

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**

**GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA EM SUBSTITUIÇÃO AO
GnRH EM PROTOCOLO *COSYNCH* PARA VACAS DE CORTE**

MONNA LOPES DE ARAUJO

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2014**

MONNA LOPES DE ARAUJO

**GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA EM SUBSTITUIÇÃO AO
GnRH EM PROTOCOLO COSYNCH PARA VACAS DE CORTE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Larissa Pires Barbosa

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

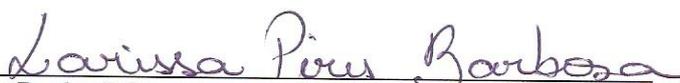
A663g	<p>Araújo, Monna Lopes de. Gonadotrofina cariônica humana em substituição ao GnRH em protocolo cosynch para vacas de corte / Monna Lopes de Araújo. _ Cruz das Almas, BA, 2014. 32.f.; il.</p> <p>Orientadora: Larissa Piras Barbosa.</p> <p>Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Reprodução animal – Bovino de corte. 2.Veterinária – Pesquisa. 3.Gonadotrofina cariônica – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD: 636.0824</p>
-------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
COLEGIADO DE MEDICINA VETERINÁRIA

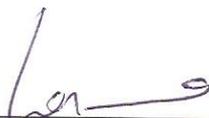
COMISSÃO EXAMINADORA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE

MONNA LOPES DE ARAUJO

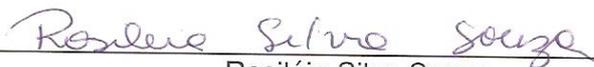
GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA COMO INDUTOR DE OVULÇÃO EM
PROTOCOLO COSYNCH PARA VACAS DE CORTE



Profa. DSc. Larissa Pires Barbosa
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Prof. MSc. Carmo Emanuel Almeida Biscarde
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Rosiléia Silva Souza
Doutoranda da Universidade Federal da Bahia

Cruz das Almas, 21 de fevereiro de 2014.

RESUMO

Avaliou-se a eficiência da utilização da gonadotrofina coriônica humana em substituição à gonadorelina em protocolos *Cosynch* para vacas de corte. Onze vacas foram distribuídas em dois tratamentos (T), sendo T1 (n=6): aplicação de 100µg do análogo de GnRH, gonadorelina, no D0; seguida da aplicação de 150µg de d-cloprostenol, no D7 e 100µg do análogo de GnRH, gonadorelina, no D9 e o T2 (n=5): aplicação de 1000UI de hCG, no D0; seguida da aplicação de 150µg de d-cloprostenol, no D7 e de 1000UI de hCG, no D9. Todos os hormônios foram aplicados via intramuscular (IM). As inseminações artificiais em tempo fixo foram realizadas no D9, após aplicação hormonal. O acompanhamento ultrassonográfico foi iniciado um dia antes ao D0 até o D7 de 24 em 24 horas. A partir do D8 do protocolo, as avaliações foram realizadas a cada 12 horas, finalizando 12 horas após a detecção da ovulação. Os parâmetros de dinâmica folicular avaliados foram: intervalo da 2ª aplicação do indutor à ovulação, taxa de ovulação à 1ª aplicação do indutor, taxa de ovulação à 2ª aplicação do indutor, taxa de crescimento folicular, diâmetro do maior folículo no D0 e D9, diâmetro do folículo dominante e do subordinado após a 2ª aplicação de GnRH e a determinação da população folicular do período de -D1 até D13. Não houve diferença para os parâmetros avaliados na dinâmica folicular ($P>0,05$). Analisando a população de pequenos, médios e grandes folículos entre os tratamentos não foi observada diferença ($P>0,05$), com diferença apenas para o número de folículos pequenos no segundo e décimo dia do protocolo ($P<0,05$). Dessa forma, 100µg de gonadorelina pode ser substituída por 1000UI de hCG em protocolos *Cosynch* para vacas de corte, com base no crescimento folicular e taxa de ovulação.

Palavras-chave: dinâmica folicular, taxa de ovulação, ultrassonografia.

ABSTRACT

The following study evaluated the efficiency of the human chorionic gonadotropin in replacing gonadorelin in *Cosynch* protocols for beef cows. Eleven cows were assigned to two treatments (T): T1 (n=6) received injections of 100µg of the GnRH analogue, gonadorelin, at D0, followed by the administration of 150µg of d-cloprostenol, at D7 and 100µg of the GnRH analogue, gonadorelin, at D9; and T2 (n=5) received injections of 1000iu of hCG at D0, followed by the administration of 150µg of d-cloprostenol at D7 and 1000iu of hCG at D9. All hormones were administered intramuscularly (IMI). The fixed-time artificial inseminations were performed at D9, after hormone administration. The ultrasonographic imaging monitoring was initialized one day before D0 and up to D7, every 24 hours. From the D8 of the protocol, the assessments were done every 12 hours, being finished 12 hours after the detection of ovulation. The parameters of follicular dynamics evaluated were: the interval of the 2nd administration of the ovulation inducer, ovulation rate at the 1st administration of the inductor, ovulation rate at the 2nd administration of the inductor, follicular growth rate, diameter of the largest follicle at D0 and D9, diameter of dominant and subordinate follicles after the 2nd administration of GnRH and the description of the follicular population of the period -D1 up to D13. There was no difference for the parameters assessed in the follicular dynamics ($P>0.05$). Analyzing the population of small, medium and large follicles between the treatments, no difference ($P>0.05$) was observed; with differences detected only for the number of small follicles in the second and the tenth day of the protocol ($P<0.05$). Therefore, 100µg of gonadorelin can be replaced by 1000iu of hCG in *Cosynch* protocols for beef cows, based on the follicular growth and ovulation rate.

