

Sincronização do estro e da ovulação utilizando protocolos de curta duração durante a pré-estação reprodutiva em ovelhas Suffolk

Luciana Takada^{1*}, Sony Dimas Bicudo², Carlos Frederico de Carvalho Rodrigues³, Lia de Alencar Coelho¹ e Silvia Helena Venturolli Perri⁴

¹Departamento de Qualidade e Produtividade Animal, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Av. Duque de Caxias Norte, 225, 13635-900, Pirassununga, São Paulo, Brasil. ²Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, São Paulo, Brasil. ³Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Itapetininga, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento, Itapetininga, São Paulo, Brasil. ⁴Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araçatuba, São Paulo, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: lutakada@gmail.com

RESUMO. Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a eficácia do protocolo de curta duração de sincronização do estro. As ovelhas foram divididas em quatro grupos: Grupo Controle (esponjas de MAP por 12 dias, e eCG na retirada); Os Grupos I, II e III permaneceram com a esponja por quatro dias e na retirada foi aplicado 100 µg de PGF e adicionalmente: no Grupo I (0,1 mg de Benzoato de estradiol - BE na colocação da esponja e 48h após a retirada 50 µg de GnRH); Grupo II (35 mg de progesterona injetável e 0,1 mg de BE na colocação da esponja e na retirada 400 UI de eCG e 50 µg de GnRH 48h após); Grupo III (35 mg de progesterona injetável e 0,2 mg de BE na colocação da esponja e na retirada 400 UI de eCG e 50 µg de GnRH 56h após). Foram feitos exames de ultrassom, dosagens de progesterona, e observações do início do estro e da ovulação. A falta do eCG no Grupo I fez com que esse protocolo fosse menos eficaz na indução e sincronização do estro e ovulação. O Grupo Controle teve maior sincronia do estro e da ovulação.

Palavras-chave: Benzoato de estradiol, eCG, GnRH, progesterona, ultrassonografia.

ABSTRACT. Estrus and ovulation synchronization using short-term protocols during the previous reproductive season in Suffolk ewes. This study was carried out with the objective of examining the effect of the short-term estrus synchronization protocol. Ewes were divided in four groups: Control Group (MAP sponges for 12 days, and eCG at withdrawal); Groups I, II and III used the sponge for four days, and 100 µg of PGF was applied at withdrawal; and additionally, Group I (0.1 mg of Estradiol benzoate - EB, in the sponge placement, and in the withdrawn 400 UI of eCG and 50 µg of GnRH 48h later); Group II (35 mg of injectable progesterone and 0.1 mg of EB in the sponge placement, and 400 UI of eCG at withdrawal, and 50 µg of GnRH 48h after); Group III (35 mg of injectable progesterone and 0.2 mg of EB in the sponge placement, and 400 UI of eCG at withdrawal, and 50 µg of GnRH 56h after). Exams were accomplished for ultrasound and determine the plasmatic concentrations of progesterone and observations of the beginning the estrus and the ovulation. The lack of eCG in Group I caused this protocol to be less efficacious in induction and synchronization of estrus and ovulation. The Control Group had a greater synchronization of estrus and ovulation.

Key words: Estradiol benzoate, eCG, GnRH, progesterone, ultrasound.

Introdução

O desempenho reprodutivo dos ovinos é um dos principais fatores responsáveis pelos lucros obtidos com a produção de leite, lã ou de carne. A capacidade do pecuarista em sincronizar as cobrições e os partos resulta em enormes benefícios para o gerenciamento e viabilidade econômica do sistema de produção adotado (GONZÁLEZ-BULNES et al., 2005).

A sincronização do estro em ovelhas visando à

interrupção da estação de anestro ou a intensificação do manejo é indispensável na utilização da inseminação artificial em momento pré-fixado, com ou sem a observação das manifestações estrais (MORAES et al., 2002).

O controle da vida do corpo lúteo ou a manipulação da concentração da circulação de progesterona permite a regulação do ciclo estral e da ovulação (HANSEL; CONVEY, 1983). Progestágenos por 12 a 14 dias são amplamente utilizados na sincronização do estro em ovelha, apresentando, na

maioria das vezes, mais de 90% de ovelhas em estro dentro de um período de 24h, e com uma taxa de concepção de 70 a 80% (GORDON, 1997; EVANS et al., 2001). Esse método leva à diminuição sincrônica de progesterona, porém com o momento de ovulação variável, dependendo do estágio de desenvolvimento do folículo no momento em que o progestágeno é removido (ROCHE et al., 1999).

A utilização de gonadotrofinas é rotineiramente associada aos sistemas de sincronização que utilizam dispositivos intravaginais em ovelhas anovulatórias, para induzir a ovulação (BARRETT et al., 2004; ALI, 2007). A substância mais utilizada é a eCG (gonadotrofina coriônica equina), em que a administração no final do tratamento com progestágenos em ovelhas, pode compensar os efeitos deletérios do tratamento longo com progestágenos na dinâmica folicular recrutando novos folículos (NOEL et al., 1994), e diminuindo o problema da baixa fertilidade durante o anestro estacional (BOLAND et al., 1978; ZELEKE et al., 2005).

Ungerfeld e Rubianes (2002) e Ustuner et al. (2007) concluíram que protocolo de curta duração, utilizando diferentes progestágenos e eCG, foi eficaz na sincronização do estro durante e fora da estação reprodutiva.

