação hormonal das gonadotrofinas (Yuan et al., 1998; Ginther et al., 2001). Durante a atresia, há aumento na expressão de muitos genes, incluindo proteínas ligadoras de IGF (IGFBPs), que estão relacionadas com a diminuição do IGF-I endógeno, o que é essencial para a sobrevivência das células foliculares (Ginther et al., 2001; Fortune et al., 2001).

Yuan et al. (1998) sugeriram que em folículos dominantes, existem mecanismos para aumentar a atividade do IGF envolvendo a redução da quantidade de IGFBPs (ligante da IGF que previne sua atuação no interior do folículo). A hipótese dos autores é que a expressão gênica para IGFBPs sofra alterações durante a dominância folicular. Assim, os resultados de seus experimentos demonstraram que o folículo dominante expressa grandes quantidades de mRNA codificadores de IGF-I e IGF-II, mas são falhos em expressar a IGFBP2 mRNA. Já o folículo subordinado apresenta menores IGF-I e IGF-II mRNAs e abundância em IGFBP2 e os autores comentaram que esta mudança de expressão gênica pode ser um importante mecanismo controlador do crescimento e diferenciação folicular IGF-mediado.

Ginther et al. (1996) descreveram um modelo para explicar o que acontece durante a seleção do folículo dominante. Antes de ocorrer a seleção do folículo dominante (divergência), as células da granulosa de todos os folículos em crescimento estariam produzindo pequenas quantidades de estradiol sob influência do FSH. O FSH atuaria pela estimulação da produção de AMPc nas células da granulosa, que por sua vez, induziria a expressão de enzima aromatase e produção de maiores concentrações de estradiol (Ginther et al., 2001), diminuindo a secreção do FSH. O LH estaria presente, mas não atuaria nas células da granulosa, por não apresentarem ainda receptores para LH. No momento da divergência (~9 mm) o folículo dominante expressaria receptores para LH permitindo aumentar a produção de AMPc mesmo na presença de baixo FSH. O FSH circulante permaneceria baixo devido à inibição pelo estradiol, produzido pelo folículo dominante e, conseqüentemente, os folículos que não expressassem receptores para LH, entrariam em atresia e regrediriam.

Na ausência de luteólise, o folículo dominante deixa de crescer e inicia a regressão, dando lugar ao aparecimento de uma nova onda folicular. A supressão contínua de LH, como consequência da secreção de progesterona da fase luteal (Ginther et al., 2001), causa ao folículo dominante a perda de suas funções metabólicas e este começa a regredir (Ginther et al., 1996).

Por último, a liberação da supressão progestacional ocasionada pela luteólise permite o incremento da frequência de pulsos de LH, um maior crescimento do folículo dominante e altas concentrações de estradiol, os quais induzem finalmente ao pico de LH que é seguido pela ovulação (Ginther et al., 1996; Ginther, 2000). Os diâmetros dos folículos pré ovulatórios, descritos na literatura, em animais com ciclos estrais fisiológicos, podem variar de 13-16 mm, de acordo com Ginther et al. (1989) ou de 15-20 mm, segundo Ginther et al. (2001).

3.2 - Desenvolvimento do Corpo Lúteo (CL) e aspectos gerais dos mecanismos associados à luteólise.

3.2.1 - Desenvolvimento do Corpo Lúteo (CL).

O CL desenvolve-se a partir das células residuais do folículo pré-ovulatório. Antes da ovulação, o folículo é organizado em distintas camadas. As células da granulosa e o oócito são separados das outras camadas foliculares pela membrana basal, e acima dela encontram-se as tecas interna e externa (Milvae et al., 1996). As células das camadas de granulosa e teca interna sintetizam e secretam hormônios esteróides; no entanto, as células da teca externa não são esteroidogênicas. Os capilares de vascularização ao redor dos folículos estão presentes na teca interna e externa, mas estão ausentes na camada de células da granulosa porque a membrana basal atua como uma barreira para a vascularização. O LH, por sua vez, causa a quebra da parede folicular e libera o oócito no momento da ovulação (revisado por Bao e Garverick, 1998).

Após a ovulação, há a diferenciação das células foliculares residuais. As células da teca interna, associadas aos capilares, atravessam a membrana basal que está degradada e invadem a camada da granulosa e do tecido folicular

remanescente, levando ao desenvolvimento do CL, o qual inicia a produção de progesterona em altas concentrações (Niswender et al., 2000).

O CL contém populações de células heterólogas que incluem as grandes células esteroideogênicas luteais (GCL) e as pequenas células esteroideogênicas (PCL), que são células luteinizadas da granulosa e teca folicular, respectivamente (Fields & Fields, 1996). Estes dois tipos celulares perfazem, aproximadamente, 70% do volume do CL (O'Shea et al., 1989). Além do tecido folicular diferenciado, durante a reorganização celular para a formação do CL, há a migração de células endoteliais, fibroblastos (Channing, 1969) e constituintes do sistema imunológico como os leucócitos (Pate, 1994). Estas células apresentam-se intermisturadas em uma extensão que as GCL, PCL, fibroblastos e células endoteliais são unidas proximamente umas com as outras.

Del Vecchio et al. (1995) reportaram que grandes e pequenas células luteais bovinas interagem para regular a produção de progesterona durante os estádios luteais medianos do ciclo estral e que esta interação é modificada por componentes endógenos presentes no CL. Ainda, em sua revisão, citam autores que propõem a existência de um sinergismo entre os dois tipos de células que promovem a produção de progesterona durante o estágio luteal mediano mas, durante os estádios finais do CL, isto é, ao redor do momento da luteólise, este sinergismo é ausente.

Redmer et al. (1991), descreveram que as "gap junctions" permitem a comunicação contato-dependente dentre as populações de PCLs, e entre as PCLs e GCLs; mas a comunicação entre as grandes células não foi detectada. Estes pesquisadores também sugerem que as taxas de comunicação podem ser influenciadas por vários hormônios (PGF_{2α} e LH, por exemplo).

Os mecanismos que parecem controlar a luteinização incluem rotas sinalizadoras intracelulares, fatores célula-adesão, colesteróis, oxisteróis intracelulares e talvez a própria progesterona como reguladora parácrina e/ou autócrina (Murphy, 2000). Vários autores citados por Niswender et al. (2000) mencionaram que os Fatores de Crescimento de Fibroblastos (FGF), Hormônio do Crescimento (GH), LH e o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) são, provavelmente, os reguladores primários da proliferação de fibroblastos, pequenas células luteínicas e células endoteliais.

A proliferação das células endoteliais é um requisito para a neovascularização durante o desenvolvimento luteal, que resulta em uma extensiva rede de capilares sangüíneos (Redmer & Reynolds, 1996), onde a justaposição entre as células luteais e os capilares abastece a alta demanda metabólica do CL, que costuma consumir de duas a seis vezes mais oxigênio por unidade de peso, do que outros órgãos, como o fígado, o rim e o coração (Swann & Bruce, 1987).

3.2.2 - Rota Esteroidogênica Luteal.

O surgimento de LH pré ovulatório resulta na luteinização das células da granulosa e tecais, altera a rota esteroidogênica, e então a progesterona é o primeiro hormônio esteróide produzido por cada um destes dois tipos celulares, após a luteinização (Niswender et al., 2000; Niswender, 2002). O substrato para a esteroidogênese é o colesterol. Sob condições normais, o colesterol é sintetizado pelo fígado e transportado para os tecidos esteroidogênicos como a córtex adrenal, folículos, corpos lúteos e testículos na forma de lipoproteínas (Krisans, 1996). Existem três principais rotas para que o colesterol esteja presente como substrato para a síntese de progesterona, dentre elas, destacam-se as lipoproteínas de alta densidade (HDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), e os ésteres de colesterol. Uma vez dentro das células, as lipoproteínas são quebradas por enzimas para que o colesterol possa entrar na rota esteroidogênica (Milvae et al., 1996; Niswender, 2002).

A síntese de todos os esteróis é dependente do transporte do colesterol para o interior da membrana mitocondrial; este transporte requer um citoesqueleto intacto e a fosforilação da proteína esteroidogênica regulatória aguda (StAR) (Niswender, 2002). Uma vez que o colesterol tenha sido transportado para a matriz mitocondrial, a enzima citocromo P450_{SSC} atua na conversão do colesterol à pregnenolona, que é transportada para o retículo endoplasmático liso (REL), onde a 3 β -HSD converte a pregnenolona em progesterona. Após a síntese, a progesterona deixa a célula aparentemente por difusão, não havendo evidências de que ela possa ser estocada em altas quantidades no interior do tecido luteal (Fields & Fields, 1996; Niswender et al., 2000; Niswender, 2002).

Hormônios luteotrópicos não só regulam o crescimento luteal, mas também, suportam a habilidade do CL em secretar progesterona. Estes hormônios incluem LH, GH, Prolactina, Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF-I), Ocitocina, Prostaglandina E₂ (PGE₂), Prostaglandina I₂ (PGI₂) (Hansel & Blair, 1996; Niswender et al., 2000).

Vários autores comentaram que concentrações fisiológicas de LH aumentam a secreção de progesterona das PCL, mas o LH não aumenta a secreção nas GCL, embora sabe-se que os dois tipos celulares apresentam receptores para este hormônio (Chegini et al., 1991). Em sua revisão, Fields & Fields (1996) comentam que as grandes células luteais não respondem ao LH, secretam ocitocina e são as responsáveis pela maioria da secreção basal de progesterona. Ainda relatam que as GCLs parecem submeter-se a muitas transcrições morfológicas que refletem eventos fisiológicos importantes. Em contraste com as grandes células luteais, as pequenas células apresentam baixas produções basais e, quando estimuladas pelo LH, aumentam a secreção de progesterona. Enfim, os dois tipos de células divergem na resposta às diferentes estimulações hormonais ou pelos segundos mensageiros (revisado por Niswender et al., 2000).

Outros hormônios luteotrópicos participam na regulação da secreção de progesterona. O GH (Libermann & Schams, 1994) e o IGF-I (Sauerwien et al., 1992), aumentam a secreção de progesterona no tecido luteal. Ambos receptores para IGF-I e GH estão localizados nas GCLs, portanto, podem ser importantes para a manutenção dos altos níveis de progesterona secretados nessas células. Adicionalmente, o GH pode influenciar, indiretamente, a função luteal pelo aumento da expressão de IGF-I, que é sintetizado pelo CL e estimula a secreção de progesterona, além de inibir a morte celular, permitindo a manutenção do peso luteal (Lucy et al., 1993).

A ocitocina é encontrada somente nas GCLs e é liberada pela estimulação à PGF₂α. Apresenta via de ativação pela proteína quinase C, resultando no aumento do Cálcio livre intracelular. Presumivelmente, as prostaglandinas produzidas localmente podem atuar na liberação da ocitocina. Porém, a ocitocina também apresenta efeitos na síntese de progesterona e este efeito parece ser concentração – dependente. Pate (1996), em sua revisão, descreveu alguns autores que comentaram que baixas concentrações de ocitocina

estimulam a produção de P_4 , enquanto as altas concentrações são inibitórias. Isto permite sugerir que o trabalho da ocitocina (sintetizada nas GCLs) é de um regulador parácrino da esteroidogênese.

3.2.3 - Aspectos gerais dos mecanismos associados à luteólise.

O CL de um ciclo estral nos bovinos é uma estrutura dinâmica com um período de vida de aproximadamente 17-18 dias (Ohtani et al., 1998). Na ausência da prenhez, o CL submete-se à regressão morfológica e funcional. Este processo, chamado de luteólise, é caracterizado pela cessação da produção de progesterona e perda dos componentes celulares, incluindo redução do suprimento vascular, proliferação do tecido conjuntivo, aumento da desorganização celular, degeneração e fagocitose das células luteais (Carlson et al., 1982).

Evidências para a deterioração morfológica do CL são observadas, mais precocemente, pelo dia 14 do ciclo estral e no dia 200 em vacas gestantes. Vacas leiteiras parecem apresentar o processo de regressão luteal (17º dia) mais tardio que vacas de corte (14º dia), podendo ser explicado por um maior e mais ativo CL, o que provoca um maior intervalo interovulatório (Fields & Fields, 1996).

A $PGF_{2\alpha}$ endógena é um hormônio derivado do ácido araquidônico e sintetizada, principalmente, pelas células epiteliais do endométrio (Spinosa et al., 1997). Sua função principal na reprodução é provocar a regressão do CL, através do processo de luteólise (Tsai & Wiltbank, 1997). A luteólise natural é iniciada pela liberação uterina de $PGF_{2\alpha}$ e esta pode atuar diretamente nas células luteais para diminuir a produção de progesterona (Pate, 1994), culminando com o retorno ao estro nos animais. Pode-se dizer que a $PGF_{2\alpha}$ é responsável pelo tempo de vida do CL (Spinosa et al., 1997) causando sua regressão morfológica e funcional (Kotwica et al., 2002), sendo que a regressão funcional precede a regressão morfológica (Viana et al., 1999). A luteólise funcional é caracterizada pela diminuição da secreção de progesterona e, a estrutural, pela perda dos componentes celulares e degradação tecidual (Pate, 1994; Miyamoto, 1996; Viana et al., 1999).

Em ruminantes domésticos, somente uma pequena quantidade da $PGF_{2\alpha}$ uterina alcança o ovário, por difusão da veia uterina para a artéria ovariana (mecanismo denominado de contracorrente), com mais de 95% da $PGF_{2\alpha}$ sendo metabolizada a componentes inativados como a 15-ceto-13, 14-diidroprostoglandina

F2 α , por uma única passagem pelos pulmões (Ferreira & Vane, 1967). Ao alcançar o CL, o efeito luteolítico da PGF2 α resulta da associação com os receptores presentes na membrana plasmática das células luteais, levando à inibição da síntese de progesterona luteal (Niswender et al., 2000). Um pulso inicial de prostaglandina, mesmo sendo de baixa magnitude, pode potencialmente iniciar os mecanismos para que as grandes células luteínicas produzam consideráveis concentrações locais de PGF2 α (Tsai & Wiltbank, 1997). Isto pode explicar porque uma pequena quantidade de PGF2 α uterina é capaz de iniciar a regressão luteal. Assim, dois mecanismos podem existir para a amplificação dos pulsos de PGF2 α . Em primeiro, a PGF2 α uterina pode estimular a liberação de ocitocina pelo CL, a qual estimula a produção de mais PGF2 α uterina dentro de minutos do início do pulso (Baird, 1992). Em adição, a PGF2 α uterina pode estimular a produção de PGF2 α intraluteal (Tsai & Wiltbank, 1997).

Embora a PGF2 α possa iniciar a luteólise funcional, mecanismos adicionais parecem ser necessários para a luteólise completa. A luteólise é um evento contínuo, e a distinção entre mudanças funcionais e estruturais se faz-se necessária para entender o processo como um todo. As grandes células luteínicas, provavelmente, respondem inicialmente ao sinal luteolítico, mas as comunicações entre grandes e pequenas células, bem como entre células luteais e não luteais parecem ser requeridas para a regressão completa se proceder (Pate, 1994; Spinosa et al., 1997).

O sistema imune está ativamente envolvido no processo de luteólise, onde é possível que as células luteais ativem certos tipos de sinais para as células imunológicas (MHC, IFN- γ e TNF- α), permitindo a infiltração de células linfocíticas no CL bovino, a partir do dia 14 do ciclo estral, antes mesmo do início da luteólise natural (Webb et al., 2002).

A principal função das células imunes no CL, neste estágio, é a fagocitose levando à luteólise estrutural (Miyamoto, 1996). As células imunológicas produzem citocinas que podem modificar a síntese de progesterona e prostaglandinas pelas células luteais. Podem, também, apresentar efeitos citotóxicos diretos nas células luteais, e as células mortas são fagocitadas pelos macrófagos. Também, fatores secretados pelas células luteais podem servir como quimiotáticos para as células imunes, aumentando ou suprimindo suas funções (Pate, 1996).

Adicionalmente, pesquisas foram realizadas para determinar se a regressão luteal ocorre por processos degenerativos de apoptose. Houve evidências morfológicas de que as células não esteroidogênicas (células não luteais) presentes no CL sofrem apoptose, possivelmente iniciada por hipóxia (Niswender et al., 1990). Admitiu-se que a Endotelina-1 (ET-1) seja um possível mediador dos efeitos da $PGF2\alpha$ no fluxo sanguíneo luteal. Ela é um potente vasoconstritor e também inibe a atividade de células esteroidogênicas, pois reduz o fluxo sanguíneo durante a luteólise inicial pela constrição arteriolar. Esta redução do fluxo sanguíneo determina uma condição de hipóxia, o que pode causar a liberação adicional de Endotelina-1 (Milvae et al., 1996). A ET-1, que é produzida pelas células endoteliais que revestem estes vasos sanguíneos, desempenha um papel crucial durante a luteólise induzida pela $PGF2\alpha$ (Levy et al., 2000), sendo, a Endotelina-1, um mediador/promotor luteolítico local na regressão do CL (Ohtani et al., 1998). Estas condições sugeriram que a $PGF2\alpha$ e a ET-1 são importantes na rápida cascata funcional da luteólise “in vivo”, com uma possível interação entre as células endoteliais e luteais durante a luteólise (Ohtani et al., 1998).

A $PGF2\alpha$ causa diminuição do fluxo sanguíneo ao ovário e também há a queda na produção de progesterona. Parece que o processo de luteólise pode ser primeiramente iniciado pela interação da $PGF2\alpha$ com receptores específicos localizados na membrana plasmática das grandes células luteais (via proteína kinase C/segundo mensageiro, que diminuirá a esteroidogênese), e que a vasoconstrição seja um efeito secundário. As ações combinadas da $PGF2\alpha$ e a liberação de ocitocina local podem levar a vasoconstrição, isquemia, hipóxia e quimiotaxia de células imunológicas (Pate, 1996) e, a seguir, à redução dos níveis de progesterona. Esta hipóxia e isquemia levariam não somente à diminuição da secreção de progesterona, mas também, à apoptose das células não luteais, primeiramente em células endoteliais, depois parenquimais e, por último, nos fibroblastos.

Niswender et al. (1990) estudaram a luteólise em ovelhas e concluíram que: 1) a luteólise foi iniciada por uma ação direta da $PGF2\alpha$ nas grandes células luteais; 2) a diminuição dos níveis circulantes de progesterona refletiu uma combinação da redução da esteroidogênese e do fluxo sanguíneo luteal; 3) o estímulo primário para a apoptose nas células parenquimais, fibroblastos e células endoteliais foi a hipóxia, devido a isquemia provocada por uma vasoconstrição e

oclusão vascular, seguido de liberação de células endoteliais para o interior do lúme dos pequenos vasos sangüíneos.

3.2.4 - Refratariedade do CL.

Nas espécies domésticas e primatas, a regressão do CL capacita (ativa) o desenvolvimento de um novo folículo pré ovulatório. No entanto, durante os estádios iniciais do ciclo, que são caracterizados por uma massiva neovascularização, o CL é refratário a uma única aplicação de PGF2 α . Somente nos dias cinco aos 16 após o estro, a PGF2 α exógena causa regressão do CL bovino (Tsai & Wiltbank, 1997); outros pesquisadores (Momont, 1992) relataram que a PGF2 α (cloprostenol) somente será efetiva a partir do dia sete do ciclo.

A regressão luteal causada pela PGF2 α apresenta, primariamente, sua ação através dos receptores específicos presentes na membrana plasmática das grandes células luteínicas (Sakamoto et al., 1995), onde o mRNA destes receptores de PGF2 α é altamente expressado e acumulado nas grandes células luteais em estádios não específicos do ciclo estral (Sakamoto et al., 1994; Sakamoto et al., 1995; Wiltbank et al., 1995; Tsai & Wiltbank, 1998). A responsividade do CL à PGF2 α aumenta com o tempo, sendo que a afinidade de adesão da prostaglandina aos receptores aumenta 203 vezes dos dias 13 ao 20 do ciclo estral (Rao et al., 1979) apresentando sensibilidade máxima no final da fase luteal (Berardinelli & Adair, 1989 citado por Colazo et al., 2002). Portanto, PGF2 α não irá induzir a luteólise nos primeiros cinco dias do ciclo estral, quando o CL está em fase inicial de desenvolvimento (Thatcher & Chenault, 1976), embora apresentando mRNA dos receptores para tal. Em adição, a inabilidade de resposta, nesta fase, também parece ser devido a uma carência de expressão de outros mediadores que levam a esta luteólise (Tsai & Wiltbank, 1998; Levy et al., 2000).

Pate (1994) revisou que, esta refratariedade até o dia cinco do ciclo estral, pode não ser atribuída a uma carência de receptores a PGF2 α e, sim, pelo fato da PGF2 α não alcançar o CL inicial do ciclo estral, porque o fluxo sangüíneo é desviado em direção ao útero e para fora do ovário durante esta fase, em bovinos. Em conclusão, a carência de responsividade do CL inicial não é atribuída a uma deficiência de receptores de alta afinidade (Wiltbank et al., 1995), e uma possível explanação para a ausência da regressão de CLs iniciais, após a injeção de PGF2 α ,

seria a incompleta vascularização do CL ou incompleta diferenciação dos mecanismos degenerativos nas células luteais. Pode-se sugerir que o tipo de célula que medeia ações luteolíticas da PGF2 α , possivelmente o endotélio, pode ser não responsivo durante a fase luteal inicial (Levy et al., 2000).

Tsai & Wiltbank (1997, 1998) mencionaram que a prostaglandina apresenta curta meia vida e, portanto, precisa ser atuante apenas na sua primeira passagem pelo CL. A prostaglandina produzida pelas células luteais é de grande importância para a completa luteólise. Esta é uma das suposições sobre o CL inicial não ser capaz de sofrer luteólise: ele não é capaz de expressar a prostaglandina G/H Synthase-2 (PGHS-2) a qual sintetiza a prostaglandina nas grandes células luteínicas. Há evidências de que a PGF2 α , provavelmente, atue por meio da rota proteína quinase C/ cálcio livre intracelular, e isto pode estimular as grandes células luteais a expressar PGHS-2 e produzir PGF2 α . Esta PGF2 α luteal possivelmente tenha função autócrina/parácrina para aumentar o efeito luteolítico da prostaglandina de origem uterina.

3.2.5 - Importância da PGF2 α e seus análogos para a sincronização.

A Prostaglandina F2 α (PGF2 α) ou seus análogos são comumente administrados pela via intramuscular (IM) para sincronização de estro, em várias espécies, incluindo bovinos (Dutt & Kharche, 2000). Admite-se que o estro decorrente de uma injeção de PGF2 α apresenta fertilidade comparável à fertilidade dos animais que sofrem luteólise natural (Burfening et al., 1978; Jackson et al., 1983). Adicionalmente, as relações entre os eventos hormonais e ovarianos são similares em animais prostaglandina-tratados ou não tratados (Thatcher & Chenault, 1976; Quirk et al., 1986; Viana et al., 1999). Corroborando com estas informações, Twagiramungu et al. (1996) relataram que, nos programas de sincronização de estro, a PGF2 α não apresenta efeito detrimental na fertilidade das receptoras, nos programas de transferência de embriões.

Devido ao seu efeito luteolítico, a PGF2 α é um agente efetivo no controle da ovulação em bovinos. No entanto, em condições de campo, a aplicação de análogos da PGF2 α necessita ser esquematizada para que possa promover a luteólise na maioria dos animais tratados (Thatcher & Chenault, 1976). Em relação aos diferentes análogos da PGF2 α utilizados para sincronização de estro, destaca-

se o Cloprostenol Sódico (Ciosin[®] - Schering Plough). O efeito luteolítico do Cloprostenol Sódico já é conhecido e apresenta provas nos resultados a campo de que a fertilidade, após o uso desta droga, é considerada normal (Cooper, 1981; Jackson et al., 1983; Tanabe & Hann, 1984). Além do Cloprostenol, existem no mercado vários produtos de ação luteolítica como Dinoprost Trometamina (Tanabe & Hann, 1984), Etiproston (Costa et al., 2000) e Lupristol (Cardova et al., 1990; Dutt et al., 1995; Kharche et al., 1996).

Costa et al. (2000) avaliaram a eficiência da aplicação de uma única dose de luteolítico sobre a taxa de sincronização e o intervalo da aplicação da droga à manifestação do estro em vacas zebu, não encontrando diferenças na taxa de sincronização nas diferentes doses e nem entre os análogos Etiproston e Cloprostenol.

3.3 - Fatores que afetam a detecção de estro e principais vantagens da IATF.