Rubianes e Menchaca (2003) avaliaram o efeito do tratamento com progestágeno por um curto período em cabras de leite cíclicas, o protocolo consistiu na inserção de um CIDR (*Controlled Internal Drugs Release*) por cinco dias, PGF_{2α} no início do tratamento e eCG na retirada do CIDR. Os resultados demonstraram que a utilização de progestágenos por um curto período assegura a presença de folículos grandes e jovens disponíveis no momento da ovulação na maioria das cabras.

Em experimentos em que nos protocolos foi administrado estradiol exógeno foi observado efeito no desenvolvimento folicular (ENGELHART et al., 1989) mostrando regressão dos folículos após tratamento. Semelhantemente, Bo et al. (1995; 2000) notaram supressão do crescimento do folículo dominante, em novilhas, após o tratamento com estradiol e implante auricular de progestágenos.

O estradiol diminui a amplitude dos pulsos de LH em ovelhas (RAWLINGS et al., 1984) e vacas (PRICE; WEBB, 1988; PORTELA JUNIOR et al., 2003). A progesterona ou implantes de progestágenos em vacas diminui a frequência dos pulsos de LH, regredindo o folículo dominante de maneira dose-dependente (STOCK; FORTUNE, 1993; MORAES et al., 2002). Estes hormônios têm sido utilizados para sincronizar a emergência da onda folicular em vacas (BO et al., 1995; 2000).

Estudos realizados por Meikle et al. (2001), ao administrarem uma ou duas vezes estradiol, em ovelhas, observaram os mesmos resultados.

Barrett et al. (2008) avaliaram o efeito do estradiol-17 β (E₂) na sincronização da onda de crescimento folicular em ovelhas em anestro, e observaram que ao ser associado o E₂ ao progestágeno (MAP), a emergência da onda de crescimento folicular foi sincronizada e, a aplicação de eCG no final do protocolo de MAP e E₂ melhorou a sincronização da ovulação.

A realização deste estudo visa avaliar a eficácia de protocolos de curta duração utilizando estrógeno para a indução/sincronização do estro e ovulação, através das concentrações plasmáticas de progesterona e das observações dos momentos do estro e da ovulação, no início da estação reprodutiva em ovelhas Suffolk.

Material e métodos

Local e animais experimentais

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Reprodução de Ovinos e Caprinos da FMVZ-Unesp de Botucatu, em latitude de 22°S, na pré-estação reprodutiva, de outubro a dezembro de 2002. Foram utilizadas 42 fêmeas ovinas da raça Suffolk, com peso corporal de 40 a 80 kg, com idades de dois a sete anos, e um macho vasectomizado, em que o animal não foi colocado ao mesmo tempo com as 42 fêmeas, pois havia protocolos com diferentes durações. Todos os animais experimentais foram previamente examinados quanto ao estado clínico geral, sanitário e reprodutivo.

Após período de adaptação, os animais permaneceram em baias de 3 x 3 m, sob luminosidade natural, e receberam água e sal mineral “ad libitum”, alfafa pré-murchada como volumoso e sal proteinado especialmente formulado para ovinos (Nutrumin[®]) na proporção de 200 g cabeça⁻¹ dia⁻¹.

Indução e sincronização do estro

Os animais foram divididos em grupos de acordo com o tipo de tratamento:

Grupo Controle (n = 12): utilizou-se esponja vaginal impregnada com 60 mg de Acetato de medroxiprogesterona (Evigest[®]-Agribands) que permaneceu inserida por 12 dias. No dia da retirada das esponjas foi aplicado por via Intramuscular (i.m.) 400 UI de eCG - Gonadotrofina sérica equina, Folligon[®] - Intervet (DIAS et al., 2001).

Grupo I (n = 6): utilizou-se esponja vaginal impregnada com 60 mg de Acetato de medroxiprogesterona (Evigest[®]-Agribands) que

permaneceu inserida por quatro dias. No dia da colocação da esponja foi aplicado i.m. de 0,1 mg de BE (Benzoato de estradiol, Estrogin[®]-Farmavet). Na retirada da esponja administrou-se via i.m. 100 µg de PGF_{2α} (D-Cloprostenol sódico, Preloban[®]-Intervet). Decorridas 48h da retirada da esponja, foi aplicado via i.m. 50 µg de GnRH (Gonadorelina, Fertagil[®]-Intervet).

Grupo II (n = 12): utilizou-se esponja vaginal impregnada com 60 mg de Acetato de medroxiprogesterona (Evigest[®]-Agribands) que permaneceu inserida por quatro dias. No dia da colocação da esponja foi administrado via i.m. 35 mg de progesterona injetável e via i.m. 0,1 mg de BE (Estrogin[®]-Farmavet). Na retirada da esponja aplicou-se via i.m. 400 UI de eCG (Gonadotrofina sérica equina, Folligon[®]-Intervet) e via i.m. 100 µg de PGF_{2α} (D-Cloprostenol sódico, Preloban[®]-Intervet). Decorridas 48h da retirada da esponja, foi aplicado via i.m. 50 µg de GnRH (Gonadorelina, Fertagil[®]-Intervet).