A obtenção de boa eficiência reprodutiva é de suma importância na espécie bovina. Nesta espécie, o período de gestação é longo, e caso queira-se obter um produto por vaca, em idade reprodutiva ao ano, estas devem ficar gestantes num período curto após o parto. Adicionalmente, o desempenho reprodutivo é o responsável direto pela produção de leite por dia de vida útil da vaca, número de animais de reposição, redução de custos e aumento do ganho genético (Vasconcelos, 2000). Portanto, a utilização da sincronização de estro e outras tecnologias que visam melhorar a performance reprodutiva são especialmente importantes neste contexto.

A Inseminação Artificial em Tempo Fixo ou Tempo Pré-determinado (IATF) é uma técnica que visa facilitar o manejo da inseminação artificial, reduzindo a mão-de-obra e concentrando as atividades (Barros et al., 2000). Como qualquer outra técnica, não pode ser aplicada em todas as condições de manejo existentes e merece uma detalhada avaliação do seu custo benefício, pois os resultados dos trabalhos de pesquisa apontaram, além de um custo de medicamentos muito elevado, taxas de gestação similares (Pursley et al., 1997a, b; Cartmill et al., 2001a) ou levemente inferiores (Burke et al., 1996; Stevenson et al., 1996, 1999; Jemmeson, 2000) aos protocolos padrão de inseminação. Porém, pesquisas

observaram um aumento da taxa de concepção e prenhez após IATF (Moncilovic et al., 1998) comparados com IA após estro sincronizado com PGF2 α .

Desta maneira, um dos principais objetivos da IATF é a inseminação artificial sem a necessidade de observação de estro, pois, no decorrer dos anos, com o aumento do rebanho e da produção de leite por animal, a disposição dos animais em pisos de concreto ou ainda em free-stalls, dentre outros fatores, levam os sinais de cio a ficarem menos “visíveis” e/ou evidentes, o que acarreta em diminuição das taxas de concepção e, por conseguinte, menores taxas de prenhez da propriedade (Thatcher et al., 2001b; Yamada, 2005).

Falhas na detecção de estro reduzem o desempenho reprodutivo e, indiretamente, a produção de leite por dia de intervalo de partos (Britt, 1985). Um prolongado período para a primeira inseminação, resultante da inadequada taxa de detecção de estro, também aumenta o intervalo. Estes dois fatores são altamente correlacionados: redução de um dia no intervalo parto-primeira IA, reduz o intervalo de partos em 0,86 dias (Youngquist & Bierschawal, 1985).

A detecção visual do estro depende de inúmeros fatores. Em primeiro lugar, deve-se saber reconhecer os sinais comportamentais para determinar se a vaca deve ou não ser inseminada e o horário correto da inseminação. Falhas na detecção causam decréscimo na taxa de concepção e, conseqüentemente, aumento do período de serviço (Foote, 1975). O tempo gasto por dia e o horário de observação são muito importantes na eficiência da detecção de estro. Com o aumento do número de vezes/dia gastos na observação, aumenta-se a eficiência da detecção (Heersche & Nebel, 1994). Porém o momento desta também é importante. Além disto, maior número de vacas em estro no mesmo período do dia pode aumentar o número de vacas detectadas (Donalson, 1977).

Manifestações de estro são menores devido às doenças, problemas nos membros e pés ou a outros fatores estressantes (Lucey et al., 1986). Fatores ambientais (estresse térmico) podem influenciar o número de montas durante o período de estro (Hall et al., 1959), e também decrescem a duração e a intensidade do mesmo (Poston et al., 1962). Vacas alojadas em piso de concreto também mostram o cio em menor intensidade que vacas mantidas a pasto (Britt, 1985). A expressão do comportamento do estro também pode ser afetada pelo aumento da produção de leite (Fonseca et al., 1983; Harrison et al., 1990; Nebel & MacGilliard, 1993). Portanto, a eficiência na detecção irá, provavelmente, continuar a afetar a

eficiência reprodutiva em fazendas com seleção genética e com práticas de manejo que continuam a aumentar a produção de leite/vaca (Fricke et al., 1998).

A falta de acurácia na detecção de estro devido às causas descritas acima, não somente prolonga o intervalo à primeira IA, mas também, pode aumentar a duração média dos intervalos entre as inseminações por 40-50 dias (Stevenson & Call, 1983). Resumindo, são muitos os fatores que influenciam a rotina da observação de estro, o que a torna muitas vezes falha, levando à baixa taxa de detecção, menor taxa de prenhez, aumento do período do parto à primeira IA e conseqüentemente, maior intervalo de partos. Desta maneira, a técnica de IATF vem eliminar a necessidade de observação de cios, que quando insatisfatória, acarreta grandes prejuízos à pecuária leiteira.

3.3.1 - Vantagens da IATF.

A inseminação artificial mostrou ser uma técnica viável economicamente para acelerar o ganho genético e o retorno econômico da pecuária. No entanto, em todo o mundo existem relatos que indicam baixa taxa de serviço em bovinos, devido também ao comprometimento na eficiência de detecção de estro (Senger, 1994; Pankowski et al., 1995). Desta forma, programas que visam empregar a inseminação em tempo fixo, sem a necessidade de observação do estro, podem colaborar no aumento do emprego desta tecnologia e, possivelmente, na taxa de prenhez, pelo aumento da eficiência reprodutiva (Wiltbank et al., 1998; Thatcher et al., 2001a).

Porém, a simples justificativa de eliminar a observação de estro não pode ser considerada como principal argumento para o emprego da IATF. A maior parte dos trabalhos relatou que não se consegue detectar mais que 50% dos cios (Senger, 1994). Isto pode ser verdade em rebanhos mal manejados, onde a tarefa de detecção não fica a cargo de uma pessoa capacitada para tal. No Brasil, a mão-de-obra é muito barata e a possibilidade de investir em treinamento do pessoal responsável pela detecção do estro é uma alternativa a ser considerada (Fernandes, 2004).

Outro detalhe é que esta técnica (IATF) elimina a necessidade de observação de estro para a inseminação artificial somente durante o protocolo. É imprescindível a correta detecção dos animais que retornam ao cio após a inseminação em tempo fixo, para que sejam re-inseminados o mais rápido possível.

Caso contrário somente poderiam ser reutilizados após o diagnóstico de gestação, o que levaria tempo e, com certeza, prejudicaria a eficiência reprodutiva (Fernandes, 2004).

As principais vantagens da Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) seriam: eliminar o trabalho com detecção de estro durante o protocolo; possibilitar que a IA pode ser realizada conforme planejamento da propriedade; diminuir o número de IAs por vaca a ser inseminada; reduzir a variação de produção de leite mensal; servir como ferramenta para o manejo reprodutivo por facilitar o manejo da IA; concentrar o trabalho em dias pré-determinados; aumentar o número de animais inseminados e possibilitar o planejamento dos partos e da estação de monta subsequente (Thatcher et al., 2001a; Yamada, 2005). Adicionalmente, algumas propriedades têm usado a IATF em todas as vacas da fazenda, após o período voluntário de espera, para tratamento de anestro pós-parto (visando o retorno da ciclicidade) e vacas com cisto ovariano, além de sincronização da ovulação em receptoras e doadoras de embriões (Yamada, 2005).

3.4- Utilização do GnRH, eventos hormonais e ovarianos relacionados com a administração deste hormônio em protocolos de IATF – “Ovsynch”.

Os protocolos de IATF possuem muitas variações, um deles, bastante difundido em rebanhos leiteiros é o “Ovsynch” (Jobst et al., 2000). Este protocolo foi descrito pela primeira vez por Pursley et al. (1995) e compreende de três principais etapas: uma dose de GnRH ou análogo administrado nas vacas em qualquer estágio do ciclo estral para sincronização da emergência da onda de crescimento folicular, uma dose de luteolítico sete dias após, para regressão de um possível corpo lúteo (CL), e uma segunda dose de GnRH dois dias posteriores ao luteolítico, para a sincronização da ovulação.

3.4.1 - Etapa 1: Sincronização da onda de desenvolvimento folicular.

Inicialmente, promove-se a sincronização da onda de desenvolvimento folicular pela eliminação de um possível folículo dominante. Este folículo poderia sofrer atresia, ovular (Thatcher et al., 1989; Twagiramungu et al., 1992; Yamada et al., 2002) ou sofrer luteinização parcial (Thatcher et al., 1989; Guilbault et al., 1990;

Macmillan et al., 1991; Pursley et al., 1995); estes dois últimos fatores levando ao aumento dos níveis de progesterona endógenos, evitando novas ovulações por um período. Isto pode ser conseguido pela aplicação de um análogo do GnRH, o qual, indiretamente, provoca o efeito citado acima (Cartmill et al., 2001a; Lane et al., 2001a). Ainda poderia ser utilizado o LH (Sartori et al., 2001), porém o custo deste hormônio inviabiliza sua aplicação.

As principais variáveis que condicionam o sucesso da sincronização da onda de desenvolvimento folicular são o “status” folicular ovariano no momento da aplicação (Bigelow et al., 1998) e a capacidade dos diferentes fármacos e doses em provocar, direta ou indiretamente, a atresia, luteinização ou ovulação de um possível folículo dominante (Ryan et al., 1998).

O primeiro aspecto está relacionado à presença e à sensibilidade (receptores) do folículo dominante ao LH endógeno (Ginther et al., 1996; Sartori et al., 2001). A média de diâmetro do maior folículo que inicia o desvio folicular é de aproximadamente 8,5 mm (Ginther et al., 1996). Os mecanismos que levam à divergência folicular não estão ainda bem definidos, mas parecem estar intimamente associados com a indução de receptores ao LH nas células da granulosa, num aumento das concentrações circulantes de estradiol-17 β e decréscimo de FSH plasmático (Ginther et al., 1996, 2000; Beg et al., 2001). Porém, embora o desvio folicular aconteça por volta dos 8,5 mm de diâmetro, somente folículos acima de 10 mm (o que corresponde a um dia após a divergência folicular), apresentarão capacidade ovulatória (Silcox et al., 1995; Pursley et al., 1995; Sartori et al., 2001), por apresentarem altas concentrações de receptores para o LH nas células da granulosa, as quais irão responder às aplicações exógenas de GnRH (Sartori et al., 2001).

Desta maneira, caso o tratamento seja iniciado na presença de um folículo dominante acima de 10 mm de diâmetro, uma nova onda folicular é sincronizada (emergência de uma nova onda folicular) dentro de 48 horas após administração do GnRH (Pursley et al., 1995; MacMillan et al., 2003). Vale lembrar que o desenvolvimento da onda folicular poderá continuar inalterado se a injeção de GnRH ocorrer antes que a dominância folicular for estabelecida (Ryan et al., 1998).

Um segundo aspecto a ser mencionado é a capacidade dos diferentes fármacos análogos ao GnRH e suas referidas doses em provocar direta ou indiretamente uma ação no folículo ovulatório. Ryan et al. (1998) comentaram que,

mesmo na presença de um folículo dominante, os efeitos das administrações exógenas de GnRH, neste folículo, e o intervalo para a emergência de uma nova onda será dose-dependente. Nestas condições, a eficiência do fármaco aplicado (sua potência biológica) é de grande importância, onde a dose deve ser suficiente para induzir a liberação de quantidades ótimas de LH, que poderiam agir no folículo dominante (Fricke et al., 1998).

3.4.2 - Etapa 2: Administração de análogo a PGF2 α .

Entre os dias sete ou oito após a indução da sincronização da onda folicular, utiliza-se um luteolítico (prostaglandinas), visando reduzir as concentrações circulantes de progesterona, para permitir o final do crescimento folicular até o estágio compatível com a ovulação. Estima-se que o desenvolvimento folicular até o estágio ovulatório seja bem padronizado, pois foi feita previamente a sincronização da onda de desenvolvimento folicular (Twagiramungu et al., 1992; Wolfenson et al., 1994; Pursley et al., 1995, 1997a). Esta prostaglandina pode atuar em um corpo lúteo prévio ao início do tratamento e/ou numa estrutura luteal formada pela etapa anterior (GnRH). Existindo esta estrutura neoformada, é necessário que a mesma esteja sensível a prostaglandina para que este fármaco possa atuar (Thatcher et al., 1989; Twagiramungu et al., 1992; Wiltbank et al., 1996).

Sobre esta observação, Twagiramungu et al. (1992) utilizaram uma dose de GnRH e uma segunda dose de PGF2 α para avaliar a resposta de sincronização do estro em vacas cíclicas, e obtiveram altas taxas de sincronização (83%) quando os animais, tratados com buserelina (análogo ao GnRH), receberam a PGF2 α no sexto dia após o primeiro tratamento. Já Thatcher et al. (1989) sugeriram que a aplicação de prostaglandina no dia oito ao invés do dia seis ou sete após início do tratamento, deve melhorar a sincronização.

3.4.3 - Etapa 3: Sincronização da ovulação e inseminação artificial em tempo pré determinado (IATF).

A etapa final seria induzir a ovulação do folículo já desenvolvido em um período padrão em todos os animais, para que possa pré-determinar o momento da

inseminação. Isto geralmente é conseguido com a administração de análogos de GnRH, que levam à ovulação cerca de 24-32 horas pós aplicação (variação de apenas 8 horas; Pursley et al., 1995; Barros et al., 1998; Tefera et al., 2001).

Posteriormente a esta última aplicação de GnRH é realizada a IATF. Pursley et al. (1998) objetivaram encontrar o melhor momento para a realização da IATF, isto é, averiguarem qual período a inseminação deveria ser realizada após a última aplicação de GnRH, e que resultaria em melhores taxas de prenhez, utilizando o protocolo “Ovsynch” em vacas leiteiras. Os autores relataram que um momento ótimo para a IA não ficou mostrado claramente, visto que taxas similares de prenhez foram obtidas quando a IA foi realizada nos períodos zero e 24 horas após o segundo GnRH. Entretanto, a IA após 32 horas resultou em baixas taxas de gestação e altas taxas de perda embrionária, isto porque uma variação de 8 horas parece ser requerida para o espermatozóide tornar-se capacitado a alcançar a porção da ampola do oviduto e, conseqüentemente, fertilizar o oócito (Hunter & Wilmut, 1983). Quando a IA é realizada após a ovulação, isto é, 32 horas após o GnRH, o oócito estará em condições pouco recomendadas para a fertilização, cerca de 8-16 horas pós ovulação. Esta idade avançada do oócito (acima de 8 horas após a ovulação) é um dos principais contribuintes para as menores taxas de prenhez/IA e altas taxas de perda embrionária (Vasconcelos et al., 1997a; Pursley et al., 1998).

Corroborando com estas afirmações, a maioria dos autores que trabalharam com o protocolo “Ovsynch” em bovinos costuma realizar a IATF no tempo pré fixado de 16 a 20 horas após a administração do segundo GnRH (Burke et al., 1996; Moncilovic et al., 1998; Stevenson et al., 1999; Cartmill et al., 2001a; Yamada et al., 2002; Tenhagem et al., 2004).

3.5 - Taxas de sincronização da emergência de onda e ovulação com a utilização do protocolo “Ovsynch”.

Vasconcelos et al. (1999) trabalharam com o “Ovsynch” visando avaliar o efeito do início do protocolo em dias conhecidos do ciclo estral. A porcentagem de vacas (n=156) que ovularam, a primeira administração de um análogo ao GnRH, foi de 64%, variando com o estágio do ciclo ($P < 0,01$) que foi iniciado o tratamento, com baixas taxas de ovulação nos dias 1-4 (23%) e altas taxas entre os dias 5-9 (96%), porém não houve diferenças na porcentagem de animais que ovularam após a

segunda aplicação. Relataram ainda, que o tratamento com luteolítico foi efetivo com 93% dos animais apresentando concentrações de progesterona circulantes abaixo de 1 ng/mL no dia da segunda administração do fármaco (GnRH). A porcentagem de vacas que ovularam após o segundo GnRH (taxa de sincronização) foi de 87%.

Fricke et al. (1998) iniciaram o protocolo “Ovsynch” em dias não conhecidos do ciclo estral e encontraram taxas similares de sincronização (84%) àquelas relatadas acima. Twagiramungu et al. (1992) trabalharam apenas com uma dose de GnRH e outra de PGF2 α seis dias após, para sincronização do estro em vacas de corte, e também obtiveram altas taxas de sincronização (83%). Porém, Cartmill et al. (2001a) reportaram incidência mais baixa de sincronização (68%) quando o protocolo “Ovsynch” foi utilizado em vacas cíclicas em estágio aleatórios do ciclo estral.

Yamada et al. (2002) trabalharam com um número pequeno de animais nas fases foliculares (n=5) ou luteal do ciclo estral (n=12), no início do protocolo “Ovsynch”. Para os animais da fase folicular, quatro de cinco animais ovularam após o primeiro tratamento com análogo de GnRH (Acetato de Fertirelina), mas 100% delas ovularam após a segunda administração. Para os animais da fase luteal, apenas quatro dos 12 animais ovularam no início do protocolo e 10 delas ovularam ao final do mesmo. Uma vaca não ovulou até 48 horas após segunda aplicação e, outra, ovulou antes do término do protocolo (entre as aplicações de PGF2 α e segundo GnRH). Desta maneira, a taxa de sincronização foi menor para as vacas que iniciaram o tratamento na fase luteal.

Vasconcelos et al. (1999) também verificaram que alguns animais (6%) ovularam antes da segunda injeção de GnRH e 7% deles não apresentaram ovulação 48 horas após a segunda administração. Neste referido estudo, foi encontrado que 96% das vacas que estavam entre os dias 5 aos 9 do ciclo estral, no início do protocolo, ovularam em resposta ao GnRH. Esses dados são consistentes com pesquisas que afirmam que folículos em crescimento, maiores que 10 mm de diâmetro, apresentam capacidade ovulatória após tratamento com análogos ao GnRH (Silcox et al., 1995; Pursley et al., 1995; Sartori et al., 2001). Estas afirmações foram semelhantes ao relatado por Twagiramungu et al. (1992), os quais afirmaram que a sincronização do estro foi mais efetiva (em gado de corte) quando administraram o GnRH em animais que apresentavam folículos acima dos 10 mm de diâmetro.

Ginther et al. (1996) descreveram que próximo à metade do ciclo estral há uma perda da dominância funcional do maior folículo da primeira onda folicular, aumentando as concentrações de FSH, com a emergência de uma nova onda. Porém, a perda desta dominância é variável e pode ser alterada por muitos fatores, incluindo nutrição (Murphy et al., 1991), estresse térmico (Wolfenson et al., 1995) e tratamentos com hormônio do crescimento (Lucy et al., 1994; Kirby et al., 1997). Vasconcelos et al. (1999) atribuíram a estes comentários à variabilidade de resposta encontradas nas taxas de ovulação após a primeira injeção do GnRH (54%), nos animais que estavam entre os dias 10 a 16 do ciclo estral no início do protocolo. Adicionalmente, estes pesquisadores relataram que a porcentagem de animais que estavam no final do ciclo estral (dias 17-21) e que ovularam ao primeiro GnRH, foi dependente se uma nova onda de desenvolvimento folicular está ocorrendo no momento da aplicação, isto é, se o animal apresentava duas ou três ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral.

Em um estudo prévio realizado em vacas de leite com duas ondas foliculares (Pursley et al., 1996), foi detectado 100% de taxa de ovulação. Porém, Vasconcelos et al. (1999) encontraram somente 77% dos animais que estavam entre os dias 17-21 do ciclo ovulando após a primeira injeção do GnRH. Isto deve ter acontecido graças ao aumento do número de animais com três ondas foliculares, já que alguns efeitos como o estresse térmico e/ou o tratamento com bST alteram os padrões de desenvolvimento folicular levando a ondas foliculares mais curtas (Wolfenson et al., 1995; Kirby et al., 1997).

3.6- Aplicações do GnRH e principais análogos utilizados em programas de IATF.

3.6.1 - Aplicações práticas do GnRH.

Dentre as principais aplicações do GnRH e seus análogos estão o tratamento para cisto ovarianos (Osawa et al., 1995; Lopez-Gaitus & López-Béjar, 2002), a melhoria nas taxas de concepção quando administrados no momento ou após IA (Mee et al., 1990; Rettmer et al., 1992; Kaim et al., 2003), a indução da ovulação e a sincronização de ondas de desenvolvimento folicular (Thatcher et al., 1993; Pursley et al., 1995, 1997a,b, 1998; Costa, 1997; Cartmill et al., 2001a;b;

Lemaster et al., 2001), sendo que estas duas últimas considerações possuem várias aplicações na reprodução de bovinos (Stevenson et al., 1999; Bartolome et al., 2002; Macmillan et al., 2003; Tenhagem et al., 2004).

3.6.2 - Principais análogos do GnRH e suas potências biológicas.

Como citado anteriormente, os análogos sintéticos do GnRH têm sido amplamente utilizados como ferramenta na reprodução de bovinos. Independente da aplicação, estes produtos atuam estimulando a liberação de gonadotrofinas pela hipófise anterior, principalmente o LH (Chenault, 1990; Chenault et al., 1990). Os efeitos biológicos esperados, portanto, dizem respeito às ações do LH. Desta forma, na maioria dos protocolos em que se emprega o GnRH seu efeito é indireto. A resposta ao tratamento está sujeita, além da capacidade de induzir a liberação do LH, aos efeitos destas gonadotrofinas nos órgãos-alvo (Xu et al., 1995; Bao et al., 1997; Kastelic & Mapletoft, 1998; Roche et al., 1999), pois a magnitude da resposta em liberar o LH é dependente do estágio da onda folicular ovariana (Roche et al., 1999).

Os análogos ao GnRH apresentam diferenças no que diz respeito às suas potências biológicas. Chenault et al. (1990) comentaram que a buserelina foi estimada como sendo 40 a 200 vezes mais potente que a gonadorelina. Estes autores demonstraram que 10 µg de buserelina liberam, significativamente, mais LH e FSH que 500µg de gonadorelina.

Um outro análogo ao GnRH, o Acetato de Fertirelina, apresenta potência biológica cerca de 2,5 a 10 vezes maior do que o GnRH natural (Elmore et al., 1975). Geralmente, é indicado em doses terapêuticas superiores aos outros fármacos por possuir, em relação à buserelina, por exemplo, potência biológica inferior (Chenault, 1990; Chenault et al., 1990). Porém são poucos os relatos da eficiência deste análogo para a sincronização da ovulação em diferentes doses e mais pesquisas fazem-se necessárias.

3.7- Redução das doses de análogos do GnRH no protocolo “Ovsynch”.

A respeito das doses dos principais análogos do GnRH, para busserelina, as doses mais utilizadas são de 8µg (Burke et al., 1996) ou 10µg (Twaguramungu et al., 1992) na espécie bovina; e 10µg na espécie bufalina (Paul & Prakash, 2005). Tais pesquisas demonstraram que estas doses foram eficientes em promover a sincronização da emergência da onda folicular e/ou ovulação, já que apresentaram taxas de prenhez desejáveis em todos os tratamentos realizados com as referidas doses deste análogo.

Para gonadorelina, Mihm et al. (1998) relataram que a dose de 250µg pode sincronizar uma nova onda na presença de folículos dominantes, porém 100µg ou 25µg são menos efetivos. Estas variações de dose-resposta têm sido comentadas por Diskin et al. (2002), como um potencial limite da utilização do GnRH para a sincronização dos padrões de desenvolvimento folicular, principalmente durante o diestro.

Pursley et al. (1997a) e Vasconcelos et al. (1999) utilizaram 100µg de gonadorelina e estes últimos autores, observaram que esta dose foi efetiva em induzir a ovulação em 87% de vacas holandesas, após a PGF2α, no protocolo “Ovsynch”. Entretanto, Cartmill et al. (2001a) encontraram incidência mais baixa de sincronização (68%) quando 100µg foram administradas em vacas cíclicas.

Fricke et al. (1998) objetivaram reduzir a dose de gonadorelina (100µg para 50µg) utilizada para a sincronização da ovulação, com a hipótese que 50µg deste análogo não comprometeria a eficácia do protocolo “Ovsynch”, o que levaria às reduções substanciais dos custos relacionados a este tratamento. Estes autores não encontraram diferenças entre os grupos na taxa de sincronização (84,9% versus 83,1%, respectivamente para as doses de 100 e 50µg), nas taxas de dupla ovulação (13,9% versus 14,3%); nas taxas de concepção (33,6% versus 35,1%) e nas taxas de perdas embrionárias (13,6% versus 13,3%). Portanto, o decréscimo da dose da gonadorelina utilizada não comprometeu a eficácia do protocolo. Adicionalmente, os autores explicam que a dose de 100µg do análogo ao GnRH baseou-se nas recomendações do laboratório fabricante (Cystorelina-Merial®) para tratamentos de cistos foliculares. No entanto, uma dose de 50µg de GnRH induziu uma resposta de liberação de LH similar a 100µg e, ambas as doses, foram igualmente eficazes

quando utilizadas para o tratamento de cistos em vacas de leite (Seguin et al., 1976). Isso indica que, a dose 50% reduzida da recomendada de gonadorelina pode, efetivamente, causar a ovulação de folículos não císticos, tanto quanto doses de 100µg, durante o protocolo “Ovsynch”.

Yamada et al. (2002) também objetivaram averiguar os efeitos de doses 50% reduzidas do análogo Acetato de Fertirelina (de 100µg para 50µg) em 17 animais cíclicos e não observaram diferenças, entre as referidas doses, nas taxas de sincronização das ondas de crescimento folicular e ovulação, bem como nas funções do CL e concentrações circulantes de progesterona no momento da segunda aplicação do GnRH. Desta maneira, concluíram que 50µg deste análogo reduz o custo do protocolo, sem efeito prejudicial na eficiência do tratamento.

Entretanto, alguns autores descreveram que, baixas doses de análogos do GnRH, podem levar os animais que ovularam ao retorno do estro cerca de 18 dias após IA (com um pronunciado pico entre 14-17 dias). Isso aconteceu no experimento de Cordoba & Fricke (2002) onde, dentre os 27,3% dos animais inseminados após protocolo com 50µg de gonadorelina, cerca de 46,4% foram detectados em estro e re-inseminados nos 22 dias seguintes à primeira IA. Destas 46,4% das vacas re-inseminadas, 51% delas estavam entre os dias 18 após IA, com um pico de 28,6% dos animais entre 14 e 17 dias. Estes “ciclos curtos” ocorreram tanto em vacas cíclicas como em animais em anestro. Shephard (2002) utilizou 100µg de gonadorelina e também relatou que 31,8% das vacas tratadas foram re-inseminadas dentro de 17 dias.

Estes resultados sugeriram que doses inferiores como 100 ou 50µg de gonadorelina podem provocar a ovulação, porém a formação de um CL pouco funcional, o que acarreta nas altas taxas de retorno ao estro pós-IA. Isto indica que a formação de um CL “anormal” pode estar associado às duas injeções com baixas doses do análogo de GnRH apresentando limitada efetividade na atresia folicular, ovulação e conseqüente formação do CL (Cordoba & Fricke, 2002).

3.8 - Taxas de concepção e prenhez com a utilização do protocolo “Ovsynch”.

As taxas de concepção variam muito na literatura e numerosos fatores de impacto têm sido reportados tais como: condição corporal (Moreira et al., 2000b), estação do ano (De la Sota et al., 1998), estresse térmico (Cartmill et al., 2001b) e estágio do ciclo estral que foi iniciado o protocolo (Vasconcelos et al., 1999) dentre outros fatores.

Para bovinos, há variações substanciais no que tange às taxas de concepção com o protocolo “Ovsynch”. Em gado de corte, estas taxas excedem os 60% (Roy & Twagiramungu, 1996), ao contrário do gado de leite, com variações de 40 a 50 % (Pursley et al., 1995; Stevenson et al., 1996). Porém, percentuais mais inferiores a estes citados também são reportados. Devido a uma gama de efeitos que podem estar presentes nos experimentos descritos na literatura, torna-se difícil comparar resultados de trabalhos distintos.

Burke et al. (1996), comparando a efetividade da IATF com a IA convencional após observação de estro, em vacas de leite, relataram taxas de concepção de 29% e 30,5%, respectivamente. Jobst et al. (2000) trabalharam com animais acima dos 60 dias pós-parto e também encontraram taxas de prenhez de 30,1% para o grupo de animais submetidos à IATF e que estes valores são inferiores ($P < 0,05$) das taxas de prenhez de 43,7% para animais sincronizados com duas aplicações de $PGF2\alpha$ intercaladas em 14 dias (14- $PGF2\alpha$); de 45,6% nos animais no grupo controle e de 44% nos que receberam IA após detecção de estro com a sincronização através do GnRH e $PGF2\alpha$ 7 dias após. Entretanto, Le Blanc et al. (1998) reportaram que não houve diferença nas taxas de prenhez para vacas sincronizadas com 14- $PGF2\alpha$ ou “Ovsynch” com 38,1% e 37,3%, respectivamente.

Já para Moncilovic et al. (1998), vacas no pós-parto (43-57 dias) apresentaram taxas de prenhez de 33% para o grupo de IATF (“Ovsynch”) comparados aos 6% quando animais foram inseminados após estro espontâneo. Estes pesquisadores comentaram que esta taxa de prenhez (33%) foi superior quando comparados aos animais que receberam $PGF2\alpha$ para a sincronização do estro ou então para animais que não foram sincronizados. Reportaram ainda que as taxas de gestação nestes últimos dois grupos variaram em relação à época do ano, porém, para o grupo da IATF, não houve diferenças nas taxas de gestação nos

diferentes meses. Estes resultados são similares a outros estudos (Pursley et al., 1995; Burke et al., 1996; Schimitt et al., 1996; Britt & Gaska, 1998).

Yamada et al. (2002) utilizaram o análogo Acetato de Fertirelina nas doses de 100µg ou 50µg no protocolo “Ovsynch”, em vacas de leite em anestro, e observaram taxas de concepção de 59,5% e 61,1%, respectivamente aos 35 dias de gestação. Dados inferiores foram relatados por Pursley et al. (1998) que trabalharam com animais acima dos 50 dias pós-parto e encontraram taxas de prenhez de 39%. Concordando com estes dados, Fricke et al. (1998) reportaram taxas de concepção de 41,0% aos 28 dias e 34,4% aos 56 dias de gestação.

Stevenson et al. (1999) também encontraram taxas de prenhez similares aos resultados dos estudos acima, em torno de 35,6% aos 52 dias após IA. Neste último experimento, vacas com melhores escores corporais apresentaram 8-10% a mais de taxas de concepção para cada unidade de condição corporal. Concordando com tais afirmações, Moreira et al. (2000b) reportaram que a taxa de prenhez ao primeiro serviço é inferior quando vacas estão com escore corporal abaixo de 2,5 (escala de 1-5). Desta maneira, animais no pós-parto devem ser manejados visando minimizar o estresse e maximizar a saúde animal, o conforto e o “status” nutricional que irá refletir na lactação e maior incidência de vacas cíclicas, melhorando a performance reprodutiva.

Tenhagen et al. (2004) trabalharam com animais acima dos 42 dias pós-parto e encontraram taxas de concepção de 37,9% em vacas primíparas e de 31,6% em vacas múltíparas ($P=0,01$) aos 42-48 dias após IATF (“Ovsynch”). O efeito da ordem de parto nas taxas de concepção, com o uso do protocolo “Ovsynch”, tem gerado resultados controversos (Stevenson et al., 1996; Jobst et al., 2000; Cartmill et al., 2001a; Tenhagen et al., 2001; Peters & Pursley, 2002). Os dados relatados por Tenhagen et al. (2004) e por outros pesquisadores (Stevenson et al., 1996; Cartmill et al., 2001a; Tenhagen et al., 2001; Peters & Pursley, 2002) entram em contradição com a observação de que vacas primíparas apresentam mais problemas reprodutivos e retardam o início da ciclicidade ovariana pós-parto (Lucy et al., 1992 a,b) e que estes animais proporcionam baixas taxas de concepção ao primeiro serviço, além de serem mais sujeitas às desordens metabólicas que as vacas múltíparas (Erb & Grohn, 1988).

Moreira et al. (2000a) comentaram que em protocolos “Ovsynch” iniciados em estádios randômicos do ciclo estral, as taxas de prenhez esperadas seriam de

36% e que o aumento destas taxas, neste protocolo, estaria relacionado à frequência de vacas que iniciam o tratamento em estádios favoráveis do ciclo estral (isto é, entre os dias 5 a 10 do ciclo). Concordando com estas afirmações, Vasconcelos et al. (1999) encontraram taxas de concepção aos 28 dias que variaram de 32 a 42% e aos 98 dias com variação de 25 a 36%, dependendo do dia do ciclo estral em que foi iniciado o tratamento.

MacMillan et al. (2003) revisaram autores que estudaram algumas limitações relacionadas às taxas de concepção após tratamentos de sincronização, principalmente em rebanhos leiteiros de alto mérito genético. Estes animais podem apresentar baixa fertilidade inerente (Lucy, 2001) associada ao déficit de energia (Butler, 2002), e atividades ovarianas anormais durante a lactação inicial.

Como citado anteriormente, as causas potenciais para as baixas taxas de concepção são multifatoriais. No entanto, pesquisas (Pursley et al., 1995; Burke et al., 1996; Schmitt et al., 1996) têm demonstrado que protocolos utilizando PGF2 α e/ou GnRH são capazes de sincronizar estro/ovulação, e podem potencialmente melhorar as taxas de prenhez em vacas de leite.

Um dos questionamentos sobre as baixas taxas de concepção em rebanhos leiteiros é a sua relação com a produção de leite. Além disso, a produção de leite está correlacionada com a redução nas concentrações de progesterona no dia 16 após o “Ovsynch”, onde uma libra de aumento de produção de leite corresponde a 0,028 ng/mL de decréscimo da concentração de progesterona sérica. A razão para a redução da concentração de progesterona pode ser devido ao aumento do metabolismo deste esteróide (revisado por Vasconcelos et al., 1999). Vacas com alta produção de leite apresentam maiores consumos de matéria seca ($r=0,88$; Harrison et al., 1990) e um experimento realizado em ovelhas (Parr et al., 1987) demonstrou uma relação inversa entre nutrição e concentrações circulantes de progesterona. Estas diminuições de concentrações deste hormônio, em animais de alta produção, são sugeridas como sendo devidas às elevadas taxas do fluxo sanguíneo no fígado dos animais com alto consumo de matéria seca, combinadas com a alta taxa de “clearance” para progesterona neste órgão (Parr et al., 1993 a, b).

Outro questionamento é em relação ao tamanho dos folículos pré-ovulatórios. O aumento da produção de leite também está relacionado ao aumento do tamanho do folículo. A razão para o aumento do tamanho folicular com o aumento da produção de leite não está clara, mas parece estar relacionada com o

aumento das freqüências de pulsos de LH (Roberson et al., 1989; Bergfelt et al., 1991; Adams et al., 1992; Stock & Fortune, 1993).

Thatcher et al. (2001a) sugeriram que os estresses fisiológicos e ambientais para a alta produção de leite, uma inadequada ingestão de alimentos, as baixas condições corporais e os sistemas de manejo intensivos são aspectos que impedem a boa eficiência reprodutiva, tanto para gado de corte ou leite (por exemplo, retorno da ciclicidade ovariana, intensidade do comportamento de estro e taxas de prenhez).

Outra observação a ressaltar é que o sucesso do programa “Ovsynch” é dependente do fato dos animais em lactação estarem ciclando ou não (presença ou ausência de atividade ovariana pós-parto). Quando há maior incidência de vacas em anestro, a taxa de prenhez do grupo poderá ser menos efetiva, porém, tal protocolo poderá induzir algumas vacas a retornarem à ciclicidade e, talvez, levar à concepção (Benmrad & Stevenson, 1986; Thatcher et al., 2001a).

3.9 - Principais problemas encontrados em animais submetidos à sincronização da ovulação.

3.9.1 - Diâmetros dos folículos ovulatórios e taxas de concepção.

Mesmo que algum folículo dominante submetido à segunda injeção de GnRH não tiver alcançado seu diâmetro máximo neste momento, ele irá ser ovulado prematuramente (Lane et al., 2001a; Vasconcelos et al., 2001). Assim, a ovulação de um pequeno folículo dominante pode resultar na formação de um menor corpo lúteo (CL) e conseqüente baixas concentrações de progesterona (Burke et al., 2001; Vasconcelos et al., 2001), o que pode resultar em ciclos estrais mais curtos (Cordoba & Fricke, 2002; Shepard, 2002).

Segwagwe (2002) descreveu, em seu experimento, que ovulações hormonalmente sincronizadas envolvem folículos menores que os fisiológicos (naturais) e retardam a detecção de uma nova massa luteal a ser formada. A média do diâmetro destes CLs no dia 10 após a ovulação ou IA, apresentou-se sensivelmente menor, e as concentrações de progesterona (P4) e o aumento diário destas concentrações foram também mais baixas. O autor justifica a importância do aumento gradativo da P4 após a ovulação como um fator de valor para o aumento

das taxas de concepção (como também mencionado por Mann & Lamming (2001)), e que doses de gonadorelina menores que 250µg podem estar associadas com estas diferenças na função luteal.

As observações das relações entre o diâmetro do folículo ovulatório de animais sincronizados e suas referidas taxas de concepção têm sido estudadas. MacMillan et al. (2003), em sua revisão, referenciaram pesquisadores demonstrando que o uso do GnRH, em protocolos “Ovsynch” (em gado de corte), levou à ovulação de folículos dominantes com diâmetros inferiores do que aqueles oriundos de ovulações espontâneas (10,7mm versus 12,0mm, respectivamente; $P < 0,01$), o que resultou na formação de menores CLs (3,0 versus 3,6cm²; $P < 0,05$) e baixas concentrações de P4. Em um segundo experimento, um análogo do GnRH (100µg) foi injetado quando o folículo dominante dos animais apresentava 11 ou 13mm de diâmetro. No dia 30 após ovulação, a taxa de concepção para folículos de 11 mm foi de 4,4% enquanto que para os folículos de 13 mm foi de 57,4% ($P < 0,01$). Desta maneira, o tamanho do folículo dominante no momento da injeção da segunda dose de GnRH, e subsequente formação do CL, pode estar relacionado ao estágio do ciclo quando o tratamento de sincronização foi iniciado e, conseqüentemente, contribuir para as grandes variações nas taxas de concepção encontradas na literatura (Vasconcelos et al., 1999; Cartmill et al., 2001a; Thatcher et al., 2001a, 2002).

3.9.2 - O “status” folicular ovariano (dia do ciclo estral) no início do protocolo pode afetar a não-sincronização ou redução de fertilidade.

Uma intrigante observação foi relatada por Vasconcelos et al. (1999), sobre o aparente efeito do dia do ciclo estral (no início do protocolo “Ovsynch”) sobre o tamanho do folículo ovulatório no final do protocolo e na subsequente taxa de prenhez. Folículos ovulatórios estavam maiores (no momento do segundo GnRH) em vacas que iniciaram o protocolo no começo (dias 1-4) ou no final do ciclo estral (17-21), ao contrário para vacas tratadas no meio do ciclo (dias 5-13). Esta diferença pode ser devida aos efeitos das elevadas concentrações de progesterona sobre a secreção de LH e no crescimento folicular (Roberson et al., 1989; Bergelft et al., 1991; Adams et al., 1992). Interessantemente, os grupos com maiores diâmetros

foliculares apresentaram menores taxas de prenhez aos 28 e 98 dias pós-IA comparados com os grupos que apresentavam folículos com menores diâmetros. Este resultado foi consistente com outros estudos, os quais demonstraram que baixas concentrações de progesterona antes da IA (durante o tratamento de sincronização) estão associadas com baixa fertilidade (Fonseca et al., 1983). Isto é, uma marcante baixa fertilidade é encontrada em vacas que ovularam um grande e persistente folículo, produzido durante os tratamentos, que provém de baixas concentrações de progesterona antes da ovulação (Savio et al., 1993; Wehrman et al., 1993). A fertilidade reduzida destes folículos persistentes foi atribuída a uma prematura ativação oocitária (Revah & Butler, 1996).

O início do protocolo “Ovsynch” em certos estádios do ciclo estral também está associado com a não-sincronização ou redução da fertilidade. Por exemplo, a injeção da primeira dose de GnRH entre os dias 11 a 14 (Thatcher et al., 1998) ou 15 (Moreira et al., 2000a) do ciclo estral pode não resultar em ovulação e formação de um novo CL. Estes últimos autores afirmaram que, neste estágio do ciclo, animais com perfil de duas ondas de crescimento folicular, poderiam apresentar folículos dominantes ainda não responsivos à primeira aplicação de GnRH. Conseqüentemente, um novo CL não será desenvolvido. Nos próximos dias, o animal secretará espontaneamente $PGF2\alpha$ uterina, causando a regressão do antigo CL. Portanto, no momento da aplicação da $PGF2\alpha$ exógena, sete dias após o GnRH, o animal já estará com o CL regredido e poderá entrar em estro e ovular antes da segunda dose do GnRH (Moreira et al., 2000a). Assim, este animal irá ovular prematuramente e não irá conceber no momento da IATF. Burke et al. (1996) descreveram que, dos 171 animais submetidos ao protocolo “Ovsynch” sem controle prévio do dia do ciclo estral (ou presença de CL ou folículo acima de 10 mm de diâmetro), dezessete vacas (10%) apresentaram sinais de estro entre a aplicação de $PGF2\alpha$ e a segunda dose de GnRH, isto é, ovularam antes do final do tratamento. Corroborando com estas afirmações, Vasconcelos et al. (1999) encontraram 6% dos animais ovulando antes do final do protocolo, e todos os animais nesta situação iniciaram o tratamento entre os dias 13 a 22 do ciclo estral e não ovularam ao primeiro GnRH.

No protocolo “Ovsynch”, uma pequena porcentagem dos animais podem não ovular após o segundo tratamento com GnRH (Vasconcelos et al., 1999;

Yamada et al., 2002). Aparentemente, para estas condições, um folículo com capacidade ovulatória não estaria presente no momento da segunda administração. Isto sugere que a perda da dominância folicular ocorreu antes da segunda dose do GnRH e o folículo emergido da nova onda ainda não adquiriu capacidade ovulatória. Altas concentrações de progesterona podem reduzir os pulsos de LH, possivelmente levando à perda da função do folículo dominante (Ireland & Roche, 1982; Roberson et al., 1989; Savio et al., 1993). Consistente com esta ideia, as vacas que não ovularam após a segunda dose de GnRH, apresentavam altas concentrações de progesterona no momento da injeção de um análogo à $PGF2\alpha$, em alguns trabalhos (Vasconcelos et al., 1999; Yamada et al., 2002). Adicionalmente, a maioria destas vacas deveriam estar no início do ciclo estral no momento da primeira aplicação do análogo ao GnRH e, conseqüentemente, estariam com a progesterona elevada por todo o protocolo (Vasconcelos et al., 1999).

Um outro problema pode ocorrer quando os animais são submetidos ao protocolo "Ovsynch" no início do ciclo estral (dias 2-3). Nesta situação, o folículo dominante não apresenta sensibilidade à primeira aplicação do GnRH (Moreira et al., 2001) pois não oferece diâmetro folicular compatível para isso. Conseqüentemente, o folículo dominante continuará seu crescimento e expressando sua dominância por cinco dias ou mais até que a segunda injeção do GnRH seja aplicada. Estes folículos que apresentaram dominância acima dos cinco dias (Austin et al., 1999) ou vacas que iniciaram o programa "Ovsynch" no início do ciclo estral, serão menos férteis (Vasconcelos et al., 1999; Moreira et al., 2000a). Isto porque estes folículos "velhos" podem ou não ovular no final do tratamento e, se ovularem, os oócitos produzidos por eles apresentarão menor fertilidade (Vasconcelos et al., 1997b).

Sobre estas considerações, Vasconcelos et al. (1999) e Moreira et al. (2000a) indicaram que o aumento da proporção de animais na fase média do ciclo estral (diestro, dias 5 aos 12 do ciclo) no momento do primeiro GnRH pode levar a uma melhoria nas taxas de concepção.

3.9.3 - Perda embrionária precoce.

Estudos em fazendas de gado de leite que não trabalharam com sincronização, reportaram perda embrionária após os 30 dias de gestação de somente 7,2% (Silke et al., 2002) a 10,8% (Foran et al., 1996). Quando programas de “Ovsynch” são utilizados, estas taxas de perda embrionária alcançaram valores acima dos 20% (Thatcher et al., 2001a; Cartmill et al., 2001a). Fricke et al. (1998) relataram taxas de perdas embrionárias aos 56 dias de gestação de 13,5% e Smith & Stevenson (1995) de 20,5%. Dados semelhantes foram encontrados com Pursley et al. (1998), com perda de 20%.

Taponen et al. (2002) comentaram que o controle do desenvolvimento folicular, ocasionado pela injeção do GnRH, resulta na alteração da função luteal, menores taxas de concepção aos 30 dias e aumento da perda embrionária após este intervalo.

Como citado anteriormente, um dos possíveis motivos para a perda embrionária em animais submetidos à IATF é o tamanho do folículo dominante no momento da segunda aplicação do GnRH, após a efetiva sincronização da emergência da onda. Isto porque, folículos com menores diâmetros que ovularem após a segunda administração do GnRH, apresentarão CLs com menores áreas de tecido luteal e menores concentrações de progesterona (Burke et al., 2001; Vasconcelos et al., 2001), as quais podem resultar em perda embrionária, levando ao retorno do estro em períodos estrais mais curtos (Cordoba & Fricke, 2002; Shepard, 2002).

Entretanto, uma outra observação é a relação do “status” folicular ovariano (dia do ciclo estral) no início do protocolo com a taxa de concepção e a perda embrionária. Animais que não foram submetidos à sincronização da emergência da onda folicular após a primeira aplicação do GnRH (Moreira et al., 2001), podem apresentar folículos grandes e com estabelecimento de dominância por mais de cinco dias quando o segundo GnRH é administrado, o que acarreta em oócitos menos férteis (Austin et al., 1999), afetando a taxa de concepção e, conseqüentemente, aumentando as perdas embrionárias (Vasconcelos et al., 1997a,b). Estas afirmações são condizentes aos dados encontrados por Vasconcelos et al. (1999), onde houve perdas gestacionais (exame aos 98 dias pós-IA) de 24% para os animais que apresentaram folículos de maiores diâmetros (em

relação a média) no momento da aplicação do segundo GnRH, e perdas embrionárias em torno dos 14% para animais com folículos pequenos.

De certa forma, os mecanismos responsáveis pelas perdas embrionárias em vacas em lactação não estão claramente conhecidos, mas podem incluir estresse lactacional associado com o aumento da produção de leite (Nebel & MacGilliard, 1993) ou, ainda, habilidade reduzida em responder ao aumento da temperatura ambiente (Stevenson et al., 1984), dentre outros fatores.

4- Material e método

O experimento foi conduzido em três propriedades rurais localizadas no Sul do Estado de Minas Gerais (cidade de Passos e região) entre os meses de julho a setembro de 2004. Realizaram-se 77 protocolos (em quatro grupos distintos) de sincronização de onda de crescimento folicular e indução de ovulação (protocolo “Ovsynch”).

Utilizou-se 77 fêmeas bovinas da raça Holandesa Preto e Branco (HPB) em lactação (Figura 1), a partir dos 60 dias após o parto (média de $139,25 \pm 14,01$ dias), com escore de condição corporal variando de 2,5 a 4,0 (escala de 1 a 5; segundo Ferreira & Torres, 1993), apresentando 500-550 kg de peso corporal e média de produção de 30 kg leite/ dia.

Os animais passaram por uma avaliação ginecológica prévia por palpação transretal, vaginoscopia e ultra-sonografia, onde foram descartados todos aqueles que apresentassem qualquer problema reprodutivo detectado em um destes métodos de diagnóstico.

Após este procedimento, distribuíram-se aleatoriamente as 77 fêmeas nos quatro tratamentos, considerando-se o escore corporal, as estruturas ovarianas presentes e o número de dias pós-parto.

O análogo do GnRH utilizado foi o Acetato de Fertirelina (Fertigen[®] - Schering Plough), em duas doses, tanto para sincronização prévia da onda de crescimento folicular, quanto para indução de ovulação após a luteólise com Cloprostenol Sódico (Ciosin[®] - Schering Plough). Em todos os grupos de tratamento o protocolo foi o mesmo, variando apenas nas doses de Fertirelina (Figura 2; Tabela 1). A eficiência de cada uma das doses, nas diferentes aplicações, foi avaliada pela alteração na população folicular e presença de corpo lúteo, assim como pelas concentrações de estradiol e progesterona séricos.