Grupo III (n = 12): utilizou-se esponja vaginal impregnada com 60 mg de Acetato de medroxiprogesterona (Evigest[®]-Agribands) que permaneceu inserida por quatro dias. No dia da colocação da esponja administrou-se via i.m. 35 mg de progesterona e via i.m. 0,2 mg de BE (Estrogin[®]-Farmavet). Na retirada da esponja foi aplicado via i.m. 400 UI de eCG (Folligon[®]-Intervet) e via i.m. 100 µg de PGF_{2α} (D-Cloprostenol sódico, Preloban[®]-Intervet). Decorridas 56h da retirada da esponja, foi aplicado via i.m. 50 µg de GnRH (Gonadorelina, Fertagil[®]-Intervet).

Avaliação ultrassonográfica

Os animais dos quatro grupos avaliados tiveram os ovários monitorados dois dias antes de iniciar o tratamento, com ultrassom B - mode scanner (SSD-500; Aloka Co. Ltda, Japão) equipado com transdutor linear 7,5 MHz (Modelo UST-660-7.5; Aloka Co. Ltda, Japão) desenvolvido para exame transretal de próstata em humanos, mas validado para o presente estudo em ovinos (SCHRICK, et al., 1993; RAVINDRA et al., 1994). Quando a primeira ovelha manifestou estro, o desenvolvimento folicular foi acompanhado a cada 2h até a constatação da ovulação ou até 48h após a aplicação de GnRH em todos os animais do grupo. Nos dias subsequentes, a formação do corpo lúteo foi acompanhada diariamente por ultrassonografia até o 10º dia após a ovulação.

As imagens obtidas de cada folículo ou corpo lúteo quando detectados foram realizadas duas mensurações dos diâmetros para obter-se a média de

cada estrutura. As características observadas foram: início da onda antes da retirada da esponja, diâmetro do folículo na retirada da esponja e na aplicação de eCG, diâmetro máximo do folículo ovulatório e o tamanho máximo atingido pelo corpo lúteo dez dias após a ovulação.

A ovulação foi confirmada quando o folículo ovulatório maior da onda ($\geq 4,5$ mm) não foi mais detectado, com formação do corpo lúteo e concentração média de progesterona ≥ 1 ng mL⁻¹ nos quinto e décimo dias após a ovulação. Após a ocorrência ou não da ovulação, os ovários foram acompanhados diariamente até o décimo dia da formação do corpo lúteo.

Caracterização e cronologia das manifestações de estro

Após a retirada da esponja, as ovelhas permaneceram com um macho vasectomizado (rufião) para detecção do início das manifestações do estro. A cronologia e comportamento sexual das ovelhas foram observados, incluindo a aceitação de monta realizada pelo rufião. Foram consideradas em estro aquelas ovelhas que se mantiveram paradas sob a monta do macho e marcadas pela tinta.

Foi observado o momento de ocorrência do estro, determinando assim o número de animais que apresentaram manifestações de estro. Os intervalos de tempo decorridos entre a retirada da esponja e o início do estro, do estro até a ovulação e da aplicação do GnRH a ovulação também foram observados.

Análise de progesterona

A mensuração das concentrações plasmáticas de progesterona (P₄) visou verificar a condição da atividade cíclica das ovelhas, a confirmação da ocorrência da ovulação e a constatação da funcionalidade do corpo lúteo.

Com a finalidade de determinar a P₄, foram feitas colheitas de sangue das ovelhas de cada grupo, que iniciaram dez dias antes da colocação das esponjas, repetidas no dia da colocação das esponjas, nos quinto e no décimo dias após a ovulação. As amostras de 5 mL de sangue foram obtidas em horário pré-estabelecido no período da manhã, por punção da veia jugular, recolhidas em tubos de vidros heparinizados com sistema a vácuo. As amostras foram centrifugadas a 400 g durante 5 min. para extração do plasma e estocadas a -20°C em alíquotas de 1,0 mL até o momento das análises laboratoriais.

Para determinar a P₄ foram realizadas em um único ensaio, por radimunoensaio (RIA), com a utilização de kits comerciais em fase sólida da DPC (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles,

CA, USA), e contador gama automatizado (Vitek, modelo Kinet Count 48, USA), que forneceram automaticamente os resultados interpolados em ng mL⁻¹. Inseriram-se três repetições, em duplicata, no início meio e fim do processo de análise, de uma amostra-controle (“pool” de plasma), para avaliação de eventual erro intra-ensaio.

Análise estatística

Os animais foram divididos em grupos aleatórios quanto à idade e ao peso, todas as fêmeas eram pluríparas.

Os dados foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias, pré-requisitos necessários para a análise de variância e assim analisados, sendo as médias comparadas por meio do teste de Tukey em nível de significância de 5%.

O dado da variável, início da onda antes da retirada da esponja, foi analisado usando a análise de variância não-paramétrica de Kruskal e Wallis (1952).

O Teste Exato de Fisher foi utilizado para verificar associação entre os grupos avaliados e tempos do estro, ovulação, do estro até a ovulação, e do estro até a aplicação do GnRH.

As análises estatísticas foram efetuadas pelo programa SAS Statistical Analysis System (SAS, 1997; 1999).

Resultados e discussão

A aplicação de 0,1 ou 0,2 mg de estrógeno não sincronizou a emergência de uma nova onda folicular, havendo uma assincronia no início das manifestações do estro e no momento da ovulação nos Grupos Experimentais I, II e III (Tabela 1),

diferente do observado por Meikle et al. (2001) e Barrett et al. (2008) em ovelhas, e por Bo et al. (2000), em novilhas, em que a aplicação de estrógeno, gerou a atresia do folículo dominante, sincronizando a emergência da onda de crescimento folicular e conseqüentemente o estro e a ovulação.