Figura 1: Animais utilizados durante o experimento. Vacas de raça Holandesa Preto e Branco em lactação

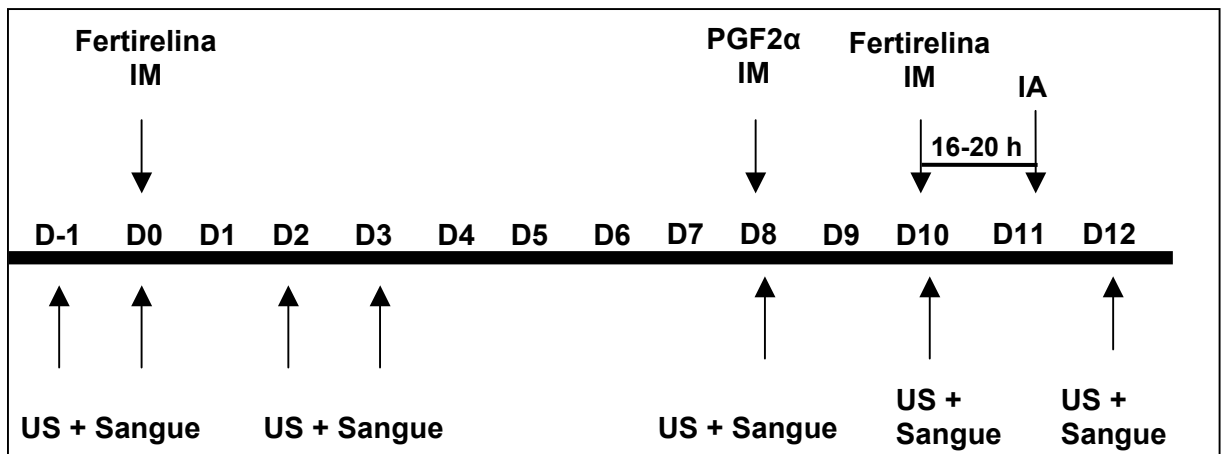


Figura 2: Protocolo “Ovsynch” utilizado para sincronização da emergência de onda folicular e ovulação em vacas HPB. (D): Dias após início dos protocolos, referentes às aplicações dos hormônios. (US): avaliações ultra-sonográficas. Colheitas de sangue (sangue) e Inseminação Artificial (IA). Modificado de Pursley et al. (1995)

Tabela 1: Esquema de tratamento nas vacas Holandesas Preto e Branco, em lactação, submetidas ao protocolo “Ovsynch”, de acordo com os grupos de tratamento

| Grupos | Número de animais | 1ª Aplicação de | | 2ª Aplicação de |
|--------------|-------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | Fertirelina DIA 0 | Cloprostenol DIA 8 | Fertirelina DIA 10 |
| 1 | 21 | 100µg | 530µg | 100µg |
| 2 | 21 | 100µg | 530µg | 50µg |
| 3 | 19 | 50µg | 530µg | 100µg |
| 4 | 16 | 50µg | 530µg | 50µg |
| Total | 77 | | | |

4.1 - Avaliações ultra-sonográficas

As avaliações ultra-sonográficas deram suporte para determinar, com exatidão, as modificações ovarianas decorrentes de cada aplicação hormonal, nos diferentes grupos de tratamento. Estes exames foram realizados com um equipamento de ultra-sonografia em tempo real Marca PIE-MEDICAL, modelo 100-LC, que opera com probe linear bifrequencial, 6 e 8 MHz, com as imagens gravadas em fitas VHS e em discos de computador (recurso do aparelho).

Realizou-se uma avaliação ultra-sonográfica prévia ao início de cada tratamento (Figura 2), para determinar as estruturas ovarianas presentes e, de acordo com este achado, distribuir os animais nos grupos. Conforme esta avaliação os animais foram divididos em duas classes: Classe I: Com presença de população folicular e de corpo lúteo característico e Classe II: Sem corpo lúteo, porém com pelo menos um folículo com diâmetro ≥ 10 mm (Figura 3).

Nas avaliações ultra-sonográficas foram contabilizados e mensurados todos os folículos dentro da sensibilidade do equipamento (2 mm), assim como os corpos lúteos. A distribuição das avaliações está mostrada na Figura 2. Sempre realizaram-se as avaliações antes e após cada procedimento (aplicação hormonal), no sentido de determinar de forma dinâmica as alterações decorrentes. As

avaliações ultra-sonográficas e as colheitas de sangue foram realizadas nos dias -1; 0; 2; 8; 10 e 12 do início dos tratamentos.

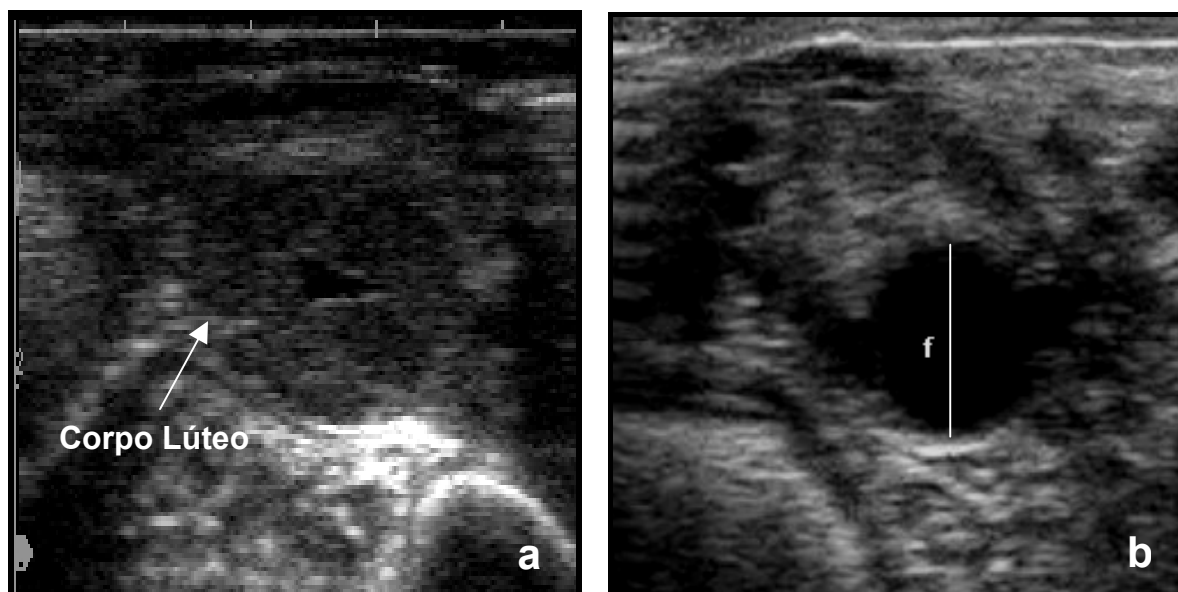


Figura 3: Imagens ultra-sonográficas dos ovários de vacas HPB em lactação utilizadas no experimento a) corpo lúteo; b) folículo (f) com diâmetro ≥ 10 mm

4.2 - Esquema de colheita de sangue

Para as colheitas de sangue utilizou-se tubos vacuolizados e, o sangue obtido pela punção da artéria ou veia coccígea com uma agulha de colheita múltipla 25x8, e as amostras, posteriormente, centrifugadas a 1000 G por cinco minutos, sendo o soro separado e estocado a -20°C em frascos eppendorf até a dosagem hormonal. As amostras de sangue foram obtidas nos mesmos dias onde realizaram-se os exames ultra-sonográficos dos ovários.

4.3 - Avaliação do escore de condição corporal

Antes da aplicação dos hormônios os animais foram avaliados quanto ao escore de condição corporal numa escala de 1 a 5 (segundo Ferreira & Torres, 1993). Somente utilizou-se animais com escore entre 2,5 e 4,0. Isto visou diminuir a fonte de variação referente à população folicular dos animais (Moreira et al., 2000b).

Entre os grupos de tratamento, a média de escore corporal dos animais foi semelhante ($P > 0,05$; Tabela 2), o que foi constantemente monitorado, antes da inserção de cada animal em um dos grupos de tratamento, de acordo com aqueles já destinados a cada grupo.

4.4 - Dosagem de Progesterona e Estradiol

As dosagens hormonais foram executadas por radioimunoensaio com kits comerciais, fase sólida (DPC Medlab®) conforme metodologias descritas pelo fabricante e modificadas por Fernandes (2000), para dosagem do estradiol. Tais análises foram realizadas no Departamento de Radiologia e Reprodução Animal da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Unesp -campus de Botucatu, utilizando o equipamento de Radioimunoensaio Cobra II Autogamma da Pachard BioScience Company. Os coeficientes de variação intra ensaio encontrados foram de 7,9% para Progesterona e 15% para Estradiol.

4.5 - Inseminação artificial

Todos os animais foram inseminados uma única vez, entre 16-20 horas após a última administração da dose de Acetato de Fertirelina (dia 10 após início dos tratamentos), sem observação dos sinais comportamentais de estro.

4.6 - Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado aos 50-60 dias após Inseminação Artificial, via palpação transretal.

5 - Análises estatísticas

Nas análises estatísticas, as taxas de indução de uma nova onda de desenvolvimento folicular após a primeira aplicação de Fertirelina, as taxas de indução de ovulação após a segunda aplicação e as taxas de gestação foram comparadas pelo teste χ^2 (Sampaio, 2002). As taxas de gestação foram representadas como o número de animais diagnosticados positivos aos 50-60 dias pós-IA, em relação aos animais inseminados. Para comparar os efeitos dos tratamentos nos diferentes dias de análise, sobre as concentrações séricas médias de progesterona, estradiol e diâmetros foliculares nos diferentes dias do exame, bem como o escore corporal e dias pós-parto no início dos tratamentos, utilizou-se análise de variância (ANOVA) e, se houvesse algum efeito significativo, os dados foram submetidos ao teste de médias (Teste de Duncan; Zar, 1984). Caso os dados não tenham apresentado homocedasticidade ou normalidade, estes foram submetidos à análise não paramétrica de Kruskal-Wallis. Para as análises, utilizou-se o programa SAEG (Ribeiro Junior, 2001). Para todas as variáveis estudadas, considerou-se nível de significância a 5% de probabilidade.

6 - Resultados e discussão

6.1 - Taxas de sincronização da emergência de onda folicular e ovulação.

Os produtos utilizados são seguros quanto a sua administração nas concentrações e vias indicadas. Não foram observados quaisquer sinais ou alterações locais e/ou sistêmicas, como edemas, nódulos, abscessos, inflamações, reações alérgicas, sialorréia etc.

O escore de condição corporal médio dos animais não diferiu ($P>0,05$) entre os grupos tratamento (Tabela 2, Figura 4). É importante trabalhar com grupos homogêneos quanto a esta variável, pois aspectos nutricionais e quantidade de reserva de tecido adiposo podem estar relacionados com variações no padrão de desenvolvimento folicular (Butler, 2000).

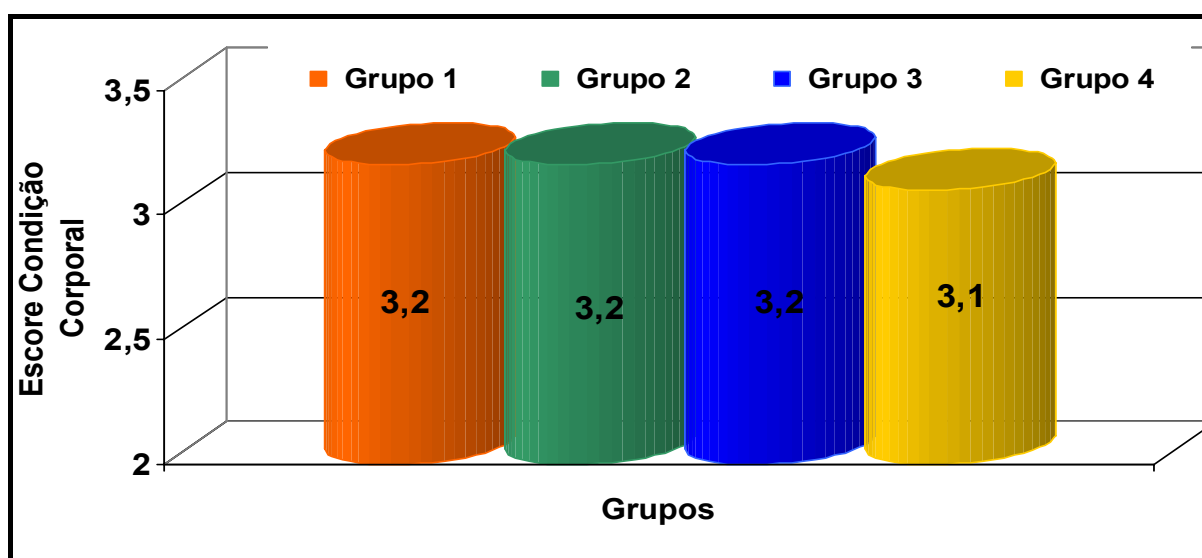


Figura 4: Escore corporal médio das vacas HPB utilizadas no experimento, submetidas ao protocolo “Ovsynch”, de acordo com os grupos

Observou-se, nos tratamentos em conjunto, uma taxa média de sincronização de onda de crescimento folicular, após a primeira aplicação de Acetato de Fertirelina, de 70,0% (Tabela 2), evidenciando que alguns animais podiam, fisiologicamente, estar num estágio de desenvolvimento folicular onde não exista um folículo dominante em condições de ser anulado e, como conseqüência, induzir a emergência de uma nova onda folicular (Ginther, 2000, Sartori et al., 2001, Yamada

et al., 2002). Adams (1994) e Yamada et al. (2002) relataram taxas de sincronização de ondas de desenvolvimento folicular semelhantes em vacas leiteiras, sem seleção prévia do período do ciclo estral, exatamente como realizado no presente trabalho.

Tabela 2: Taxas de sincronização da emergência da onda folicular após primeira administração de Fertirelina (D0) e taxas de ovulação após a segunda aplicação (Dia 10) de acordo com grupos de tratamento, em vacas HPB submetidas ao protocolo “Ovsynch”

| Grupo | N | 1ª dose de Fertirelina | Cloprostenol Sódico | 2ª dose de Fertirelina | Média ± EP | | Taxa de Sincronização N (%)** | Taxa de ovulação final N (%)** |
|--------------|-----------|------------------------|---------------------|------------------------|------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | | | | | Score Corporal * | de Sincronização | | |
| 1 | 21 | 100µg | 530µg | 100µg | 3,2±0,41 | 7/13 (53,8%) | 14/21 (66,6%) | |
| 2 | 21 | 100µg | 530µg | 50µg | 3,2±0,41 | 10/13 (76,9%) | 11/21 (52,3%) | |
| 3 | 19 | 50µg | 530µg | 100µg | 3,2±0,40 | 09/12 (75,0%) | 12/19 (63,2%) | |
| 4 | 16 | 50µg | 530µg | 50µg | 3,1±0,34 | 9/12 (75,0%) | 14/16 (87,5%) | |
| Total | 77 | | | | 3,16±0,39 | 35/50 (70,0%) | 51/77 (66,2%) | |

* EP: erro padrão; valores na mesma coluna não diferem entre os tratamentos pelo ANOVA (P>0,05).

** valores na mesma coluna não diferem entre os tratamentos pelo teste Qui-quadrado (P>0,05).

Contabilizou-se, para a taxa de sincronização da emergência de onda folicular, apenas 50 animais, pois houve problemas com os equipamentos de gravação das imagens ultra-sonográficas.

Não houve diferença ($P>0,05$) ao analisarem-se, em conjunto, os grupos que receberam inicialmente doses iguais de Fertirelina, ou seja, grupos 1 e 2 e grupos 3 e 4. Desta maneira, também não são notadas quaisquer diferenças na eficiência deste análogo do GnRH, nas doses de 50 ou 100 μ g ($P>0,05$) para sincronização da onda de desenvolvimento folicular (75,00% e 65,4%, respectivamente; Figura 5). Esta situação comprova que, a dose reduzida de 50 μ g de Fertirelina, mostrou-se tão eficiente quanto 100 μ g, para utilização em protocolos que necessitem de sincronização da onda de emergência folicular. Os valores alcançados para esta dose reduzida (50 μ g), foram semelhantes ao encontrado por Bartolome et al. (2002) que utilizaram um outro análogo ao GnRH e considerado de grande eficiência. Isto representa uma possibilidade real de redução nos custos dos protocolos que necessitam de tal mecanismo, sem qualquer diminuição do efeito.

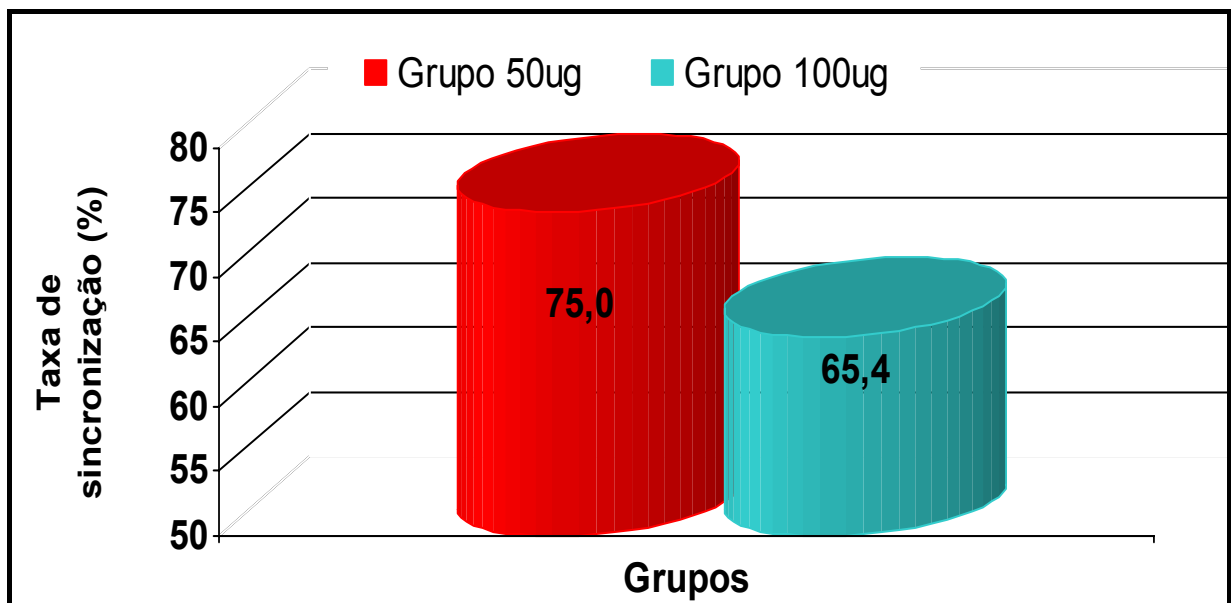


Figura 5: Eficiência média de diferentes doses de Fertirelina (μ g) para sincronização de onda de desenvolvimento folicular, em vacas leiteiras submetidas ao protocolo “Ovsynch”

Para a avaliação das taxas de sincronização de emergência de onda em função das classes (Tabela 3), isto é, presença ou ausência de concentrações de progesterona sérica e/ou folículos acima de 10 mm de diâmetro, ficou demonstrado que a taxa de sincronização foi similar entre os dois grupos ($P>0,05$), sugerindo ser a Fertirelina capaz de atuar nos folículos dominantes, mesmo na presença de altas concentrações de P4 (acima de 1 ng/mL, classe 1), no início dos tratamentos, igualmente ao sugerido por Pursley et al. (1995).

Tabela 3: Taxas de sincronização da emergência de onda folicular em vacas leiteiras, submetidas ao protocolo “Ovsynch”, de acordo com as classes. Classe 1: animais que apresentavam P4 >1,0 ng/mL no início dos tratamentos. Classe 2: animais com P4 <1,0 ng/mL no início dos tratamentos

| Classe | Número de Animais | Número de Animais sincronizados | Taxas de Sincronização (%)* |
|---------------|--------------------------|--|------------------------------------|
| 1 (P4>1ng/mL) | 27 | 19 | 70,37 |
| 2 (P4<1ng/mL) | 23 | 16 | 69,56 |
| TOTAL | 50 | 35 | 70,00 |

* valores na mesma coluna não diferem entre as classes pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$).

Nos animais que apresentaram P4>1,0 ng/mL no início do protocolo (Classe 1), a taxa de sincronização da emergência de onda foi de 70,37% (Tabela 3) revelando que nem todos os folículos dominantes estavam em condições sensíveis ao GnRH, ou ainda poderiam estar em fases de crescimento que não apresentariam sensibilidade (receptores para LH) para responder às referidas doses (Silcox et al., 1995; Sartori et al., 2001). Para os animais da classe 2, 69,56% dos animais responderam ao tratamento, supondo que, nestes animais, os folículos acima de 10 mm de diâmetro apresentaram capacidade ovulatória (Silcox et al., 1995; Sartori et al., 2001), ou ainda, poderiam ter sofrido atresia ou luteinização parcial (Thatcher et al., 1989; Twagiramungu et al., 1992; Yamada et al., 2002). Certa porcentagem das vacas (30%) não apresentou a emergência da onda induzida, isto por que, estes animais poderiam não apresentar a sensibilidade requerida para a sincronização, já

que folículos dominantes que estão em fase estática por mais de três dias perdem a capacidade ovulatória (Ali et al., 2001).

Adicionalmente, alguns animais poderiam estar no início ou no final do ciclo estral, isto é, dentre os dias 2-3 ou 17-21 (Ginther et al., 1989; Kastelic et al., 1990) e as taxas de sincronização encontradas podem ser devidas ao fato do animal ter duas ou três ondas de crescimento folicular (Ginther et al., 1996, Figueredo et al., 1997). Tais afirmações também foram descritas por Vasconcelos et al. (1999), que encontraram taxas similares de sincronização da onda de crescimento folicular de 77% nos animais compreendidos no início ou final do ciclo estral, e demonstraram que animais com três ondas apresentaram menores taxas de sincronização ao primeiro GnRH que animais com duas ondas (77% versus 100%, respectivamente).

As taxas de ovulação ao final do protocolo foram semelhantes nos quatro grupos de tratamento ($P>0,05$) com média geral de 66,2% (Tabela 2) e concordam com outras citadas na literatura (Adams, 1994; Butler, 2000; Yamada et al., 2002). Pôde-se observar que as doses de 100 µg ou 50µg, tanto para sincronização da onda como para ovulação, foram similares ($P>0,05$), demonstrando a eficiência da dose de 50µg, concordando com os achados de Yamada et al. (2002).

Entretanto, estes dados foram inferiores aos reportados por Vasconcelos et al. (1999) que trabalharam com “Ovsynch” em dias específicos do ciclo estral. Porém, neste presente experimento, onde distribuíram-se os animais em estádios aleatórios do ciclo, as taxas foram similares às reportadas por Cartmill et al. (2001a), os quais utilizaram como análogo ao GnRH a gonadorelina.

Fricke et al. (1998) também estudaram a redução da dose de um análogo do GnRH (gonadorelina) de 100µg para 50µg e encontraram a mesma eficiência na sincronização da ovulação, e discutiram sobre as reduções substanciais dos custos, já que 50µg de gonadorelina foi eficiente. No presente estudo, a Fertirelina foi administrada nestas mesmas condições, apresentando a mesma eficiência, sugerindo que a potência biológica seja semelhante entre a gonadorelina e a Fertirelina.

A taxa de ovulação média entre os grupos não foi estatisticamente diferente, e por isto analisou-se em conjunto os grupos que receberam doses diferentes de Fertirelina. Assim sendo, comparou-se a taxa de indução de ovulação entre os animais que receberam 100µg de Fertirelina (grupos 1 e 3) com aqueles

onde foi administrado apenas 50µg (grupos 2 e 4). Observando a Figura 6, verificou-se que não houve diferenças significativas entre as duas doses para indução de ovulação ($P>0,05$; Figura 6).

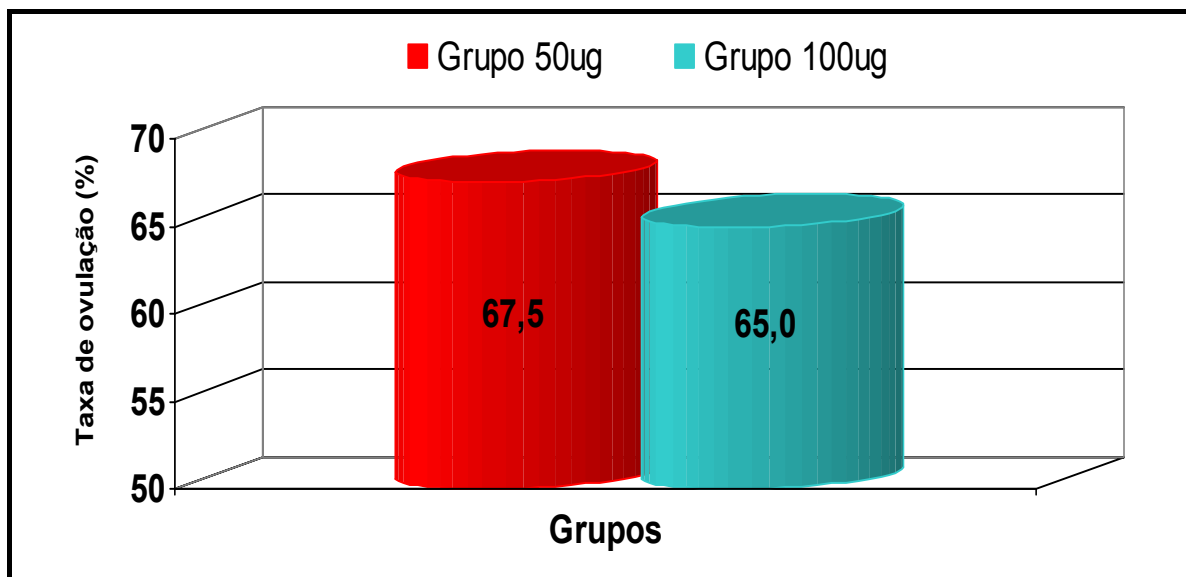


Figura 6: Eficiência média de diferentes doses de Acetato de Fertirelina (µg) para indução de ovulação em vacas leiteiras submetidas ao protocolo “Ovsynch”

Os valores contidos na Tabela 4 referem-se às porcentagens de animais que ovularam ao término do tratamento, dependentes do estágio ovariano no início do protocolo.

Tabela 4: Taxas de ovulação, após administração do análogo Acetato de Fertirelina, nos animais que apresentavam $P4 >1,0$ ng/mL (classe 1) ou $P4 <1,0$ ng/mL (classe 2) no início dos tratamentos

| Classes | Número de Animais | Número de Animais que ovularam | Taxas de Ovulação (%)* |
|--------------------|-------------------|--------------------------------|------------------------|
| 1 ($P4 >1$ ng/mL) | 36 | 25 | 69,44 |
| 2 ($P4 <1$ ng/mL) | 41 | 26 | 63,41 |
| TOTAL | 77 | 51 | 66,23 |

* Valores na mesma coluna não diferem pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$).

Dos 36 animais pertencentes à classe 1, 25 deles ovularam (69,44%) não apresentando diferenças em relação aos animais da classe 2 (63,41%). Isto demonstrou que a Fertirelina promoveu a ovulação, independente da fase em que o tratamento foi iniciado, como indicado por Vasconcelos et al. (1999) trabalhando com outro análogo ao GnRH. As taxas de ovulação encontradas no presente estudo foram compatíveis com os resultados de literatura (Cartmill et al., 2001a).

Em relação ao status folicular no início do tratamento e as taxas de ovulação ao final do protocolo, 66,23% dos animais apresentaram sucesso na sincronização. As possíveis causas para a não ovulação após a segunda aplicação de Fertirelina foram que, provavelmente, um folículo dominante com capacidade ovulatória não estava presente no momento da segunda aplicação. Isto pode ter ocorrido devido a este folículo já ter perdido a sua capacidade ovulatória e, o novo folículo emergido, não apresentou sensibilidade ao LH. Estes achados são bastante comuns em animais que apresentam P4 elevada por todo o tratamento, a qual reduz os pulsos de LH, levando à perda de função do folículo dominante (Ireland & Roche, 1982; Roberson et al., 1989; Savio et al., 1993).

A Tabela 5 refere-se ao número e porcentagem dos animais que apresentavam $P4 > 1\text{ng/mL}$ no momento da aplicação do Cloprostenol (dia 8), de acordo com os tratamentos. Das 77 vacas utilizadas, 50,65% estavam nestas condições e não diferiram em relação aos tratamentos ($P > 0,05$), revelando a efetividade das doses de Fertirelina na promoção da luteinização ou ovulação na primeira aplicação deste análogo, e que houve uma certa similaridade e sincronia nos eventos ovarianos em todos os tratamentos, a partir desta data (Yamada et al., 2002).

Tabela 5: Vacas leiteiras, submetidas ao protocolo “Ovsynch”, que apresentavam P4 > 1ng/mL no momento da aplicação de Cloprostenol (Dia 8 após o início dos protocolos), de acordo com os tratamentos

| Tratamentos (Grupos) | Número de Animais | Número de Animais com P4>1,0ng/mL Dia 8 | % de animais com P4>1,0ng/mL Dia 8* |
|---------------------------------|------------------------------|---|---|
| 1 | 21 | 10 | 47,62 |
| 2 | 21 | 10 | 47,62 |
| 3 | 19 | 9 | 47,37 |
| 4 | 16 | 10 | 62,50 |
| Total | 77 | 39 | 50,65 |

* valores na mesma coluna não diferem entre os tratamentos pelo teste Qui-quadrado (P>0,05).

A Tabela 5 refere-se ao número e porcentagem dos animais que apresentavam P4>1ng/mL no momento da aplicação do Cloprostenol (dia 8), de acordo com as classes, revelando que não houve diferença significativa (P>0,05). Adicionalmente, houve luteólise em 100% das vacas, demonstrando a efetividade do Cloprostenol (Cooper, 1981; Jackson et al., 1983; Tanabe & Hann, 1984) quando utilizado no protocolo “Ovsynch”.

Vasconcelos et al. (1999) demonstraram que vacas nos dias 10-21 do ciclo estral apresentaram baixas concentrações de P4 (abaixo de 1,0ng/mL) no dia da aplicação do Cloprostenol Sódico em relação aos animais no início do ciclo (P<0,05). Outra observação importante é que vacas no início do ciclo estral (1-9 dias) na primeira administração de GnRH apresentavam altas concentrações de progesterona no dia da segunda dose do que aquelas que estavam no final do ciclo. Portanto, animais que estavam em fase luteal tardia no início do protocolo, apresentaram baixas concentrações de progesterona no dia da aplicação do Cloprostenol (dia 8) e animais na fase folicular poderiam ou não apresentar baixas concentrações de progesterona neste dia, por conseqüência se houve ou não a sincronização da emergência folicular, já que existe uma variabilidade na quantidade de ondas foliculares (média de duas ou três ondas; Ginther et al.,1996) entre os

animais (Figueredo et al., 1997). Os dados da Tabela 6 também estão de acordo com estes achados.

Tabela 6: Vacas leiteiras, submetidas ao protocolo “Ovsynch”, que apresentaram P4 > 1ng/mL no momento da aplicação de prostaglandina (Dia 8 após o início dos tratamentos) e que sofreram luteólise após a administração, de acordo com as classes

| Classes | Número de Animais | Número de Animais com P4>1,0ng/mL Dia 8 | % de animais com P4>1,0ng/mL Dia 8* | Luteólise * (%) |
|----------------|--------------------------|---|---|-------------------------|
| 1 | 36 | 18 | 50,00 | (18/18) 100% |
| 2 | 41 | 21 | 51,22 | (21/21) 100% |
| TOTAL | 77 | 39 | 50,65 | (39/39) 100% |

*valores na mesma coluna não diferem entre as classes pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$).

6.1.2 - Ovulações antes do término dos tratamentos

Analisando a Tabela 7, pode-se notar os animais que ovularam antes do final do protocolo, isto é, entre os dias 8 e 10 após o início do mesmo. Não houve diferença entre os grupos ($P>0,05$). Os resultados contidos na Tabela 8 também indicaram a porcentagem dos animais que ovularam antes do final dos tratamentos, de acordo com as classes.

Não houve diferença estatística, porém apresentou-se numericamente, maior quantidade de animais da classe 1 que ovularam antecipadamente em relação à classe 2, com média geral de 6,5%. Estes dados foram inferiores aos relatados por Burke et al. (1996) que encontraram 10% e similares aos de Vasconcelos et al. (1999) com taxas de 6%. Outros autores também descreveram este evento (Moreira et al., 2000a; Yamada et al., 2002) e indicaram que animais em torno dos dias 11 a 15 do ciclo estral podem não resultar em ovulação e formação do CL após a primeira

injeção de GnRH. A maioria dos animais que se enquadram nesta situação foram aqueles que começaram a receber os tratamentos na fase de diestro. Isto porque, quando a sincronização é iniciada durante o aparecimento da onda folicular (emergência), esta não é sincronizada (Moreira et al., 2000a). Conseqüentemente, um folículo continua a crescer e torna-se dominante, o CL regride naturalmente e os valores de progesterona decrescem e, como resultado, a ovulação do folículo dominante ocorre espontaneamente antes da segunda aplicação (Yamada et al., 2002).

Já Vasconcelos et al. (1999) relataram que ovulações antes do término do tratamento ocorreram em animais que iniciaram o protocolo entre os dias 13 a 22 do ciclo. Estas observações sugeriram que animais no final do ciclo estral (dias 17-21) podem apresentar $P4 < 1,0$ ng/mL no início do tratamento e, mesmo assim, acarretar em ovulações precoces, dando suporte ao presente estudo onde um animal da classe 2 apresentou tal comportamento (Tabela 8). Assim este animal estaria no final do ciclo estral, não apresentando sensibilidade do folículo dominante na primeira aplicação de Fertirelina e continuando seu desenvolvimento, ovulou antes mesmo da segunda administração deste fármaco.

Tabela 7: Vacas leiteiras, submetidas ao protocolo “Ovsynch”, que ovularam antes do final do protocolo (entre os dias 8 e 10), de acordo com os tratamentos

| Tratamentos (Grupos) | Total de Animais | Animais com ovulação antecipada N | Ovulação antecipada/ total animais | Porcentagem (%) * |
|---------------------------------|-----------------------------|--|---|------------------------------|
| 1 | 21 | 1 | 1/21 | 4,76 |
| 2 | 21 | 3 | 3/21 | 14,28 |
| 3 | 19 | 1 | 1/19 | 5,26 |
| 4 | 16 | - | - | - |
| Total | 77 | 5 | 5/77 | 6,50 |

* Valores na mesma coluna não diferem entre os tratamentos pelo teste Qui-quadrado ($P > 0,05$).

Tabela 8: Vacas leiteiras, submetidas ao protocolo “Ovsynch”, que ovularam antes do término dos protocolos (entre os dias 8 e 10), de acordo com as classes. Classe 1 = P4 > 1,0 ng/mL no dia 0; classe 2 = P4 < 1,0 ng/mL no dia 0

| Classe | Total de Animais | Animais com | | Porcentagem (%) * |
|--------|------------------|--------------------------|---------------------------------------|-------------------|
| | | ovulação antecipada N | Ovulação antecipada/ total animais | |
| 1 | 36 | 4 | 4/36 | 11,11 |
| 2 | 41 | 1 | 1/41 | 2,44 |
| Total | 77 | 5 | 5/77 | 6,50 |

* valores na mesma coluna não diferem entre as classes pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$).

Os dados contidos nas tabelas 9 e 10 demonstram os resultados referentes às duplas ovulações encontradas durante o protocolo “Ovsynch”, nos diferentes tratamentos (Tabela 9) ou em relação às classes (Tabela 10).

Tabela 9: Vacas leiteiras, submetidas ao protocolo “Ovsynch”, que apresentaram duplas ovulações após a segunda administração do Acetato de Fertirelina, de acordo com os tratamentos

| Tratamentos (Grupos) | Número de Animais | Número de Animais com Dupla Ovulação | Dupla ovulação/ total de animais | Porcentagem (%) * |
|----------------------|-------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|
| 1 | 14 | 2 | 2/14 | 14,29 |
| 2 | 11 | - | - | - |
| 3 | 12 | 1 | 1/12 | 8,33 |
| 4 | 14 | 2 | 2/14 | 14,29 |
| TOTAL | 51 | 5 | 5/51 | 9,80 |

* valores na mesma coluna não diferem entre as classes pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$).

Tabela 10: Vacas leiteiras, submetidas ao protocolo “Ovsynch”, que apresentaram duplas ovulações após a segunda administração do Acetato de Fertirelina, de acordo com as classes

| Classes | Número de Animais que ovularam | Número de animais com Duplas Ovulações | Dupla ovulação/total de animais | Porcentagem (%) * |
|----------------|---------------------------------------|---|--|--------------------------|
| 1 | 25 | 3 | 3/25 | 12,00 |
| 2 | 26 | 2 | 2/26 | 7,69 |
| TOTAL | 51 | 5 | 5/51 | 9,80 |

* valores na mesma coluna não diferem entre as classes pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$).

Os resultados presentes nas Tabelas 9 e 10 demonstraram que não houve diferenças estatísticas ($P>0,05$) nos percentuais de dupla ovulação, seja como efeito dos tratamentos ou das classes. No presente estudo, em 9,8% dos animais que apresentaram a ovulação sincronizada mostraram duplas ovulações. Estes resultados foram similares aos de Vasconcelos et al. (1999), que encontraram 10% de duplas ovulações e inferiores aos relatados por Fricke et al. (1998), com cerca de 14,0%. Ryan & Boland (1991) citaram que a seleção do folículo dominante, durante o crescimento folicular, em bovinos, demonstrou que as vacas ovularam, normalmente, somente um folículo durante o metaestro; entretanto, algumas vacas em condições fisiológicas ovularam dois folículos após o estro espontâneo. Alguns fatores contribuíram para o aparecimento das duplas ovulações foram a ordem de parto e/ou o número de lactações do animal (Rutledge, 1975). Portanto, não parece que o tratamento (Tabela 9), nem o status ovariano no início do tratamento (Tabela 10) indicaram comprometimento no aparecimento ou não das duplas ovulações, pois os resultados expostos na Tabela 10 revelaram que os animais com ou sem CL apresentaram taxas similares ($P>0,05$) de duplas ovulações. Porém, mais estudos são necessários para determinar os fatores que acarretam em duplas ovulações em vacas de leite.

6.2 - Dosagens de Progesterona e Estradiol

Os valores das concentrações séricas de progesterona, de acordo com os grupos de tratamento, estão mostrados na Tabela 11 e a Figura 7. O aumento médio inicial registrado no perfil de progesterona sérica refletiu o efeito da Fertirelina sobre os folículos existentes. Isto ocorreu devido ao processo de luteinização, indiretamente provocado por este hormônio, via liberação de LH pela hipófise (Chenault et al., 1990). Novamente, não foram encontradas diferenças entre os grupos de tratamento ($P>0,05$). Adicionalmente, os valores expostos na Figura 7 revelaram certa homogeneidade dos perfis de progesterona após a aplicação de Cloprostenol (dia 8); portanto, embora nem todos os animais apresentassem a primeira onda sincronizada, já que estavam em estádios randômicos do ciclo estral, as administrações de Cloprostenol e Acetato de Fertirelina 48 horas após, foi eficiente em promover a sincronização da ovulação seja nas doses de 50 ou 100 μ g.

Nos animais pertencentes à classe 1, já que não se trabalhou com animais em dias específicos do ciclo estral, pode ter ocorrido luteólise espontânea de um corpo lúteo pré-existente à aplicação de Fertirelina (Tabela 12, Figura 8) explicando a queda de progesterona entre o início do programa e o oitavo dia (Dia 8) de avaliação. A ação da Fertirelina não interferiu, conforme citado por Fortune (1994) numa possível luteólise fisiológica. Por exemplo, animais que ao início do tratamento estivessem entre os dias 12 e 20 do ciclo estral podem ter sofrido regressão espontânea do corpo lúteo e com isto exibiram queda nas concentrações séricas de progesterona entre os dias avaliados (Vasconcelos et al., 1999; Moreira et al., 2000a; Yamada, et al., 2002). Para os animais da classe 2, a Fertirelina foi eficiente em provocar a luteinização ou ovulação de um folículo dominante, o que acarretou no aumento nas concentrações de progesterona após a primeira aplicação. Estes achados também foram descritas por Thatcher et al. (1989) e Yamada et al. (2002).

Os resultados presentes na Tabela 12 e a Figura 8 revelaram que o estágio do ciclo estral, no início do protocolo, afetou ($P<0,05$) as concentrações de P4 após aplicação do primeiro GnRH até o dia da administração do luteolítico, mas não após a administração da segunda dose de GnRH. Estas observações também foram relatadas por Vasconcelos et al. (1999); Yamada et al. (2002) e Yamada (2005).

As concentrações de progesterona nos animais da classe 2 (Figura 8, Tabela 12) mostraram que, no início do tratamento (Dia 0), o GnRH induziu a ovulação ou luteinização de um folículo acima de 10mm de diâmetro (Bigelow & Fortune, 1998; Cartmill et al., 2001a; Lane et al., 2001a); desta maneira, um tecido luteal foi formado e as concentrações de progesterona cresceram gradativamente até alcançar valores acima de 1ng/mL no dia 8 após o início do protocolo. Portanto, a Fertirelina induziu a emergência de uma nova onda folicular levando à ovulação após a segunda aplicação do GnRH (Dia 10; Yamada, 2005).

A queda na concentração de progesterona observada após o 8º dia ocorreu pela indução artificial da luteólise, provocada pela aplicação da prostaglandina (Ciosin[®] – Schering Plough) nesta data (Figuras 7 e 8; Tabelas 11 e 12). A prostaglandina reduziu as concentrações séricas de progesterona, estimulando o final do desenvolvimento folicular e a possibilidade de ovulação (Adams et al., 1994; Dutt et al., 1995; Costa et al., 2000; Dutt & Kharche, 2000).

Mesmo discreta, por tratar-se de um período curto após a ovulação, que geralmente ocorre cerca de 20-32 horas após a indução com GnRH (Pursley et al., 1995; 1997a,b), a elevação das concentrações de progesterona entre os dois últimos dias de análise (Dia 10 e Dia 12) mostrou que ocorreu a ovulação e CL foi formado aumentando gradativamente a produção deste hormônio, como descrito por Niswender et al. (2000).

Tabela 11: Valores médios \pm erro padrão de Progesterona sérica (ng/mL) nos dias 0, 2, 8, 10 e 12, em vacas leiteiras submetidas ao protocolo “Ovsynch”, de acordo com os tratamentos

| Tratamentos (Grupos) | N | Dia 0 [*] | Dia 2 [*] | Dia 8 [*] | Dia 10 [*] | Dia 12 [*] |
|-------------------------|----|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| 1 | 21 | 1,59 \pm 0,44 | 1,65 \pm 0,46 | 1,27 \pm 0,28 | 0,12 \pm 0,042 | 0,14 \pm 0,06 |
| 2 | 21 | 1,09 \pm 0,29 | 1,28 \pm 0,34 | 1,33 \pm 0,37 | 0,09 \pm 0,05 | 0,10 \pm 0,06 |
| 3 | 19 | 1,33 \pm 0,40 | 1,36 \pm 0,36 | 1,20 \pm 0,27 | 0,16 \pm 0,04 | 0,16 \pm 0,07 |
| 4 | 16 | 1,10 \pm 0,34 | 1,20 \pm 0,41 | 1,35 \pm 0,28 | 0,12 \pm 0,05 | 0,17 \pm 0,08 |
| Total | 77 | 1,29 \pm 0,19 | 1,39 \pm 0,20 | 1,29 \pm 0,15 | 0,12 \pm 0,02 | 0,14 \pm 0,03 |

*valores na mesma coluna não diferem entre os tratamentos pelo ANOVA (P>0,05).

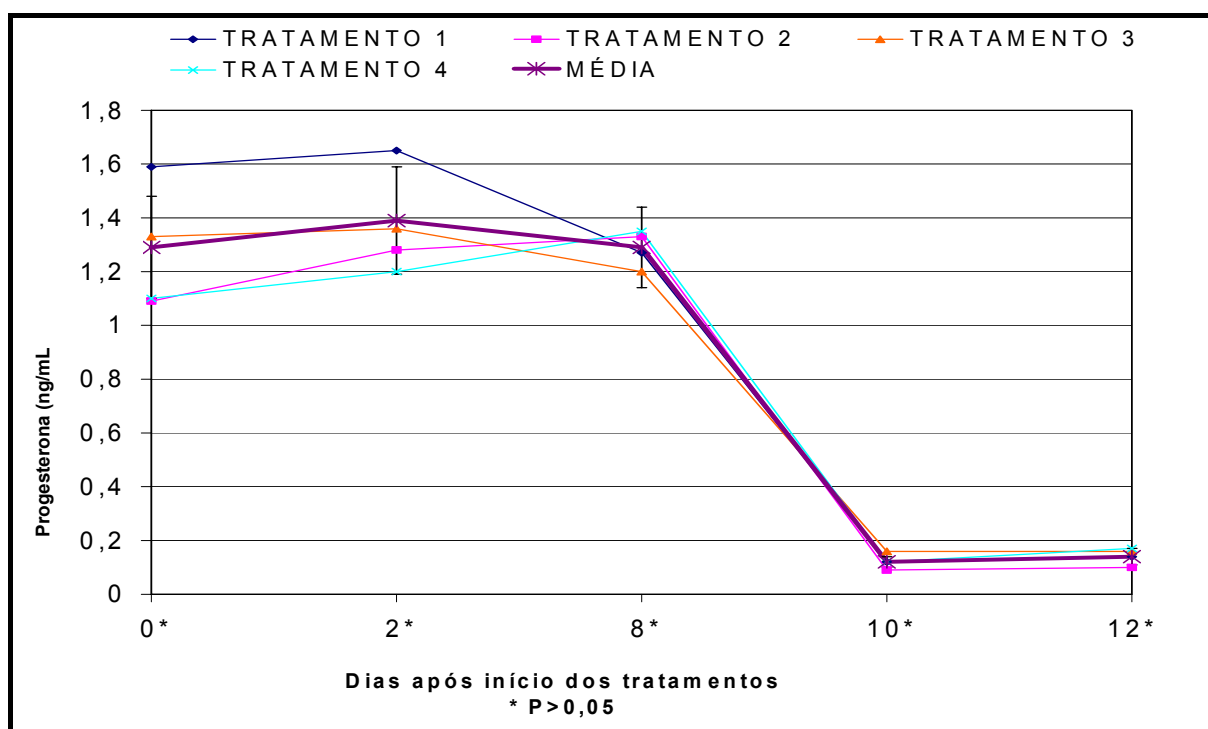


Figura 7: Valores médios de progesterona sérica (ng/mL) nos dias 0, 2, 8, 10 e 12 após início do protocolo “Ovsynch”, em vacas leiteiras, de acordo com os tratamentos

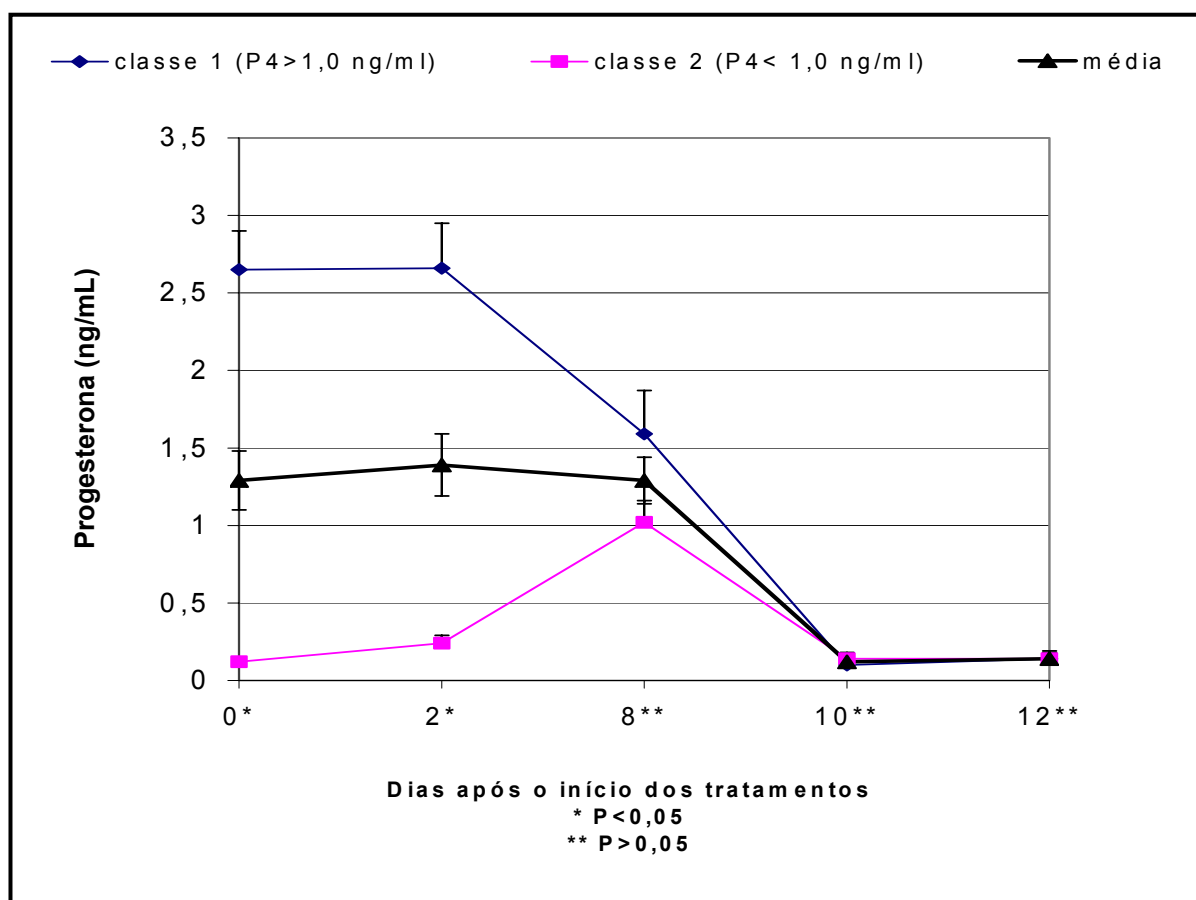


Figura 8: Valores médios de progesterona sérica (ng/mL) nos dias 0, 2, 8, 10 e 12 após início do protocolo “Ovsynch”, em vacas leiteiras, de acordo com as classes

Tabela 12: Valores médios \pm erro padrão de Progesterona sérica (ng/mL) nos dias 0, 2, 8, 10 e 12 após o início do protocolo “Ovsynch”, em vacas leiteiras, de acordo com as classes: Classe 1 = P4 > 1,0 ng/mL no dia 0; Classe 2 = P4 < 1,0 ng/mL no dia 0

| Classes | N | Dia 0* | Dia 2* | Dia 8** | Dia 10** | Dia 12** |
|---------|----|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 36 | 2,65 \pm 0,25 | 2,66 \pm 0,29 | 1,59 \pm 0,28 | 0,10 \pm 0,02 | 0,14 \pm 0,04 |
| 2 | 41 | 0,12 \pm 0,028 | 0,24 \pm 0,05 | 1,02 \pm 0,14 | 0,14 \pm 0,04 | 0,14 \pm 0,05 |
| TOTAL | 77 | 1,29 \pm 0,19 | 1,39 \pm 0,20 | 1,29 \pm 0,15 | 0,12 \pm 0,02 | 0,14 \pm 0,03 |

* valores na mesma coluna diferem entre as classes pelo teste ANOVA (P < 0,05).