Após a indução e a sincronização do estro, 100% dos animais do Grupo Controle (12/12) e do Grupo II (6/6) manifestaram estro e ovularam. No Grupo I, apenas 25% (3/12) das ovelhas manifestaram estro e 58% (7/12) ovularam. No Grupo III, 100% (12/12) manifestaram estro e 91% (11/12) ovularam, conforme apresentado na Tabela 1.

Estes resultados assemelharam-se aos observados por Hashemi et al. (2006) 100% e Tritschler et al. (1991) 94% de animais em estro após a sincronização do estro com MAP por 12 dias e eCG na retirada da esponja.

A caracterização do início do estro, momento da ovulação, o intervalo do estro à ovulação e do GnRH a ovulação dos Grupos Controle e Experimentais I, II e III estão demonstrados na Tabela 1.

Na retirada da esponja e na aplicação de eCG, o diâmetro do folículo no Grupo Controle foi maior que a do Grupo I, próxima a encontrada por Leyva et al. (1998) e Barrett et al. (2004) em protocolos de longa duração (Tabela 1) e por Letelier et al. (2009) em protocolos de curta duração.

Embora o início da onda antes da retirada da esponja não tenha apresentado diferenças estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os Grupos, os folículos dos animais do Grupo Controle tiveram a emergência da onda antes (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios (média \pm EPM) das características dos momentos do estro e da ovulação durante a sincronização de estro das ovelhas Suffolk dos Grupos Controle e Experimentais (I a III).

Table 1. Mean values (mean \pm EPM) of the characteristics in the moments of the estrus and ovulation during the synchronization of the estrus in Suffolk ewes of the control and experiment groups (I, II and III).

Variável Variable	Grupo Groups			
	Controle Control (n = 12/12)	Experimental I Experiment I (n = 6/12)	Experimental II Experiment II (n = 6/6)	Experimental III Experiment III (n = 11/12)
Início da onda antes da retirada da esponja (dia) Beginning of the wave before sponge withdrawal (day)	-2,08 \pm 0,48 a	-0,71 \pm 0,52 a	-1,33 \pm 0,49 a	-0,27 \pm 0,30 a
Diâmetro do folículo na retirada da esponja (mm) Diameter of the follicle at sponge withdrawal (mm)	4,46 \pm 0,18 a	3,11 \pm 0,35 b	4,15 \pm 0,31 ab	3,53 \pm 0,27 ab
Diâmetro máx. fol. ovul. (mm) Maximum diameter of ovulatory follicle (mm)	5,36 \pm 0,14 b	5,24 \pm 0,13 b	6,39 \pm 0,43 a	5,50 \pm 0,23 b
Ovulação (h) Ovulation (h)	61,50 \pm 1,43 b	84,00 \pm 3,31 a	71,33 \pm 4,04 b	65,45 \pm 2,52 b
Estro-ovulação (h) Estrus-Ovulation (h)	21,08 \pm 1,42ab	26,33 \pm 2,03 a	23,00 \pm 2,14ab	17,55 \pm 0,97 b
GnRH-ovulação (h) GnRH-Ovulation (h)	—	36,00 \pm 3,31 a	23,33 \pm 4,04ab	14,55 \pm 5,05 b

Médias seguidas de mesma letra, nas linhas, não diferem entre si ($p > 0,05$). EPM = Erro-padrão da Média. Grupo Controle: medroxiprogesterone (MAP) por 12 dias e na retirada da esponja eCG. Grupo I: 0,1 mg de Benzoato de estradiol (BE) e MAP por quatro dias, na retirada da esponja aplicação de PGF_{2α} e GnRH 48h após a retirada da esponja. Grupo II: 0,1 mg de BE, 35 mg de progesterona injetável e MAP por quatro dias, na retirada da esponja aplicação de eCG e PGF_{2α} e GnRH 48h após a retirada da esponja. Grupo III: 0,2 mg de BE, 35 mg de progesterona injetável e MAP por quatro dias, na retirada da esponja aplicação de eCG e PGF_{2α} e GnRH 56h após a retirada da esponja.

Means followed by same letter, in the lines, do not differ ($p > 0,05$). EPM = Standard error of the mean. Group control: medroxiprogesterone (MAP) for 12 days and eCG at sponge withdrawal. Group I: 0.1 mg of Estradiol benzoate (BE) and MAP for 4 days; at sponge withdrawal, application of PGF₂ and GnRH 48h after the sponge was withdrawn. Group II: 0.1 mg of BE, 35 mg of injectable progesterone and MAP for 4 days; at sponge withdrawal, eCG application and PGF₂ and GnRH 48h after the sponge was withdrawn. Group III: 0.2 mg of BE, 35 mg of progesterone injectable and MAP for 4 days; at sponge withdrawal, eCG application and PGF₂ and GnRH 56 h after the sponge was withdrawn.

No momento em que foi aplicada a eCG e retirada a esponja, o folículo ovulatório já apresentava um diâmetro maior, mais apto, portanto, para responder às gonadotrofinas. Esses folículos têm um processo de maturação completo, produzindo grandes quantidades de estradiol, manifestando estro após a retirada da esponja e ovulando nas 48h seguintes (VIÑOLES et al., 2001).

No Grupo Controle, as manifestações do início do estro aconteceram antes, e diferiu ($p < 0,05$) do Grupo I, que teve o estro depois conforme demais resultados relacionados na Tabela 1. O início das manifestações do estro do Grupo Controle foi próximo ao encontrado por Zeleke et al. (2005) $41,9 \pm 0,9$ h.