** valores na mesma coluna não diferem entre as classes pelo teste ANOVA (P > 0,05).

Os perfis das concentrações de estradiol estão mostrados na Tabela 13 e na Figura 9, segundo os tratamentos e, na Tabela 14 e na Figura 10, para as diferentes classes. A redução inicial (entre início e Dia 2, Figura 9) observada nas concentrações de estradiol, após aplicação da primeira dose de Fertirelina, na maioria dos tratamentos, refletiu a ação indireta da Fertirelina sobre a atividade dos folículos, possivelmente provocando a ovulação de um folículo dominante ou atresia, com conseqüente redução na sua capacidade esteroidogênica (Thatcher et al., 1989; Twagiramungu et al., 1992; Silcox et al., 1995; Sartori et al., 2001; Yamada et al., 2002). Isto também ocorreu para os animais da classe 2 (Tabela 14; Figura 10), já que entre os dias dois e oito, a elevação nas concentrações séricas deste hormônio mostraram que houve sincronização da onda de desenvolvimento folicular, e que os novos folículos em crescimento estavam, gradativamente, produzindo cada vez mais estradiol. Para os animais da classe 1, após a aplicação do primeiro GnRH, as concentrações de estradiol apresentaram um pequeno aumento até o dia 8 o que leva a sugerir que, nestes animais, poderia não haver folículos com capacidade ovulatória, desta maneira, os mesmos continuaram seu crescimento e, após a aplicação de prostaglandina e diminuição das concentrações de progesterona, acarretou-se em um aumento da frequência dos pulsos de LH, e estes folículos cresceram o suficiente para alcançar os padrões pré ovulatórios (Roberson et al., 1989; Bergfelt et al., 1991; Adams et al., 1992; Roche et al., 1999; Ginther, 2000).

Com a luteólise induzida no Dia 8, ocorreu queda nas concentrações de progesterona (Figuras 9 e 10) e, com isto, o ritmo de desenvolvimento dos folículos acelerou (Roberson et al., 1989; Bergfelt et al., 1991; Adams et al., 1992; Ginther, 2000), o que pode ser comprovado pela mudança no perfil da curva de estradiol ($P < 0,05$; Tabela 15), refletindo maior produção deste hormônio após o dia 8.

A Fertirelina aplicada no Dia 10, com o intuito de provocar ovulação, mostrou ser eficiente em qualquer dose estudada (Tabela 15; Figuras 9 e 10). Comprovação adicional, além da avaliação ultra-sonográfica, pode ser evidenciada pela redução das concentrações de estradiol após esta data. Com a ovulação, cessou a produção de estradiol, cujas concentrações séricas reduziram-se gradativamente, após este evento (Figuras 9 e 10), conforme descrito por Ginther et al. (1989; 1996) e Ginther (2000).

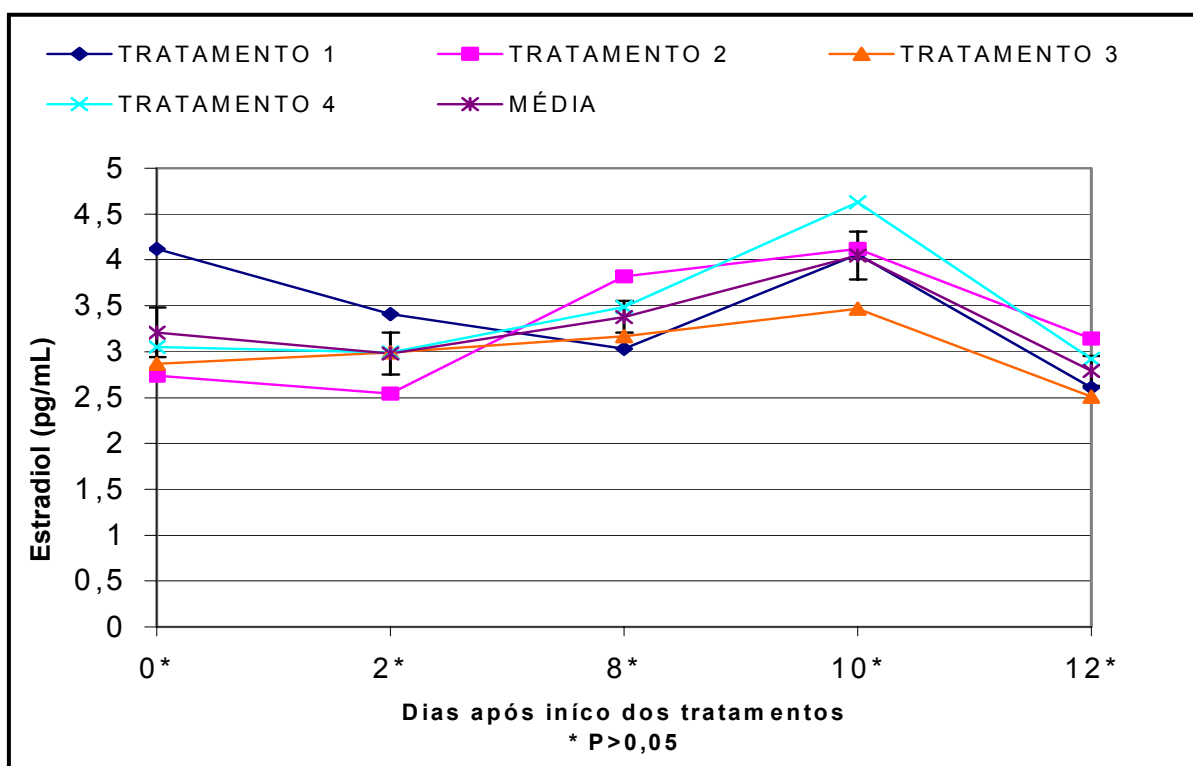


Figura 9: Valores médios de estradiol sérico (ng/mL) nos dias 0, 2, 8, 10 e 12 após início do protocolo “Ovsynch”, em vacas leiteiras, de acordo com os grupos de tratamento

Tabela 13: Valores médios \pm erro padrão de Estradiol sérico (pg/mL) nos dias 0, 2, 8, 10 e 12 do protocolo “Ovsynch”, em vacas leiteiras, de acordo com os grupos de tratamento

| Grupos | N | Dia 0* | Dia 2* | Dia 8* | Dia 10* | Dia 12* |
|--------|----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 21 | 4,12 \pm 0,87 | 3,41 \pm 0,55 | 3,03 \pm 0,25 | 4,06 \pm 0,60 | 2,61 \pm 0,3 |
| 2 | 21 | 2,74 \pm 0,31 | 2,54 \pm 0,20 | 3,82 \pm 0,34 | 4,12 \pm 0,50 | 3,14 \pm 0,34 |
| 3 | 19 | 2,87 \pm 0,27 | 2,99 \pm 0,57 | 3,17 \pm 0,29 | 3,47 \pm 0,40 | 2,51 \pm 0,18 |
| 4 | 16 | 3,05 \pm 0,33 | 2,99 \pm 0,44 | 3,49 \pm 0,44 | 4,63 \pm 0,58 | 2,92 \pm 0,43 |
| Total | 77 | 3,21 \pm 0,27 | 2,98 \pm 0,23 | 3,38 \pm 0,17 | 4,05 \pm 0,26 | 2,79 \pm 0,16 |

* valores na mesma coluna não diferem entre os tratamentos pelo teste ANOVA (P>0,05).

Tabela 14: Valores médios \pm erro padrão de Estradiol sérico (pg/mL) nos dias 0, 2, 8, 10 e 12 do protocolo “Ovsynch”, em vacas leiteiras, de acordo com as classes: classe 1 = P4 > 1,ng/mL no dia 0; classe 2 = P4 < 1,ng/mL no dia 0

| Classe | N | Dia 0* | Dia 2* | Dia 8* | Dia 10* | Dia 12* |
|--------|----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 36 | 3,38 \pm 0,55 | 3,42 \pm 0,44 | 3,43 \pm 0,24 | 4,36 \pm 0,40 | 2,75 \pm 0,22 |
| 2 | 41 | 3,07 \pm 0,17 | 2,60 \pm 0,17 | 3,33 \pm 0,30 | 3,78 \pm 0,35 | 2,84 \pm 0,30 |
| TOTAL | 77 | 3,21 \pm 0,27 | 2,98 \pm 0,23 | 3,38 \pm 0,17 | 4,05 \pm 0,26 | 2,79 \pm 0,16 |

*valores na mesma coluna não diferem entre as classes pelo teste ANOVA (P> 0,05).

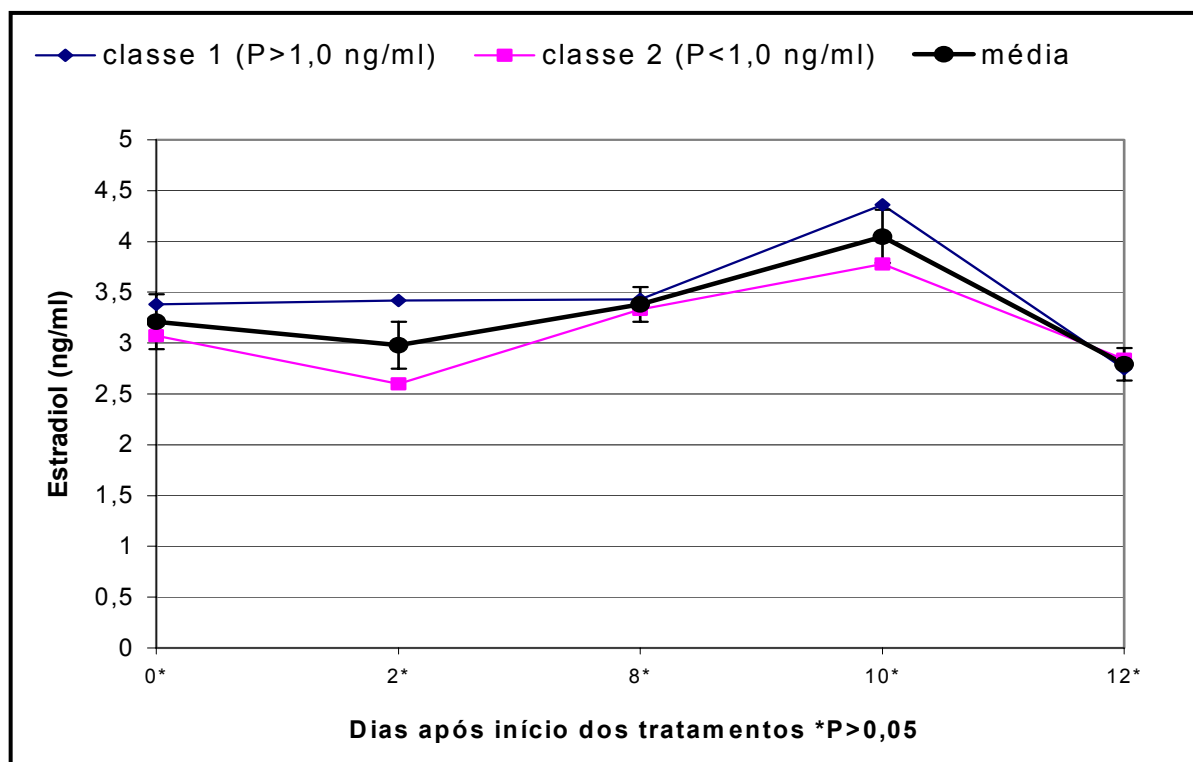


Figura 10: Valores médios de estradiol sérico (pg/mL) em vacas leiteiras submetidas ao protocolo “Ovsynch”, de acordo com as classes

Tabela 15: Valores médios \pm erro padrão das concentrações séricas de Estradiol e Progesterona nos dias 0, 2, 8, 10 e 12 do protocolo “Ovsynch”, em vacas leiteiras. Para Progesterona (P4), classe 1 representa valores $> 1,0$ ng/mL no dia 0 e classe 2 representa valores $< 1,0$ ng/mL no dia 0

| DIAS | E2 (pg/mL) N=77 | P4 (ng/mL) | |
|------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | Classe 1 N=33 | Classe 2 N=40 |
| 0 | 3,21 \pm 0,27 ^A | 2,65 \pm 0,25 ^a | 0,12 \pm 0,028 ^a |
| 2 | 2,98 \pm 0,23 ^A | 2,66 \pm 0,29 ^{ab} | 0,24 \pm 0,05 ^a |
| 8 | 3,38 \pm 0,17 ^A | 1,59 \pm 0,28 ^b | 1,02 \pm 0,14 ^b |
| 10 | 4,05 \pm 0,26 ^B | 0,10 \pm 0,02 ^c | 0,14 \pm 0,04 ^a |
| 12 | 2,79 \pm 0,16 ^A | 0,14 \pm 0,04 ^c | 0,14 \pm 0,05 ^a |

A, B: Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Duncam ($P<0,05$)

a,b: Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste Kruskall Wallis ($P<0,05$).

A Tabela 15 apresenta os valores das concentrações séricas de estradiol (média geral) e progesterona, nos animais, nas diferentes classes. As concentrações de estradiol no Dia 10 foram superiores ($P<0,05$) aos outros dias do protocolo, mostrando que, por qualquer que seja o mecanismo induzido pelo GnRH (Fertirelina) no início dos tratamentos (ovulação, luteinização, atresia ou nenhuma ação), houve um folículo que obteve aumento da sua capacidade esteroidogênica e estava em condições pré-ovulatórias, a partir do dia 10 do protocolo. Para as concentrações de Progesterona mensuradas, nos animais das diferentes classes, sugeriu-se que, sejam quais forem os mecanismos resultantes da primeira aplicação do GnRH, os animais apresentaram uma certa homogeneidade hormonal a partir do dia 8 e, no dia 10, estavam com valores inferiores a 1,0 ng/mL e com capacidade de ovular, já que a diminuição das concentrações de progesterona leva ao aumento dos pulsos de LH e conseqüente ovulação (Roberson et al., 1989; Bergfelt et al., 1991; Adams et al., 1992; Ginther et al., 1996).

As concentrações médias de estradiol e progesterona, analisadas durante os períodos de colheita de sangue, comprovaram que a eficiência da Fertirelina em provocar atresia, luteinização e/ou ovulação do folículo dominante e emergência de

nova onda de desenvolvimento folicular, assim como a indução da ovulação ao final do protocolo (Yamada et al., 2002; Yamada, 2005).

6.3- Avaliações ultra-sonográficas da dinâmica folicular.

Pela avaliação ultra-sonográfica, os efeitos do Acetato de Fertirelina na dinâmica folicular dos animais sincronizados pelo protocolo “Ovsynch” foram similares aos outros análogos (Pursley et al., 1995) em relação à emergência de uma nova onda folicular cerca de 48 horas após a primeira aplicação e a ovulação tendeu a apresentar-se em tempos também pré definidos, já que, nas 48 horas após a segunda aplicação de GnRH, mais de 66% dos animais já teriam ovulado (Barros et al., 1998; Tefera et al., 2001; MacMillan et al., 2003).

Os valores presentes nas Tabelas 16 e 17 referem-se aos diâmetros dos folículos pré-ovulatórios nos momentos da aplicação do Cloprostenol (Dia 8) e no dia da última administração de Fertirelina (Dia 10), entre os tratamentos (Tabela 16) e entre as classes (Tabela 17). Em relação aos tratamentos, não houve diferenças nos diâmetros foliculares de nenhum grupo ($P>0,05$), o que conferiu ao acetato de Fertirelina a habilidade em liberar LH suficiente (naqueles animais sincronizados) para o desenvolvimento folicular, compatível com o fisiológico, discordando dos achados de Segwagwe (2002), os quais mostraram que ovulações sincronizadas envolvem folículos com diâmetros inferiores aos naturais.

Tabela 16: Diâmetro médio \pm erro padrão (mm) dos folículos dominantes em vacas leiteiras submetidas ao protocolo “Ovsynch”, nos dias 8 e 10 do protocolo, de acordo com os grupos de tratamento

| Tratamentos (Grupos) | Número de Animais | Diâmetro (mm) Dia 8* | Diâmetro (mm) Dia 10* | Taxa de crescimento folicular diária (mm) |
|----------------------|-------------------|----------------------|-----------------------|---|
| 1 | 14 | 1,51 \pm 0,08 | 1,64 \pm 0,09 | 0,06 |
| 2 | 11 | 1,51 \pm 0,11 | 1,70 \pm 0,12 | 0,09 |
| 3 | 12 | 1,56 \pm 0,09 | 1,63 \pm 0,11 | 0,04 |
| 4 | 14 | 1,54 \pm 0,13 | 1,82 \pm 0,10 | 0,14 |
| Total | 51 | 1,53 \pm 0,05 | 1,70 \pm 0,05 | 0,09 |

* valores na mesma coluna não diferem entre os tratamentos pelo ANOVA (P>0,05)

Tabela 17: Diâmetro médio \pm erro padrão (mm) dos folículos dominantes em vacas leiteiras submetidas ao protocolo “Ovsynch”, nos dias 8 e 10 do protocolo, de acordo com as classes

| Classes | Número de Animais | Diâmetro (mm) Dia 8* | Diâmetro (mm) Dia 10* | Taxa de crescimento folicular diária (mm) |
|---------|-------------------|----------------------|-----------------------|---|
| 1 | 31 | 1,47 \pm 0,05 | 1,63 \pm 0,06 | 0,08 |
| 2 | 20 | 1,66 \pm 0,11 | 1,84 \pm 0,09 | 0,09 |
| Total | 51 | 1,53 \pm 0,05 | 1,70 \pm 0,05 | 0,09 |

*: valores na mesma coluna diferem por ANOVA (P<0,05)

No presente experimento, os diâmetros dos folículos no dia 8 e 10 após início dos tratamentos foram compatíveis ao que é demonstrado na literatura para animais não sincronizados isto é, em animais com ciclos estrais fisiológicos, isto é, sem administração de hormônios, cujos diâmetros destes folículos pré-ovulatórios variaram de 13-16 mm (Ginther et al., 1989) ou de 15-20 mm (Ginther et al., 2001). MacMillan et al. (2003) afirmaram que o uso do GnRH, no protocolo “Ovsynch”,

levou à ovulação de folículos dominantes com diâmetros inferiores quando comparado com ovulações espontâneas. Porém, neste estudo, os folículos apresentaram diâmetros similares ao fisiológico, e isto pode ser explicado pela injeção de PGF2 α no dia 8 e não no dia 7, como indicado por Pursley et al. (1995), o que acarretaria em mais um dia de crescimento folicular antes de uma possível diminuição das concentrações de progesterona. Estes dados também foram indicados por Thatcher et al. (1989), que sugeriram a administração de PGF2 α no dia 8 ao invés do dia 7 para melhorar a sincronização.

Os diâmetros foliculares nos dias 8 e 10, apresentaram inferiores ($P < 0,05$) nos animais da classe 1 quando comparados aos animais da classe 2 (Tabela 17). Estes dados foram similares aos encontrados por Vasconcelos et al. (1999) e Moreira et al. (2000a), os quais relataram que o dia do ciclo estral no início do protocolo interferiu sobre o tamanho do folículo ovulatório. Animais na fase folicular deveriam estar entre os dias 1-4 ou 17-21 do ciclo, já que as concentrações de progesterona estavam abaixo de 1ng/mL. Os animais na fase luteal, por sua vez, deveriam estar entre os dias 5-16 (Ginther et al., 1989; Ali et al., 2001). Esta diferença no crescimento folicular pode ser devida às elevadas concentrações de progesterona nos animais da classe 1, que interferiram nas secreções de LH (Ginther et al., 2001) e, por conseguinte, nos crescimentos foliculares, visto que as taxas de crescimento também foram numericamente inferiores entre os grupos (Roberson et al., 1989; Bergfelt et al., 1991; Adams et al., 1992)

6.4 - Taxas de gestação

A taxa de gestação geral encontrada neste estudo foi de 28,37% (Tabela 18), similar ao relatado por Burke et al. (1996) e Jobst et al. (2000). Porém, apresentou-se inferior ao descrito por outros autores, cujas taxas de gestação variaram de 30,1% a 62% (Pursley et al., 1995; 1997 a, b, 1998; Le Blanc et al., 1998; Moncilovic et al., 1998; Stevenson et al., 1999; Yamada et al., 2002; Tenhagen et al., 2004). Vale ressaltar que esta variável (taxa de gestação) não foi o objetivo principal do presente trabalho, mas sim avaliar as alterações endócrinas e fisiológicas na dinâmica folicular durante os tratamentos.

Não houve diferença ($P > 0,05$) em relação aos tratamentos no que tange às taxas de prenhez (Tabela 18). Assim, demonstrou-se a eficiência da Fertirelina

nas doses de 100µg ou 50µg, as quais foram suficientes em sincronizar a ovulação no protocolo “Ovsynch”, revelando que os animais podem ser tratados com 50µg do análogo sem apresentar efeito detrimental nas taxas de gestação. Desta maneira, diminui-se o custo dos tratamentos sem afetar a eficiência reprodutiva. Estes dados apresentaram semelhança aos encontrados por Fricke et al. (1998).

Contabilizou-se o total de 74 animais para o diagnóstico de gestação, por motivos de descarte de três animais antes do período do exame.

Tabela 18: Dias pós-parto ± erro padrão e taxas de gestação, em vacas leiteiras, submetidas ao protocolo “Ovsynch”, de acordo com os grupos de tratamento

| Tratamentos (Grupos) | Número de Animais | DPP ± EP** | Taxas de gestação N (%) * |
|-------------------------|----------------------|----------------|------------------------------|
| 1 | 20 | 127,29 ± 19,88 | 4/20 (20,00) |
| 2 | 20 | 129,57 ± 26,39 | 6/20 (30,00) |
| 3 | 18 | 168,58 ± 40,39 | 4/18 (22,22) |
| 4 | 16 | 132,81 ± 21,39 | 7/16 (43,75) |
| Total | 74 | 139,25 ± 14,01 | 21/74 (28,37) |

* valores na mesma coluna não diferem entre os tratamentos pelo Qui-quadrado ($P > 0,05$)

** DPP±EP: Dias pós-parto ± erro padrão, não diferem por ANOVA ($P > 0,05$).

Moreira et al. (2000a) observaram que o aumento das taxas de prenhez está relacionado ao início dos protocolos em dias favoráveis do ciclo estral (5-10 dias). Desta maneira, animais no diestro (fase luteal) apresentaram maiores taxas de gestação que animais que iniciaram o protocolo na fase folicular. Estas idéias são compatíveis ao encontrado no presente estudo (Tabela 19) onde, embora sem diferença estatística, ficou demonstrado que as taxas de gestação nos animais da classe 1 são numericamente maiores, isto é, animais que possivelmente estavam no diestro no início dos protocolos.

Tabela 19: Taxas de gestação dos animais submetidos ao protocolo “Ovsynch”, de acordo com as classes

| Classes | Número de Animais | Diagnóstico de Gestação | Taxas de prenhez (%) * |
|----------------|--------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Classe 1 | 36 | 11 | 30,56 |
| Classe 2 | 38 | 10 | 26,31 |
| Total | 74 | 21 | 28,37 |

* valores na mesma coluna não diferem entre os tratamentos pelo Qui-quadrado ($P>0,05$)

Vasconcelos et al. (1999) descreveram que, animais com folículos pré-ovulatórios com diâmetros inferiores que a média do grupo, apresentaram melhores taxas de prenhez em relação aos animais com folículos pré-ovulatórios acima da média geral. Adicionalmente, estes menores folículos foram designados aos animais nas fases de diestro e animais na fase folicular (no início dos protocolos), ovularam folículos maiores e estas condições apresentaram relação direta com as taxas de prenhez. Concordando com estas afirmações, os animais da classe 1, quando ovularam, seus folículos pré-ovulatórios mediam $1,63\pm 0,06$ mm e apresentaram taxas de gestação de 30,56% enquanto que os folículos dos animais da classe 2 mediam $1,84\pm 0,09$ mm mostrando taxas inferiores de prenhez (26,31%) embora não diferiram estatisticamente (Tabelas 17 e 19). Estes animais com folículos maiores poderiam não apresentar altas concentrações de progesterona durante o protocolo e, conseqüentemente, estariam em ambientes com maiores concentrações de LH, levando ao maior crescimento folicular (Savio et al., 1993), que os animais que receberam o GnRH (Fertirelina) na presença de P4. Também, estes animais da fase folicular podem não ter sido submetidos à sincronização da emergência de onda e, portanto, os folículos continuaram seu crescimento, além de possivelmente terem expressado dominância por um período maior que cinco dias e, com maiores concentrações de LH, resultando em folículos menos férteis (Vasconcelos et al., 1997a, b).

As taxas de gestação são muito variáveis e, as causas para a redução destes valores, em gado de leite com alto mérito genético, hoje em dia, são relatadas como multifatoriais e incluem os efeitos da condição corporal (Moreira et al., 2000b), estação do ano (De La Sota et al., 1998), estresse térmico (Cartmill et

al., 2001b), estágio do ciclo estral que foi iniciado o protocolo (Vasconcelos et al., 1999), a alta produção de leite (Lucy, 2001), dias pós-parto (Pursley et al., 1998), balanço energético negativo (Butler & Smith, 1989) e baixa ingestão de matéria seca (Butler et al., 2002), dentre outros. Portanto, fica clara a impossibilidade de comparar as taxas de gestação com vários trabalhos descritos na literatura, visto que esta variável pode vir a resultar dos inúmeros efeitos acima citados.

O valor encontrado para a taxa de gestação, neste estudo (28,37%), apresentou-se pouco inferior ao reportado na literatura (Pursley et al., 1995; Stevenson et al., 1996). Vale lembrar que estes diagnósticos foram realizados aos 50-60 dias pós IA e, portanto, não há informações sobre as possíveis gestações que acarretaram em perdas embrionárias, mas esta pode ocorrer por volta dos 20% dos animais gestantes (Smith & Stevenson, 1995; Pursley et al., 1998). Um dos argumentos para justificar as baixas taxas de gestação desse estudo foi que a manipulação constante devido o exame ultra-sonográfico, a colheita de sangue para as análises hormonais, bem como a mudança brusca de manejo em que estes animais foram submetidos, por conta do experimento, podem ter interferido nas baixas taxas de concepção.

Os valores presentes na Tabela 20 demonstraram que, animais entre os dias 75-100 pós-parto obtiveram (numericamente) taxas de gestação um pouco superiores aos animais de outras categorias. Estes achados foram similares ao experimento de Pursley et al. (1998) que também demonstraram que animais no período pós-parto entre 75-100 dias têm melhores taxas de gestação quando comparados aos animais acima dos 100 dias. Estas afirmações concordaram com o presente estudo onde, animais que foram submetidos aos tratamentos e estavam acima dos 100 dias pós-parto, revelaram taxas de gestação de 27,27%, numericamente inferiores aos animais que estavam entre os dias 75-100 pós-parto.

Tabela 20: Taxas de gestação em vacas leiteiras submetidas ao protocolo “Ovsynch”, de acordo com os dias pós-parto no início dos grupos de tratamento

| Dias pós-parto | Número de Animais | Taxas de Gestação N (%) * |
|-----------------------|--------------------------|----------------------------------|
| 60-75 | 21 | 4/21 (19,04) |
| 76-100 | 20 | 8/20 (40,00) |
| >101 | 33 | 9/33 (27,27) |
| TOTAL | 74 | 21/74 (28,37) |

*valores na mesma coluna não diferem entre os tratamentos pelo Qui-quadrado ($P>0,05$)

7 - Conclusões

Através das análises das concentrações de estradiol e progesterona séricas, as avaliações ultra-sonográficas e as taxas de prenhez, fica demonstrado que o Acetato de Fertirelina utilizado no protocolo “Ovsynch”, como análogo ao GnRH, foi eficiente em sincronizar a onda de desenvolvimento folicular e ovulação em vacas leiteiras, que iniciaram o protocolo em estádios aleatórios do ciclo estral.

Animais em diferentes fases do ciclo estral podem ser submetidos ao protocolo “Ovsynch”, utilizando como análogo do GnRH o Acetato de Fertirelina, seja nas doses de 50µg ou 100µg.

Doses de 50µg de Acetato de Fertirelina podem ser utilizadas sem apresentar comprometimento nos resultados finais dos programas de sincronização (“Ovsynch”), levando a redução substancial dos custos de produção.

8 - Referências bibliográficas

ADAMS, G.P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation *Theriogenology*. v.41, p.19-24, 1994.

ADAMS, G.P., MATTERI, R.L., GINTHER, O .J. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating-stimulating hormone in heifers. *J. Reprod. Fertil.*, v.95, p.627-640, 1992.

ALI, A., LANGE, A., GILLES, M., GLATZEL, P.S. Morphological and functional characteristics of the dominant follicle and corpus luteum in cattle and their influence on ovarian function. *Theriogenology*, v.56, p.569-576, 2001.

AUSTIN, E.J., MIHM, M., RYAN, M.P., WILLIAMS, D.H., ROCHE, J.F. Effect of duration of dominance of the ovulatory follicle on onset of estrus and fertility in heifers. *Biol. Reprod.*, v.62 (Suppl. 1), Abst., p.151, 1999.

BAIRD, D.T. Lutetropic control of the corpus luteum. *Anim. Reprod. Sci.*, v.28, p. 95-102, 1992.

BAO, B, GARVERICK, H.A., SMITH, G.W., SMITH, M.F., SALFEN, B.E., YOUNGQUIST, R.S. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biol. Reprod.*, v. 56, p.1158–1168, 1997.

BAO, B., GARVERICK, H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J. Anim. Sci.*, v.76, p. 1903-1921, 1998.

BARROS, C.M., FERNANDES, P., NOGUEIRA, M.F.G. Controle farmacológico do ciclo estral e superovulação em zebuínos de corte. São Paulo - SP, 2000 In: SIMPÓSIO DE CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES, Departamento de Reprodução Animal FMVZ-USP, 2000, São Paulo. *Anais...* São Paulo, 2000. p.158-189.

BARROS, C.M., GAMBINI, A.L.G., MOREIRA, M.B.P., CASTILHO, C. Synchronization of ovulation in gir cows with gnrh-pgf-gnrh treatment. *Reprod. Dom. Ruminants*. v.4, p.516, 1998.

BARTOLOME, J.A., SILVESTRE, F.T., ARTECHE, A.C.M., KAMIMURA, S. et al. The use of "Ovsynch" and heatsynch for re-synchronization of cows open at pregnancy diagnosis by ultrasonography. *J Dairy Sci*, v.85, p.99, 2002 (abstr).

BEG, M.A., BERGFELT, D.R., KOT, K., WILTBANK, M.C., GINTHER, O.J. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biol. Reprod.*, v.64, p.432-441, 2001.

BENMRAD, M., STEVENSON, J.S. Gonadotropin-releasing hormone and prostaglandinF2 α for postpartum dairy cows: estrus, ovulation, and fertility trait. *J. Dairy Sci.*, v.69, p.800. 1986.

BERGFELT, D.R., KASTELIC, J.P., GINTHER, O.J. Continued periodic emergence of follicular waves in non-bred progesterone-treated heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, v.24, p.193-204, 1991.

BIGELOW, K.L., FORTUNE, J.E. Characteristics of prolonged dominant versus control follicles: follicle cell numbers, steroidogenic capabilities and messenger ribonucleic acid for steroidogenic enzymes. *Biol. Reprod.*, v. 58, p.1241-1249. 1998.

BÓ, G.A., ADAMS, G. P., MAPLETOFT, R. J. Dinâmica Folicular Ovária en el Bovino. In: SIMPÓSIO SOBRE CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES, USP, São Paulo, 31 de maio à 2 de junho de 2000, *Anais.....*São Paulo, 2000. p.12-34.

BRITT, J.H. Enhanced reproduction and its economic implications. *J. Dairy Science*, v.68, p.1585-92, 1985.

BRITT, J.S., GASKA, J.G. Comparison of two estrus synchronization programs in a large, confinement-housed dairy herd. *JAVMA*, v.212, p.210-212, 1998.

BURFENING, P.J., ANDERSON, D.C., KINKIE, R.A., WILLIAMS, J., FRIEDRICH, R.L. Synchronization of estrus with PGF₂ α in beef cattle. *J. Anim. Sci.*, v.47, n. 5, p. 999-1003, 1978.

BURKE, J.M., DE LA SOTA, R.L., RISCO, C.A., STAPLES, C.R., SCHIMITT, É.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.

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

BUTLER, W.R. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60-61, p.449-457, 2000.

BUTLER, W.R. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Rep. Sci.*, v.60-61, p.449-457, 2002.

BUTLER, W.R., SMITH, R.D. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v.72, p.767-783, 1989.

CARDOVA, S.A., JIMENEZ, F.K., VILLA-GODOY, A. Intravulvosubmucosal injections of lupristol may reach corpora lutea by a local unilateral pathway in cattle. *Theriogenology*, v. 33, p. 207, 1990.

CARLSON, J.A, BUHR, M., WENTWORTH, R., HANSEL, W. Evidence of membrane changes during regression in the bovine corpus luteum. *Endocrinology*, v.110, p.1472-1476, 1982.

CARTMILL, J.A., EL-ZARKOUNY, S.Z.; HENSLEY, B.A.; LAMB, G.C., STEVENSON, J.S. Stage of cycle, incidence, and timing of ovulation, and pregnancy rates in dairy cattle after three timed breeding protocols. *J. Dairy Sci.* v.84, p.1051-1059, 2001a.

CARTMILL, J.A., HENSLEY, B.A., EL-ZARKOUNY, ROZELL, T.G., SMITH, J.F., STEVENSON, J.S. An alternative AI breeding protocol for dairy cows exposed to elevated ambient temperatures before of after calving or both. *J. Dairy Sci.*, v.84, p.799-806, 2001b.

CHANNING, C.P. Steroidogenesis and morphology of human ovarian cell types in tissue culture. *J Endocrinol.*, v. 45, p. 297-308, 1969.

CHEGINI, N., LEI, M., RAO, C.V., HANSEL, W. Cellular distribution and cycle phase dependence of gonadotropin and eicosanoid binding sites in bovine corpora lútea. *Biol. Reprod.*, v. 45, p. 506-513, 1991.

CHENAULT, J.R. Effect of Fertirelin acetate or Buserelin on conception rate at first or second insemination in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.73, 633-638, 1990.

CHENAULT, J.R., KRATZERT, 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.81-98, 1990.

COLAZO, M.G., MARTINEZ, M.F., KASTELIC, J.P., MAPLETOFT, R.J. Effects of dose and route of administration of cloprostenol on luteolysis, estrus and ovulation in beef heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, v.2295, p. 1-16, 2002.

COOPER, M.J. Cloprostenol as a tool in the management of dairy cattle. *Acta Vet. Scand.*, Suppl. 77, p. 171-179, 1981.

CORDOBA, M.C., FRIKE, P.M. Initiation of the breeding season in a grazing-based dairy by synchronization of ovulation. *J. Dairy Sci.*, v.85, p.1752-1763, 2002.

COSTA, D.S. *Sincronização da onda folicular com buserelina prévia a indução de luteólise com cloprostenol em bovinos*. Viçosa: UFV, Depto. de Zootecnia, 1997, 110p. (Dissertação, Mestrado).

COSTA, D.S., HENRY, M., WHITHE, C.R. Sincronização de cio em vacas zebu com etiproston. *A Hora Veterinária*, n.117, p.23-25, 2000.

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.

DEL VECCHIO, R.P., THIBODEAUX, J.K., HANSEL, W. Contact-associated interactions between large and small bovine luteal cells during the estrous cycle. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v. 12, p. 25-33, 1995.

DISKIN, M.G., AUSTIN, E.J., ROCHE, J.F. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v.23, p.211-228, 2002.

DONALSON, L.E. Synchronization of oestrus in beef cattle artificial breeding programs using ProstaglandinF2 α . *Aust. Vet. J.*, v.53, p.72-77, 1977.

DUTT, T., KHARCHE, S.D. Intravulvo-submucosal administration of dinoprost trometamine for estrus synchronization/induction in crossbred cows. *Indian J. Anim. Sci.*, v. 70, n. 1, p. 46-47, 2000.

DUTT, T., KHARCHE, S.D., ANSARI, M.R., TANEJA, V.K. Superovulation with follitropin, estrus synchronization/induction using intravulvo-submucosal administration of lupristol and embryo transfer in crossbred cows. *Indian J. Anim. Sci.*, v. 65, p. 990-992, 1995.

ELMORE, R.G., BIERSchwal, C.J., YOUNGQUIST, R.S., CANTLEY, T.C., KESLER, D.J., GARVERICK, H.A. Clinical responses of dairy cows with ovarian cysts after treatment with 10,000 I.U. HCG or 100 mcg GnRH. *Vet. Med. /Small Anim. Clin.* v. 70, p.1346-1349, 1975.

ERB, H.N., GROHN, Y.T. Epidemiology of metabolic disorders in the periparturient dairy cow. *J. Dairy Sci.*, v.71, p.2557-2571, 1988.

FERNANDES, C.A.C. *Imunoneutralização Ativa da Inibina, Alterações na Fisiologia Reprodutiva e Resultados de Superovulação em Novilhas*. Botucatu: Unesp, Faculdade de Med. Vet. E Zootec.,2000, 142p. (Tese, Doutorado).

FERNANDES, C.A .C. IATF - Podemos mesmo não observar os cios das vacas? 2004. Disponível em: http://www.beefpoint.com.br/bn/radarestecnicos/artigo.asp?nv=1earea=18earea_desc=Reprodu%E7%E3oeid_artigo=20453eperM=11eperA=2005, acesso em 29/11/2005.

FERREIRA, A.M., TORRES, C.A.A. Perda de peso corporal e cessação da atividade ovariana luteínica cíclica em vacas mestiças leiteiras. *Pesq. Agrop. Brasil.*, v.28. p.411-418, 1993.

FERREIRA, S.A., VANE, J.R. Prostaglandins: their disappearance from and release into the circulation. *Nature*, v. 216, p. 868-873, 1967.

FIELDS, M.J., FIELDS, P.A. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous and pregnancy *Theriogenology*, v. 45, p. 1295-1325, 1996.

FIGUEREDO, R.A., BARROS, C.M., PINHEIRO, O.L., SOLER, J.M.P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (Bos indicus) cattle. *Theriogenology* v. 47,p. 1489-1505, 1997.

FONSECA, F.A., BRITT, J.H., MCDANIEL, B.T., WILK, J.C., RAKES, A.H. Reproductive traits of Holstein and Jerseys. Effects of age, milk yield, and clinical abnormalities on involution of cervix and uterus, ovulation, estrous cycles, detection of estrus, conception rate, and days open. *J. Dairy Sci.*, v.66, p.1128-1147, 1983.

FOOTE, R.H. Estrus detection and estrus detection aids. *J.Dairy Sci.*, v.58, p.248-256, 1975.

FORAN, A.L., GAY, J.M., HANCOCK, D.D., GAY, C.C. Fetal loss frequency in ten Holstein dairy herds. *Theriogenology*, v.45, p. 1505-1513, 1996.

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

FORTUNE, J.E., RIVERA, G.M., EVANS, A.C.O., TURZILLO, A.M. Differentiation of Dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol. Reprod.*, v.65, p.648-654, 2001.

FRICKE, P.M., GUENTHER, J.N., WILTBANK, M.C. Efficacy of decreasing the dose of GnRH used in a protocol for synchronization of ovulation and timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v. 50, p. 1275-1284, 1998.

GINTHER, O.J., Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60, p.61-79, 2000.

GINTHER, O.J., BEG, M.A., BERGFELT, D.R., DONADEU, F.X., KOT, K. Follicle selection in monovular species. *Biol. Reprod.*, v.65, p. 638-647, 2001.

GINTHER, O.J., BERGFELT, D.R., KULICK, L.J., KOT, K. Pulsatility of systemic FSH and LH concentrations during follicular wave development in cattle. *Theriogenology.*, v. 50, p. 507-519, 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., FRICKE, P.M., GIBBONS, J.R., KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.*, v.55, p. 1187-1194, 1996.

GUIBAULT, L.A., ROY, G.L., GRASSO, F., MATTON, P. Influence of pregnancy on the onset of oestrus and luteal function after prostaglandin-induced luteolysis in cattle. *J. Reprod. Fertil.* v. 84, p. 461, 1990.

HALL, J.G., BRANTON, C., STONE, E.J. Estrus, estrus cycles, ovulation time, time of service and fertility of dairy cattle in Louisiana. *J. Dairy Sci.*, v.42, p.1086-1094, 1959.

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

HARRISON, R.O., FORD, S.P., YOUNG, J.W., CONLEY, A.J., FREEMAN, A.E. Increased milk production versus reproductive and energy status of high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.73, p.2749-2758, 1990.

HEERSCHE, G., NEBEL, R.L. Measuring efficiency and accuracy of detection of estrus. *J. Dairy Sci.*, v.77, p.2754-2761, 1994.

HUNTER, R.H.F., WILMUT, I. The rate of functional sperm transport into the oviducts of mated cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.5, p.167-173, 1983.

IRELAND, J.J., ROCHE, J.F. Effect of progesterone on basal LH and FSH secretion on heifers. *J. Reprod. Fertil.*, v.64, p.295-302, 1982.

JACKSON, P.S., ESSLEMONT, R.L., BAILIE, J.H. Subsequent fertility following cloprostenol induced luteolysis in the bovine. *Veterinary Record*, v. 112, p. 153-154, 1983.

JEMMESON, A. Synchronizing ovulation in dairy cows with either two treatments of gonadotropin-releasing hormone and one of prostaglandin, or two treatments of prostaglandin. *Aust. Vet. J.*, v.78, v.78, p.108-111, 2000.

JOBST, S.M., NEBEL, R.L., MCGILLIARD, M.L., PELZER, K.D. Evaluation of reproductive performance in lactating dairy cows with prostaglandinF2 α , gonadotropin-releasing hormone, and timed artificial insemination. *J. Dairy Sci.*, v.83, p.2366-2372, 2000.

KAIM, M., BLOCH, A., WOLFENSON, D., BRAW-TAL, ROSEMBERG, M., VOET, H., FOLMAN, Y. Effects of GnRH administered to cows at the onset of estrus on timing of ovulation, endocrine responses, and conception. *J. Dairy Sci.*, v.86, p.2012-2021, 2003.

KANEKO, H., TAYA, K., WATANABE, G., NOGUSHI, J., KIKUCHI, J., SHIMADA, A., HASEGAWA, Y. Inhibin is involved in the suppression of FSH secretion in the growth phase of the dominant follicle during the early luteal phase in cows. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v.14(4), p. 263-271, 1997.

KHARCHE, S.D., DUTT TRIVENI, ANSARI, M.R., MOHANTY, T.K., MAJUMDAR, A., TANEJA, V.K. Estrus synchronization and superovulation response with pmsg in crossbred cows. *Indian J. Anim. Sci.*, v. 66, p. 49-51, 1996.

KASTELC, J.P., KNOFF, L., GINTHER, O.J. Effect of day of prostaglandin F₂alpha treatment on selection and development of ovulatory follicle in heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, v.23, p.169-180, 1990.

KASTELIC, J.P., MAPLETOFT, R.J. Ovarian follicular responses in dairy cows treated with GnRH and cloprostenol. *Can. Vet. J.*, v.39, p.107-109, 1998.

KIRBY, C.J., SMITH, M.F., KEISLER, D.H., LUCY, M.C. Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained-release bovine somatotropin. *J. Dairy Sci.*, v.80, p.273-285, 1997.

KOTWICA, J., BOGACKI, M., REKAWIECKI, R. Neural regulation of the bovine corpus luteum. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v. 5341, p; 1-10, 2002.

KRISANS, S.K. Cell compartmentalization of cholesterol biosynthesis. Annual NY Academic Science. v. 804, p.142-164,1996.

LANE, E.A.; AUSTIN, E.J.; ROCHE, J.F.; CROWE, M.A. The effect of estradiol benzoate or a synthetic gonadotropin-releasing hormone used at the start of a progesterone treatment on estrus response in cattle. *Theriogenology*, v.56, p.79-90, 2001.

LEBLANC, S.J., LESLIE, K.E., GEELEN, H.J., KELTON, D.F., KEEFE, G.P. Measures of estrus detection and pregnancy in dairy cows after administration of gonadotropin-releasing hormone within an estrus synchronization program based on prostaglandinF2 α . *J. Dairy Sci.*, v.81, p.375-381, 1998.

LEMASTER, J.W., YELICH, J.V., KEMPFER, J.R., FULLENWINDER, J.K., BARNETT, C.L., FANNING, M.D., SELPH, J.F. Effectiveness of GnRH plus prostaglandinF2 α for estrus synchronization in cattle of *Bos indicus* breeding. *J. Anim. Sci.*, v.79, p.309-316, 2001.

LEVY, N., KOBAYASHI, S., ROTH, Z., WOLFENSON, D., MIYAMOTO, A., MEIDAN, R. Administration of prostaglandinF2 α during the early bovine luteal phase does not alter the expression of ET-1 and its type A receptor: a possible cause for corpus luteum refractoriness. *Biol. Reprod.*, v, 63, p. 377-382, 2000.

LIEBERMANN, J., SCHAMS, D. Actions of somatotrophin on oxytocin and progesterone release from the microdialysed bovine corpus luteum in vitro. *Journal of Endocrinology*, v. 143, p. 243-250, 1994.

LOPEZ-GATIUS, F., LOPÉZ-BÉJAR, M. Reproductive performance of dairy cows with ovarian cysts after different GnRH and cloprostenol treatments. *Theriogenology*, v.58, p.1337-1348, 2002.

LUCEY, S., ROWLANDS, G.J., RUUSEL, A .G., The association between lameness and fertility in dairy cows. *Vet. Rec.*, v.118, p.628-631, 1986.

LUCY, M.C., COLLIER, R.J., KITCHELL, M.L., DIBNER, J.J., HAUSER, S.P., KRIUI, G.G. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. *Biol. Reprod.*, v. 48, p. 1219-1227, 1993.

LUCY, M.C. Reproductive loss in high producing dairy cattle: where will it end? *J Dairy Sci.*, v.84, p. 1277-1293, 2001.

LUCY, M.C., CURRAN, T.L., COLLIER, R.J., COLE, W.J. Extended function of the corpus luteum and earlier development of the second follicular wave in heifers treated with bovine somatotropin. *Theriogenology*, v.41, p. 561-572, 1994.