Nos protocolos de curta duração avaliados, o início das manifestações de estro foi semelhante à relatada por Ungerfeld e Rubianes (2002).

Nos grupos utilizando protocolos de curta duração, o início do estro foi mais disperso, entre 40 a 70h, enquanto no de longa duração foi de 36 a 50h, tal fato pode ser explicado pelo início da onda antes da retirada da esponja. No Grupo Controle ocorreu em média dois dias antes e no máximo no dia da retirada da esponja; já nos Grupos Experimentais I, II e III aconteceram em média no dia da retirada da esponja, chegando a ocorrer até um ou dois dias após a retirada da esponja, levando a menor sincronia do estro e do momento da ovulação (Tabela 1). Resultados similares foram observados por Viñoles et al. (2001) quando compararam protocolos de curta com o de longa duração, verificando que no protocolo de longa duração houve maior sincronia no início do estro, enquanto que no de curta duração teve maior dispersão, pela presença de um corpo lúteo funcional no término do tratamento na maioria das ovelhas.

A utilização da esponja por apenas quatro dias e a ausência de eCG no Grupo I, foi incapaz de induzir o estro e a ovulação na totalidade das ovelhas. Estes animais, na retirada da esponja, apresentavam o diâmetro do folículo menor e não receberam a aplicação da eCG (Tabela 1). Com a retirada da esponja houve, aumento de secreção de gonadotrofinas provocado pela diminuição da progesterona, assim, os folículos cresceram até o diâmetro ovulatório, mas podem não ter produzido quantidades de estrógenos suficientes para que houvesse a manifestação do estro, o pico de LH e consequentemente a ovulação. Tais achados estão em concordância com os relatos de Hunter et al. (1991) em que, folículos nessas condições não atingiriam o completo desenvolvimento em receptores gonadotróficos ou a habilidade máxima de sintetizar estradiol e a duração da estimulação do folículo, antes do pico de LH, seria comprometida.

Segundo Goodman (1994), em ovelhas, o aumento da circulação de progesterona antes da primeira ovulação no início da estação reprodutiva não altera o padrão de crescimento do folículo ovulatório, sendo de grande importância principalmente para induzir as manifestações do estro, junto com o primeiro pico pré-ovulatório de LH. O efeito da progesterona local ou sistêmica pode ter um papel no estabelecimento do ciclo estral em ovelhas durante o período de transição para atividade cíclica (BARTLEWSKI et al., 1999). Segundo Rubianes et al. (1998), a eCG deve estar associado ao progestágenos para estimular a ovulação, não só na estação reprodutiva como fora dela, pois na ausência deste hormônio não há manifestação de estro. Barrett et al. (2008) observaram que quando a eCG foi aplicado no final do tratamento com progestágenos e estradiol houve melhor sincronia do estro e da ovulação.

No Grupo II, o diâmetro máximo do folículo ovulatório foi significativamente maior ($p < 0,05$) que dos demais grupos. Nos Grupos Controle e Experimentais, conforme apresentado na Tabela 1, os folículos ovulatórios tiveram diâmetro máximo próximos aos descrito por Ravindra et al. (1994), Leyva et al. (1998) e Letelier et al. (2009). Em estudos realizados por Barrett et al. (2004), o folículo ovulatório encontrado durante a estação de anestro ($6,1 \pm 0,1$ mm) é menor do que o da estação reprodutiva ($7,5 \pm 0,5$ mm).

A ovulação do Grupo I diferiu dos demais grupos, sendo mais tardio (Tabela 1). O intervalo do estro até a ovulação foi menor ($p < 0,05$) no Grupo III, do que a do Grupo I. Intervalos menores foram observados por Evans et al. (2004) $28,8 \pm 0,8$ h e Hashemi et al. (2006) $29,6 \pm 5,6$ h (Tabela 1).

O momento da aplicação do GnRH à ovulação foi menor ($p < 0,05$) no Grupo III do que o do Grupo I (Tabela 1). A aplicação de GnRH nos tratamentos de curta duração não sincronizou a ovulação, pois como o estro e a ovulação aconteceram em tempos variáveis, a aplicação não foi realizada no momento adequado e nem todos os folículos estavam prontos para responder ao pico de LH, que se estabeleceu com a administração de GnRH. Segundo Rubianes et al. (1997), o grau de crescimento dos grandes folículos presentes quando da aplicação do GnRH é um fator importante a ser considerado, pois o ambiente endócrino antes da elevação do LH é mais importante do que o tamanho do folículo em determinar a resposta ovulatória.

Os resultados das determinações das concentrações de progesterona foram inferiores a

1 ng mL⁻¹ dez dias antes de ser iniciado o tratamento e no dia do início do tratamento em 75% (9/12) das ovelhas do Grupo Controle, 66% (8/12) do Grupo I, 16% (1/6) do Grupo II e 33% (4/12) do Grupo III. Dez dias após o tratamento, 100% dos animais do Grupo Controle (12/12) e do Grupo II (6/6), 91% (11/12) do Grupo III e 58% (7/12) do Grupo I apresentaram concentrações de P₄ superiores a 1 ng mL⁻¹ (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios (média ± EPM) das concentrações de progesterona (ng mL⁻¹) das ovelhas Suffolk que apresentaram concentrações de progesterona acima de 1 ng mL⁻¹ nos quinto e décimo dias após a ovulação com estro sincronizado dos Grupos-controle e Experimentais (I, II e III).