LUCY, M.C., SAVIO, J.D., BADINGA, L., DE LA SOTA, R.L., THATCHER, W.W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J. Anim. Sci.*, v. 70, p. 3615-3626, 1992a.

LUCY, M.C., STAPLES, C.R., THATCHER, W.W., ERICKSON, P.S., CLEALE, R.M., FIRKINS, J.L., CLARK, J.H., MURPHY, M.R., BRODIE, B.O., Influence of diet composition, dry-matter intake, milk production and energy balance on time of post-partum ovulation and fertility in dairy cows. *Anim. Prod.*, v.54, p.323-331, 1992b.

MACMILLAN, K.L., SEGWAGWE, B.V.E., PINO, C.S. Associations between the manipulation of patterns of follicular development and fertility in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.78, p. 327-344, 2003.

MACMILLAN, K.L., THATCHER, W.W. Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol. Reprod.*, v.45, p. 883-889, 1991.

MANN, G.E., LAMMING, G.E. Relationship between the maternal endocrine environment, early embryo development and the inhibition of the luteolytic mechanism in the cow. *Reproduction*, v.121, p.175-180, 2001.

MEE, M.O., STEVENSON, J.S., SCOBY, R.K., FOLMAN, Y. Influence of gonadotropin-releasing hormone and timing of insemination relative to estrous on pregnancy rates of dairy cattle at first service. *J. Dairy Sci.*, v.73, p.1500–1507, 1990.

MIHM, M., DELATANG, F., ROCHE, J.F. The gonadotrophin and ovarian responses to an intermediate or low dose of gonadorelin in beef heifers: influence of dose, follicle status and progesterone environment. *J. Reprod. Fertil.*, Abst. Ser. v.21, p.74, 1998.

MIHN, M., CROWE, M.A., KNIGHT, P.G., AUSTIN, E.J. Follicle wave growth in cattle. *Reprod. Domest. Anim.*, v.37, 0.191-2000, 2002.

MILVAE, R.A., HINCKLEY, S.T., CARLON, J.C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. *Theriogenology*, v. 45, p. 1327-1349, 1996.

MIYAMOTO, A. Intraluteal mechanisms involved in prostaglandin F_{2α}-induced luteolysis in Ewes. *J. Reprod. Devel.*, v.42, suppl, p.61-63, 1996.

MOMONT, H.W. Influence of day of estrous cycle on response to PGF_{2α} products: implications for AI programs for dairy cattle. Proc. Int. Cong. Anim. Reprod. Animal Reproduction Science, v.28, n.3, p.327, 1992.

MONCILOVIC, D., ARCHBALD, L.F., WALTERS, A., TRAN, T., KELBERT, D., RISCO, C. et al. Reproductive performance of lactating dairy cows treated with gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and/or prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) for synchronization of estrus and ovulation. *Theriogenology*, v.50, p.1131-1139, 1998.

MOREIRA, F., De La SOTA, R.L.; DIAZ, T.; THATCHER, W.W. Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. *J. Anim. Sci.*, v.78, p.1568-1576, 2000a.

MOREIRA, F., BADINGA, L., BURNLEY, C., THATCHER, W.W. Effects of bovine somatotropin on embryo transfer in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v.55, p.367 (abst.), 2001.

MOREIRA, F., RISCO, C., PIRES, M.F.A., AMBROSE, J.D., DROST, M., DELORENZO, M., THATCHER, W.W. Effect of body condition on reproductive efficiency of lactating dairy cows receiving a timed insemination. *Theriogenology*, v.53, p.1305-1319, 2000b.

MURPHY, B. D. Models of Luteinization. *Biol. Reprod.*, v. 63, p. 2-11, 2000.

MURPHY, M.G., ENRIGHT, W.J., CROWE, M. A., MCCONNELL, K., SPICER, L.J., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F. Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. *J. Reprod. Fertil.*, v.92, p.333-338, 1991.

NAKAO, T., TOMITA, M., KANBAYASHI, H., TAKAGI, H., ABE, T., TAKEUCHI, Y., OCHIAI, H., MORIYOSHI, M., KAWATA, K. Comparisons of several dosages of a GnRH analog with the standard dose of HCG in the treatment of follicular cysts in dairy cows. *Theriogenology*, v.38, p. 137-145, 1992.

NEBEL, R.L., MCGILLIARD. Interactions of high milk yield and reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.76, p.3257-3268, 1993.

NISWENDER, G. D., Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction*, v. 123, p. 333-339, 2002.

NISWENDER, K.D., BRADEN, T.D., NISWENDER, G.D. Nuclear changes in ovine luteal cells in response to PGF₂ α . Sawyer, H.R., *Dom. Anim. Endoc.*, v.7, n. 2, p. 229-238, 1990.

NISWENDER, G. D., JUENGEL, J.L., SILVA, P.J., ROLLYNSON, M.K., MCINTUSH, E.W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol. Rev.*, v. 80 (1), p.1-29, 2000.

OHTANI, M., KOBAYASHI, S., MIYAMOTO, A.; HAYASHI, K., FUKUI, Y. Real-time relationships between intraluteal and plasma concentrations of endothelin, oxytocin, and progesterone during prostaglandinF2 α - induced luteolysis in the cow. *Biol. Reprod.*, v.58, p. 103-108, 1998.

OSAWA, T.; NAKAO, T.;KIMURA, M. et al. Fertirelin and Buserelin compared by LH release, milk progesterone and subsequent reproductive performance in dairy cows treated for follicular cysts. *Theriogenology*, v.44, p.835-847, 1995.

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

PANKOWSKI, J.W., GALTON, D.M., ERB, H.N., GUARD, C.L., GROHN, Y.T. Use of prostaglandin F2 α as a postpartum reproductive management tool for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.78, p.1477-1488, 1995.

PARR, R.A.,DAVIS, I.F., FAIRCLOUCH, R.J., MILES, M.A. Overfeeding during early pregnancy reduces peripheral progesterone concentration and pregnancy rate in sheep. *J. Reprod. Fertil.*, v.80, p.317-320, 1987.

PARR, R.A., DAVIS, I.F., MILES, M.A., SQUIRES, T.J. Feed intake affects metabolic clearance rate of progesterone in sheep. *Res. Vet. Sci.*, v.55, p.306-310, 1993a.

PARR, R.A., DAVIS, I.F., MILES, M.A., SQUIRES, T.J. Liver blood flow and metabolic clearance rate of progesterone in sheep. *Res. Vet. Sci.*, v.55, p.311-316, 1993b.

PATE, J.L. Cellular components involved in luteolysis. *J. Anim. Sci.*, v. 72, p. 1884-1890, 1994.

PATE, J.L. Intercellular communication in the bovine corpus luteum. *Theriogenology*, v. 45, p. 1381-1397, 1996.

PAUL, V., PRAKASH, B.S. Efficacy of the "Ovsynch" protocol for synchronization of ovulations and fixed-time artificial insemination in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.64, p.1049-1060, 2005.

PETERS, M.W., PURSLEY, J.R. Fertility of lactating dairy cows treated with "Ovsynch" after pre-synchronization injections of PGF 2α and GnRH. *J. Dairy Sci.*, v.85, p.2403-2406, 2002.

POSTON, H.A., ULBERG, L.C., LEGATES, J.E. Analysis of seasonal fluctuations of reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.45, p.1376-1382, 1962.

PURSLEY, J.R., GUENTHER, J.N., WILTBANK, M.C. Synchronization of ovarian function using two injections of GnRH. THE 13TH INT. CONG. ANIM. REPROD., p. 19-12 (abstr.), 1996.

PURSLEY, J.R., MEE, M.O., WILTBANK, M.C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF 2α and GnRH. *Theriogenology*, v.44, p. 915-23, 1995.

PURSLEY, J.R., KOSOROK, M.R., WILTBANK, M.C. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J. Dairy. Sci.*, v.80, p.301-306, 1997a.

PURSLEY, J.R., SILCOX, R.W., WILTBANK, M.C. Effect of time artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.81, p.2139-2144, 1998.

PURSLEY, J.R., WILTBANK, M.C., STEVENSON, J.S., OTTOBRE, J.S., VARVERICK, 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, 1997b.

QUIRK, S.M., HICKEY, G.J., FORTUNE, J.E. Growth and regression of ovarian follicles during follicular phase of the estrous cycle in heifers undergoing spontaneous and PGF 2α -induced luteolysis. *J. Reprod. Fertil.*, v. 77, p. 211-219, 1986.

RAO, C.V., ESTERGREEN, F.R., CARMAN, JR., MOSS, G.E. Receptors for Gonadotrophin and Prostaglandin F 2α In Bovine Corpora Lutea Of Early, Mid And Late Luteal Phase. *Acta Endocrinol.*, v.91, p.529, 1979.

REDMER, D.A., GRAZUL-BILSKA, A.T., REYNOLDS, L.P. Contact-dependent intercellular communication of bovine luteal cells in culture. *Endocrinology*, v. 129, p.2757-2766, 1991.

REDMER, D.A., REYNOLDS, L.P. Angiogenesis in the ovary. *Rev. Reprod.*, v. 1, p.182-192, 1996.

RETTMER, I.; STEVENSON, S.; CORAH, R.L. Pregnancy rates in beef cattle after administering a GnRH agonist 11 to 14 days after insemination. *J. Anim. Sci.*, v.70, p.7-12, 1992.

REVAH, I., BUTLER, W.R. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, v.106, p.39-47, 1996.

RIBEIRO JÚNIOR, I. *Análises estatísticas no SAEG*. Viçosa-MG. UFV, 2001. 301p.

ROBERSON, M.S., WOLFE, M.W., STUMPF, T.T., KITOK, R.J., KINDER, J.E. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. *Biol. Reprod.*, v.41, p.997-1003, 1989.

ROCHE, J.F., AUSTIN, E.J., RYAN, M., O'ROURKE, M., MIHM, M., DISKIN, M.G. Regulation of follicle waves to maximize fertility in cattle. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl., v.54, p.61-71, 1999.

ROY, G.L., TWAGIRAMUNGU, H. A fixed time AI program using the GnRH-PGF 2α -

GnRH method for beef females. *J. Anim. Sci.*, v.74 (Suppl 1), p.122, Abst., 1996.

RUTLEDGE, J.J. Twinning in cattle. *J. Anim. Sci.*, v.40, p.803-813, 1975.

RYAN, D.P., BOLAND, M.P. Frequency of twins births among Holstein-Frisian cows in a warm dry climate. *Theriogenology*, v.36, p.1-10, 1991.

RYAN, M., MIHN, M., ROCHE, J.F. Effect of GnRH given before or after dominance on gonadotrophin response and fate of that follicle wave in postpartum cows. *J.Reprod. Fertil.*, Abst. Ser., v.21, p.61, 1998.

SAKAMOTO, K., EZASHI, T., OKUDA-ASHITAKA, E., OKUDA, K., HOUTANI, T., SUGIMOTO, T., ITO, S., HAYAISHI, O. Molecular cloning and expression of a DNAC of the bovine Prostaglandin F₂ α receptor. *J. Biol. Chem.*, v.269, p. 3881-3886, 1994.

SAKAMOTO, K., MIWA, K., EZASHI, T., OKUDA-ASHITAKA, E., OKUDA, K., HOUTANI, T., SUGIMOTO, T., ITO, S., HAYAISHI, O. Expression of mRNA encoding the prostaglandinF₂ α receptor in bovine corpora lutea throughout the oestrous cycle and pregnancy. *J. Reprod. Fertil.*, v. 103, p. 99-105, 1995.

SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2^aed. Belo Horizonte. FUNDAÇÃO DE ENSINO E PESQUISA EM MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA. 2002. 263p.

SARTORI, R., FRICKE, P.M., FERREIRA, J.C.P., GINTHER, O.J., WILTBANK, M.C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol. Reprod.*, v. 65, p.1403-1409, 2001.

SAUERWIEN H., MIYAMOTO, A., GUNTHER, J., MEYER, H.D., SCHAMS, D. Binding and action of insulin-like growth factors and insulin in bovine luteal tissue during the oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil.*, v. 96, p.103-115, 1992.

SAVIO, J.D., THATCHER, W.W., BADINGA, L., DE LA SOTA, R.L., WOLFENSON, D. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *J.*

Reprod. Fertil., v.97, p.197-203, 1993.

SCHIMITT, 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. 2745-2753, 1994.

SEGWAGWE, B.V.E. *The effect of GnRH or estradiol benzoate on follicular dynamics and ovulation as well as the treatment of postpartum anoestrus in Holstein cows.* M.V.Sc. Thesis, University of Melbourne.

SEGUIN, B.E., CONVEY, E.M., OXENDER, W.D. Effect of gonadotropin-releasing hormone and human chorionic gonadotropin on cows with ovarian follicular cysts. *Am. J. Vet. Res.*, v.37, p.153-157, 1976.

SHEPHARD, R. Investigation of a whole-herd controlled breeding program using GnRH and prostaglandin in commercial seasonally-calving dairy herds. *Aust. Cattle Vet.*, v.23, p.24-28, 2002.

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 abst., 1995.

SILKE, V., DISKIN, M.G., KENNY, D.A ., BOLAND, M.P., DILLON, P., MEE, J.F., SREENAN, J.M. Extent, pattern and factors associated with late embryonic loss in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.71, p.1-12, 2002.

SMITH, M.W., STEVENSON, J.S. Fate of the dominant follicle, embryonal survival, and pregnancy rates in dairy cattle treated with prostaglandinF 2α and progestins in the absence or presence of a functional corpus luteum. *J. Anim. Sci.*, v.73, p.3743-3751, 1995.

SPINOSA, H.S., GÓRNIAK, S.L., BERNARDI, M.M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 1ª ed. GUANABARA KOOGAN, 1997. 545p.

STEVENSON, J.S., CALL, E.P. Influence of early estrus, ovulation, and insemination on fertility in postpartum Holstein cows. *Theriogenology*, v.19, p.367-375, 1983.

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 prostaglandinF2 α . *J Dairy Sci.*, v. 82, p.506-515, 1999.

STEVENSON, J.S., KOBAYASHI, Y., SHIPKA, M.P., RAUCH-HOLTZ, K.C. Altering conception of dairy cattle by gonadotropin-releasing hormone preceding luteolysis induced by prostaglandinF2 α . *J. Dairy. Sci.*, v. 79, p. 402-410, 1996.

STEVENSON, J.S., SCHMIDT, M.K., CALL, E.P. Stage of estrous cycle, time of insemination, and seasonal effects on estrus and fertility of Holstein heifers after prostaglandin F2 α . *J. Dairy Sci.*, v.67, p.1798-1805, 1984.

STOCK, A.E., FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology*, v. 132, p.1108-1114, 1993.

SWAN, R.T., BRUCE, N.W. Oxygen consumption, carbon dioxide production and progesterone secretion in the intact rat ovary of the day-16 pregnant rat. *J. Reprod. Fertil.* v. 30, p.599-605, 1987.

TANABE, T.Y., HANN, R.C. Synchronized estrus and subsequent conception in dairy heifers treated with prostaglandinF2 α . I. influence of stage of cycle at treatment. *J. Anim. Sci.*, v. 58, p. 805-811, 1984.

TAPONEN, J., KULCSAR, M., HATILA, T., KATAI, L., HUSZENIZA, G., RODRIGUES-MARTINEZ, H. Short oestrous cycles and oestrus signs after

premature ovulations induced with cloprostenol and gonadotrophin[releasing hormone in cyclic dairy cows. *Theriogenology*, v.58, p.1291-1302, 2002.

TEFERA, M., CHAFFAUX, S., THIBIER, M., HUMBLLOT, P. A short note: Lack of effect of post Ai hCG or GnRH treatment on embryonic mortality in dairy cattle. *Liv. Prod. Sci.*, v.71, p.277-281, 2001.

TENHAGEN, B.A., DRILLICH, M., HEUWIESER, W. Analysis of cow factors influencing conception rates after two timed breeding protocols. *Theriogenology*, v.56, p.831-838, 2001.

TENHAGEN, B.A., SURHOLT, R., WITKE, M., VOGEL, C., DRILLICH, M., HEUWIESER, W. Use of "Ovsynch" in dairy herds-differences between primiparous and multiparous cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.81, p.1-11, 2004.

THATCHER, W.W. et al. New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 33, p. 27-49, 1993.

THATCHER, W.W., CHENAULT, J.R. Reproductive physiological responses of cattle to exogenous prostaglandin F_{2α}. *J. Dairy Sci.*, v.59, n.7. p. 1366-1375, 1976.

THATCHER, W.W., MACMILLAN, K.L., HANSEN, P.J., DROST, M. Concepts for regulations of corpus luteum function in the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology*, v.31, p.149-164, 1989.

THATCHER, W.W., MOREIRA, F., SANTOS, J.E.P. et al. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology*, v.55, p. 75-89, 2001a.

THATCHER, W.W., MOREIRA, F., PANCARCI, S.M., BARTOLOME, J.A., SANTOS, J.E.P. Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v.23, p.243-254, 2002.

THATCHER, W.W., PATTERSON, D.J., MOREIRA, F., PANCARCI, M., JORDAN, E.R., RISCO, C.A. . Current concepts for estrus synchronization and timed insemination. *Proc. Amer. Assoc. Bov. Pract.*, v.34, p. 95-105. 2001b.

THATCHER, W.W., RISCO, C.A. ., MOREIRA, F. Pratical manipulation oh the estrous cycle in dairy animals. *Proc. Amer. Assoc. Bov. Pract.*, v.31, p. 34-50, 1998.

TSAI, S., WILTBANK, M.C. Prostaglandin $F2\alpha$ induces expression of prostaglandin G/H Synthase-2 in the ovine corpus luteum: a potential positive feedback loop during luteolysis. *Biol. Reprod.*, v.57, p.1016-1022, 1997.

TSAI, S., WILTBANK, M.C. Prostaglandin $F2\alpha$ regulates distinct physiological changes in early and mid-cycle bovine corpora lutea. *Biol. Reprod.*, v. 58, p. 346-352, 1998.

TWAGIRAMUNGU, H., GUIBAULT, L.A., PROULX, J., et al., Influence of an agonist of Gonadotropin-Releasing Hormone (Buserelin) on estrus synchronization and fertility in beef cows. *J. Anim. Sci.*, v.70, p. 1904-10, 1992.

TWAGIRAMUNGU, H., BOUSQUET, D., DUROCHER, J., GUILBAULT, L.A. Effects of estrus synchronization with prostaglandin and GnRH on fertility in dairy recipient heifers. *Theriogenology*, v.45, n.1, p. 229, 1996.

VASCONCELOS, J.L.M. Controle do estro e da ovulação visando a inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de leite. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES. São Paulo - SP, 2000, *Anais...*, Departamento de Reprodução Animal FMVZ-USP, 2000, p.115-157.

VASCONCELOS, J.L.M., SILCOX, R.W., ROSA, G.J.M., et al. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v.52, p.1067-1078,1999.

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

VASCONCELOS, J.L.M., SILCOX, R.W., LACERDA, J.A., PURSLEY, J.R., WILTBANK, M.C. Pregnancy rate, pregnancy loss, and response to heat stress after AI at 2 different times from ovulation in dairy cows. *Biol. Reprod.*, v.56 (Suppl. 1), p.140 (Abstr.), 1997a.

VASCONCELOS, J.L.M., SILCOX, R.W., ROSA, G.J., 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 (Suppl.1), p.148 (Abstr.), 1997b.

VIANA, J.H.M., FERREIRA, A.M., SÁ, W.F., CAMARGO, L.S.A. Regressão luteal e dinâmica folicular após luteólise natural ou induzida por cloprostenol em vacas da raça Gir. *Arq. Brasil. Méd. Vet. Zootec.*, v. 51, n.3, p. 257-262, 1999.

WEBB, R., WOAD, D.G., ARMSTRONG, D.G. Corpus luteum (CL) function: local control mechanisms. *Dom. Anim. Endoc.*, v. 5339, p. 1-9, 2002.

WEHRMAN, M.E., ROBERSON, M.S., CUPP, A. S., KOJIMA, F.N., STUMPF, T.T., WERTH, L.A., WOLFE, M.W., KITTOCK, R.J., KINDER, J.E. Increasing exogenous progesterone during synchronization of estrus decreases endogenous 17β estradiol and increases conception in cows. *Biol. Reprod.*, v.49, p.214-220, 1993.

WILTBANK, M.C. Information on regulation of reproductive cyclicity in cattle. *Proc. Amer. Assoc. Bov. Pract.*, v.31, p. 26-33, 1998.

WILTBANK, M.C., PURSLEY, J.R., FRICKE, P.M., VASCONCELOS, J. et al. Development of AI and ET programs that do not require detection of estrus using recent information on follicular growth. In: ANNUAL CONVENTION PORTLAND, 15, 1996. Oregon. Proceedings. Oregon: American Embryo Transfer Association, p.23-44, 1996.

WILTBANK, M.C., SHIAO, D.R., GINTHER, O.J. ProstaglandinF2 α Receptors in the early bovine corpus luteum. *Biol. Reprod.*, v. 52, p. 74-78, 1995.

WOLFENSON, D., THATCHER, W.W., SAVIO, J.D., BADINGA, L., LUCY, M.C. The effect of a GnRH analogue on the dynamics of follicular development and synchronization of estrus in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v.42, p.633-644, 1994.

WOLFENSON, D., THATCHER, W.W., BADINGA, L., SAVIO, J.D., MEIDAN, R., LEW, B.J., BRAW-TAL, R., BERMAN,A. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biol. Reprod.*, v.52, p.1106-1113, 1995.

XU, Z.Z., GARVERICK, H.A., SMITH, G.W., SMITH, M.F., HAMILTON, S.A., YOUNGQUIST, R.S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol. Reprod.*, v.53, p.951–957, 1995.

YAMADA, K. Development of ovulation synchronization and fixed time artificial insemination in dairy cows. *J. Reprod. Devel.*, v.51, n.2, 2005.

YAMADA, K., NAKAO, T., NAKADA, K., MATSUDA, G. Influence of GnRH analogue (fertiorelin acetate) doses on synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in lactating dairy cow. *Anim. Reprod. Sci.*, v.74, p.27-34, 2002.

YOUNGQUIST, R.S., BIERSCHWAL, C.J. Clinical management of reproductive problems in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 68, p. 2817-2826, 1985.

YUAN, W., BAO, B., GARVERICK, H.A., YOUNGQUIST, R.S., LUCY, M.C. Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, and IGF binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. *Dom. Anim. Endoc.*, v.15, p.55-63, 1998.

ZAR, J.H. *Biostatistical Analysis*. Englewood Cliffs, Prattice Hall, 1984, 718p.

9 - Apêndice

Especificações do aparelho de ultra-sonografia utilizado

| Item | Sub-ítem | Descrição |
|------------------------|---------------------|---|
| Marca | | Pie Medical |
| Modelo | | Scanner 100 LC |
| Sistema | | Varredura em tempo real |
| Métodos de varredura | | Eletrônica linear multifocal Eletrônica Convexa multifocal |
| Transdutor | Frequência | Bi-frequencial 6 e 8 MHz – mudança automática |
| | Campo de visão | 70 x 150 mm |
| | Cabo | Aprox. 2m com controle incorporado |
| Modo de operação | | B, B+M, M, B+B |
| Processamento do sinal | Ganho total | Ajuste manual |
| | Ganho distal | Ajuste manual |
| | Ganho proximal | Ajuste manual |
| | Escalas de cinza | 256 pontos |
| | Ampliação imagem | 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0 vezes |
| | Congelamento | Ativo em qualquer modo |
| | Foco | 1 a 4 pontos focais variáveis |
| Apresentação da imagem | Monitor | 9 polegadas |
| | Orientação | Horizontal ou vertical |
| | Sinal | Positivo ou negativo |
| | Processamento | 4 curvas gamma |
| Sistema de mensuração | Marcadores | 4 pares |
| | Tipos de mensuração | de Distância, área, elipse, circunferência, volume etc. |
| | Software | Múltiplas funções: tabelas de cálculos pré-definidos por espécie. |
| | Escalas | Vertical e/ou horizontal |
| Inclusão de dados | | Teclado alfanumérico (opcional) ou identificação manual |
| Gravação de imagens | | Disquetes de 3½ polegadas |
| Saídas/entradas | | VTR, vídeo, impressora, pedal |
| Alimentação | | 120 V ou bateria 12V recarregável |
| Dimensões | | 33x45x29 (altura x profund.x largura) |
| Peso | | 11kg (sem bateria) |