Table 2. Means values (mean ± EPM, of progesterone concentrations (ng mL⁻¹) in Suffolk ewes that presented progesterone concentrations above 1 ng mL⁻¹ in the 5th and 10th day after the ovulation with synchronized estrus in the control and experimental groups (I, II and III).

Grupo Group	Progesterona (ng mL ⁻¹) Progesterone (ng mL ⁻¹)	
	Quinto dia Fifth day	Décimo dia Tenth day
Controle Control	3,92 ± 0,39 a (n = 12)	5,90 ± 0,72 a (n = 12)
I	1,97 ± 0,74 b (n=6)	3,02 ± 0,47 b (n = 7)
II	2,19 ± 0,24 ab (n = 6)	4,41 ± 0,57 ab (n = 6)
III	3,60 ± 0,53 ab (n = 11)	4,73 ± 0,65 ab (n = 11)

Médias seguidas de mesma letra, nas linhas, não diferem entre si (p > 0,05). EPM = Erro-padrão da Média. Grupo Controle: medroxiprogesterone (MAP) por 12 dias e na retirada da esponja eCG. Grupo I: 0,1 mg de Benzoato de estradiol (BE) e MAP por quatro dias, na retirada da esponja aplicação de PGF_{2α} e GnRH 48h após a retirada da esponja. Grupo II: 0,1 mg de BE, 35 mg de progesterona injetável e MAP por quatro dias, na retirada da esponja aplicação de eCG e PGF_{2α} e GnRH 48h após a retirada da esponja. Grupo III: 0,2 mg de BE, 35 mg de progesterona injetável e MAP por quatro dias, na retirada da esponja aplicação de eCG e PGF_{2α} e GnRH 56h após a retirada da esponja.

Means followed by same letter, in the rows, do not differ (p > 0.05). EPM = Standard Error of the Mean. Group controls: medroxiprogesterone (MAP) for 12 days and eCG at sponge withdrawal. Group I: 0.1 mg of Estradiol benzoate (BE) and MAP for 4 days; at sponge withdrawal, application of PGF_{2α} and GnRH 48h after sponge withdrawal. Group II: 0.1 mg of BE, 35 mg of injectable progesterone and MAP for 4 days; at sponge withdrawal, eCG application and PGF_{2α} and GnRH 48h after sponge withdrawal. Group III: 0.2 mg of BE, 35 mg of injectable progesterone and MAP for 4 days; at sponge withdrawal, eCG application and PGF_{2α} and GnRH 56h after sponge withdrawal.

Todos os animais em que a ovulação foi constatada pela ultrassonografia apresentaram concentrações de progesterona acima de 1 ng mL⁻¹ (Tabela 2). O corpo lúteo pode ser detectado a partir do terceiro dia nas ovelhas que ovularam, sendo o mesmo resultado observado por Leyva et al. (1998), Dickie et al. (1999) e Uribe-Velasques et al. (1999).

No décimo dia após a ovulação, o diâmetro máximo do corpo lúteo e a concentração de progesterona foram semelhantes ao encontrado por Leyva et al. (1998), Ravindra et al. (1994) e Bartlewski et al. (1999) (Tabela 2).

Os níveis plasmáticos de progesterona aumentaram progressivamente do quinto ao décimo dia após a ovulação. Nestes dias, as concentrações de progesterona do Grupo I foram inferiores (p < 0,05) ao encontrado no Grupo Controle (Tabela 2). Letelier et al. (2009) também encontraram concentrações de progesterona semelhantes dez dias

após a remoção da esponja de 3,8 ± 0,35 ng mL⁻¹ a 3,9 ± 0,38 ng mL⁻¹.

A maior secreção de progesterona pelo corpo lúteo no Grupo controle em relação ao Grupo I pode ser explicado pela formação de corpo lúteo com uma maior capacidade esteroidogênica (Tabela 2). Niswender et al. (2000) sugeriram que a concentração de progesterona depende da quantidade de tecido esteroidogênico, do fluxo de sangue e da capacidade do tecido esteroidogênico em sintetizar progesterona. A concentração de progesterona é maior em animais tratados com eCG quando comparados com animais que não a receberam (BARRETT et al., 2004).

A formação de um corpo lúteo inadequado ocorre em consequência do rápido desenvolvimento folicular e da ovulação antes que as células da granulosa tenham adquirido a maturidade necessária para uma ótima luteinização em resposta ao LH (STUBBINGS et al., 1986).

Conclusão

As doses de estrógeno não foram capazes de sincronizar a emergência de uma nova onda de crescimento folicular e consequentemente o estro e a ovulação. O protocolo de longa duração apresentou melhor sincronia do estro e da ovulação, com boa funcionalidade do corpo lúteo em relação ao protocolo de curta duração sem eCG. Quando se utiliza protocolo de curta duração na pré-estação reprodutiva sem eCG a resposta ovariana é menor, resultando em menor número de animais em estro e que ovulam.

Agradecimentos

Ao Laboratório Intervet e ao Dr. Marco Dalalio que nos cedeu os hormônios utilizados no experimento.

Referências

- ALI, A. Effect of time of eCG administration on follicular response and reproductive performance of FGA-treated Ossimi ewes. **Small Ruminant Research**, v. 72, n. 1, p. 33-37, 2007.
- BARRETT, D. M. W.; BARTLEWSKI, P. M.; BATISTA-ARTEAGA, M.; SYMINGTON, A.; RAWLINGS, N. C. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 IU of eCG following a 12-day treatment with progestagen-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes. **Theriogenology**, v. 61, n. 2-3, p. 311- 327, 2004.
- BARRETT, D. M. W.; BARTLEWSKI, P. M.; DUGGAVATHI, R.; DAVIES, K. L.; HUCHKOWSKY, S. L.; EPP, T.; RAWLINGS, N. C. Synchronization of

- follicular wave emergence in the seasonally anestrous ewe: The effects of estradiol with or without medroxyprogesterone acetate. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 827-836, 2008.
- BARTLEWSKI, P. M.; BEARD, A. P.; RAWLINGS, N. C. Ultrasonographic study of luteal function in breeds of sheep with different ovulation rates. **Theriogenology**, v. 2, n. 1, p. 115-130, 1999.
- BO, G. A.; ADAMS, G. P.; CACCIA, M.; PIERSON, R. A.; TRIBULO, H.; MAPLETOFT, R. J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestagen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 39, n. 3, p. 193-204, 1995.
- BO, G. A.; BERGFELT, D. R.; BROGLIATTI, G. T.; PIERSON, R. A.; ADAMS, G. P.; MAPLETOFT, R. J. Local versus systemic effects of exogenous estradiol-17 β on ovarian follicular dynamics in heifers with progestagen implants. **Animal Reproduction Science**, v. 59, n. 3-4, p. 141-157, 2000.
- BOLAND, M. P.; LEMAINQUE, F.; GORDON, I. Comparison of lambing outcome in ewe after synchronization of oestrus by progestagen or prostaglandin treatment. **Journal of Agricultural Science Cambridge**, v. 91, n. 3, p. 765-766, 1978.
- DIAS, F. E. F.; LOPES JÚNIOR, E. S.; VILLAROEL, A. B. S.; RONDINA, D.; LIMA-VERDE, J. B.; PAULA, N. R. O.; FREITAS, V. J. F. Sincronização do estro, indução da ovulação e fertilidade de ovelhas deslanadas após tratamento hormonal com gonadotrofina coriônica equina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 618-623, 2001.
- DICKIE, A. M.; PATRSON, C.; ANDERSON, J. L. M.; BOYD, J. S. Determination of corpora lutea numbers in booroola – texel ewes using transrectal ultrasound. **Theriogenology**, v. 51, n. 7, p. 1209-1224, 1999.
- ENGELHART, H.; WALTON, J. S.; MILLER, R. B.; KING, G. B. Estradiol induced blockade of ovulation in the cow: effect of luteinizing hormone release and follicular fluid steroids. **Biology of Reproduction**, v. 40, n. 6, p. 1287-1297, 1989.
- EVANS, A. C. O.; FLYNN, J. D.; QUINN, K. M.; DUFFY, P.; QUINN, P.; MADGWICK, S.; CROSBY, T. F.; BOLAND, M. P.; BEARD, A. P. Ovulation of aged follicles does not affect embryo quality or fertility after a 14 day progestagen estrus synchronization protocol in ewes. **Theriogenology**, v. 56, n. 5, p. 923-936, 2001.
- EVANS, A. C. O.; DUFFY, P.; CROSBY, A. T. F.; HAWKEN, P. A. R. B.; BOLAND, M. P.; BEARD, A. P. B. Effect of ram exposure at the end of progestagen treatment on estrus synchronization and fertility during the breeding season in ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 84, n. 3-4, p. 349-358, 2004.
- GONZÁLES-BULNES, A.; VEIGA LOPEZ, A.; GARCIA, P.; GARCIA-GARCIA, R. M.; ARIZNAVARRETA, M.; SANCHES, M. A.; COCERO, M. J.; FLORES, J. M. Effects of progestagen and prostaglandin analogues on ovarian functional embryo viability in sheep. **Theriogenology**, v. 63, n. 9, p. 2523-2534, 2005.
- GOODMAN, R. L. Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Ed.). **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994. v. 2, p. 725-769.
- GORDON, I. Artificial control of oestrus and ovulation. In: GORDON, I. (Ed.). **Controlled Reproduction of Sheep and Goats**. Cambridge: University Press, 1997. v. 2, p. 86-115.
- HANSEL, W.; CONVEY, E. M. Physiology of the estrus cycle. **Journal of Animal Science**, v. 57, n. 3, p. 404-424, 1983.
- HASHEMI, M. A.; SAFDARIAN, M. A.; KAFIB, M. Estrous response to synchronization of estrus using different progesterone treatments outside the natural breeding season in ewes. **Small Ruminant Research**, v. 65, n. 3, p. 279-283, 2006.
- HUNTER, M. G. Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 43, n. 1, p. 91-99, 1991.
- KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. **Journal of the American Statistical Association**, v. 47, n. 260, p. 583-621, 1952.
- LETELIER, C. A.; CONTRERAS-SOLIS, I.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, R. A.; ARIZNAVARRETA, C.; TRESGUERRES, J. A. F.; FLORES, J. M.; GONZÁLEZ-BULNES, A. Ovarian follicular dynamics and plasma steroid concentrations are not significantly different in ewes given intravaginal sponges containing either 20 or 40 mg of fluorogestone acetate. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 676-682, 2009.
- LEYVA, A.; BUCKRELL, B. C.; WALTON, J. S. Regulation of follicular activity and ovulation in ewe by exogenous progestagen. **Theriogenology**, v. 50, n. 3, p. 395-416, 1998.
- MEIKLE, A.; FORSBERG, E. G.; GARÓFALO, E. G.; CARLSSON, M. A.; LUNDEHEIM, N.; RUBIANES, E. Circulating gonadotrophins and follicular dynamics in anestrous ewes after treatment with estradiol-17 β . **Animal Reproduction Science**, v. 67, n. 1-2, p. 79-90, 2001.
- MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H.; GONÇALVES, P. B. D. Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos. In: GONÇALVES, P. D. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. (Ed.). **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. p. 25-35.
- NISWENDER, G. D.; JUENGEL, J. L.; SILVA, P. J.; ROLLYSON, M. K.; McINTUSH, E. W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiology Review**, v. 80, n. 1, p. 1-29, 2000.
- NOEL, B.; BISTER, J. L.; PIERQUIN, B.; PAQUAY, R. Effects of FGA and PMSG on follicular growth and LH secretion in Suffolk ewes. **Theriogenology**, v. 41, n. 3, p. 719-727, 1994.
- PORTELA JUNIOR, V. M.; MORAES, J. C. F.; JAUME, C. M.; GONCALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, J. F. C. Influência de diferentes concentrações de acetato de medroxi-progesterona associados ou não ao benzoato de estradiol no crescimento folicular de vacas Hereford. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 532-533, 2003.

- PRICE, C. A.; WEBB, R. Steroid control of gonadotrophin secretion and ovarian function in heifers. **Endocrinology**, v. 122, n. 5, p. 2222-2231, 1988.
- RAVINDRA, J. P.; RAWLINGS, N. C.; EVANS, A. C. O.; ADAMS, J. P. Ultrasonic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the estrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, n. 2, p. 501-509, 1994.
- RAWLINGS, N. C.; JEFFCOATE, I. A.; RIEGER, D. L. The influence of estradiol 17 β and progesterone on peripheral serum concentrations of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in the ovariectomized ewe. **Theriogenology**, v. 22, n. 5, p. 473-488, 1984.
- 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. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 61-71, 1999. (Supplement).
- RUBIANES, E.; BEARD, A. P.; DIERSCHKE, D. J.; BARTLEWSKI, P. M.; ADAMS, G. P.; RAWLINGS, N. C. Endocrine and ultrasound evaluation of the response to PGF2 and GnRH given at different stages of the luteal phase in cyclic ewes. **Theriogenology**, v. 48, n. 7, p. 1093-1104, 1997.
- RUBIANES, E.; CASTRO, T.; KMAID, S. Estrus response after a short progesterone priming in seasonally anestrous goats. **Theriogenology**, v. 49, n. 1, p. 356, 1998.
- RUBIANES, E.; MENCHACA, A. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 271-287, 2003.
- SAS. Institute Analyses System. **STAT software**: changes and enhancements through release 6.12. Cary: Statistical Analysis System Institute, 1997.
- SAS. Institute Analyses System. **SAS OnlineDoc**[®], Version 8, Cary: Statistical Analysis System Institute, 1999.
- SCHRICK, F. N.; SURFACE, R. A.; PRITCHARD, J. Y.; DAILEY, R. A.; TOWNSEND, E. C.; INSKEEP, E. K. Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 6, p. 1133-1140, 1993.
- 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, n. 3, p. 1108-1114, 1993.
- STUBBINGS, R. B.; BOSU, W. T. R.; BAKER, C. A. V.; KING, G. J. Serum progesterone concentration associated with superovulation and premature corpus luteum failure in dairy goats. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 3, p. 369-373, 1986.
- TRITSCHLER, J. P.; DUBY, R. T.; PARSONS, E. M.; PARSONS, M. J.; GIORDANO, D. J. Comparison of two progestagens during out-of season breeding in a commercial ewe flock. **Theriogenology**, v. 35, n. 5, p. 943-952, 1991.
- UNGERFELD, R.; RUBIANES, E. Short term primings with different progestagen intravaginal devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG-estrous induction in anestrous ewes. **Small Ruminant Research**, v. 46, n. 1, p. 63-66, 2002.
- URIBE-VELASQUES, L. F.; OBA, E.; SOUZA, M. I. L.; VILLA-VELASQUEZ, H.; LARA-HERRERA, L. Estudo ultrassonográfico da dinamica folicular e dos hormônios reprodutivos em ovelhas durante o ciclo estral. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 187-189, 1999.
- USTUNER, B.; GUNAY, U.; NUR, Z.; USTUNER, H. Effects of long and short-term progestagen treatments combined with PMSG on oestrus synchronization and fertility in Awassi ewes during the breeding season. **Acta Veterinária Brunensis**, v. 76, n. 3, p. 391-397, 2007.
- VIÑOLES, C.; FORSBERG, M.; BANCHERO, G.; RUBIANES, E. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. **Theriogenology**, v. 55, n. 4, p. 993-1004, 2001.
- ZELEKE, M.; GREYLING, L. M. J.; SCHWALBACH, T.; ERASMUS, J. A. Effect of progestagen and PMSG on oestrous synchronization and fertility in dorper ewes during the transition period. **Small Ruminant Research**, v. 56, n. 1-3, p. 47-53, 2005.

Received on April 28, 2009.

Accepted on October 21, 2009.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.