Keywords: follicular dynamics, ovulation rate, ultrasonography.

LISTA DE FIGURAS

Figura1- População de pequenos folículos de vacas submetidas ao protocolo <i>Cosynch</i> utilizando diferentes indutores de ovulação.....	24
Figura 2- População de médios folículos de vacas submetidas ao protocolo <i>Cosynch</i> utilizando diferentes indutores de ovulação.....	26
Figura 3- População de grandes folículos de vacas submetidas ao protocolo <i>Cosynch</i> utilizando diferentes indutores de ovulação.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Crescimento folicular e ovulação de vacas submetidas a protocolo de sincronização <i>Cosynch</i> com diferentes indutores de ovulação.....	21
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1. Hormônios utilizados em protocolos livres de progestágenos.....	12
2.2. Eficiência dos protocolos livres de progestágenos.....	14
3. METODOLOGIA.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5. CONCLUSÃO.....	27
6. REFERÊNCIAS.....	28

1. INTRODUÇÃO

As inseminações artificiais (IA) vêm crescendo em ritmo acelerado na pecuária brasileira, com 11,9 milhões de doses de sêmen bovino vendidas em 2011. O número representa aumento de 23,5% sobre o total de 2010 e o principal destino da técnica é o gado de corte, de acordo com a Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA). Mesmo com todo esse crescimento, o potencial para o aumento do uso da IA no país é grande. Em 2010, no Brasil, existiam aproximadamente 80 milhões de fêmeas aptas à reprodução, mas apenas 7% foram inseminadas (ASBIA, 2010).

Um dos fatores que contribuem para essa baixa eficiência está associada à falha na detecção do estro em programa de inseminação artificial (IA) convencional (BARUSELLI, et al., 2008). Desta forma, quanto menor a necessidade de observação de estro, mais atrativos tornar-se-ão os programas de IA. A IATF vem sendo utilizada de forma crescente e representa uma ferramenta importante do manejo reprodutivo de fêmeas bovinas por proporciona diversas vantagens dentre as quais se destacam: concentração do trabalho de IA em dias pré-determinados, otimização do tempo da mão-de-obra envolvida, planejamento de partos e da estação de monta subsequente, concentração e planejamento da desmama de bezerras em gado de corte e diminuição do período de serviço (PALHANO, et al., 2012).

Sendo assim, a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) é uma opção de manejo capaz de eliminar a necessidade de detecção de estros, produzindo resultados iguais ou superiores à IA convencional (DISKIN, et al., 2002).

Pesquisas estão sendo desenvolvidas na tentativa de desenvolver protocolos hormonais mais adequados para a IATF, considerando principalmente as dosagens, combinações hormonais e a relação custo/benefício de cada protocolo (BARUSELLI, et al., 2002).

Nos protocolos de sincronização da ovulação os progestágenos são amplamente utilizados no Brasil, devido à boa eficiência nas taxas de prenhez após a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). No entanto, restrições no comércio de produtos de origem animal, tratados com progestágenos, devem

limitar seu uso no futuro. Uma alternativa ao uso desse hormônio é o emprego de protocolos livres de progesterona (ALVAREZ, 2012).

O primeiro protocolo livre de progesterona que promoveu a sincronização de ovulação foi desenvolvido por Pursley, et al. (1995). Após o desenvolvimento desse protocolo, várias adequações foram testadas na tentativa de melhorar os índices alcançados. Desta forma, o *Cosynch* veio como uma alternativa para diminuir o tempo de manejo dos animais, com a realização da IATF no mesmo momento da administração da segunda dose de GnRH (PURSLEY, et al., 1998; BRUSVEEN, et al., 2007).

Sendo assim, objetivou-se avaliar a eficiência da utilização da gonadotrofina coriônica humana (hCG) em substituição ao hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) no protocolo *Cosynch* em vacas de corte.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hormônios utilizados em protocolos livres de progestágenos

A sincronização da ovulação pode ser obtida por meio da aplicação de diferentes indutores de ovulação após o fim dos tratamentos de sincronização de estro, tais como, hormônio luteinizante (LH), gonadotrofina coriônica humana (hCG), hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e seus análogos e benzoato de estradiol (BE) (PURSLEY, et al., 1997).

O GnRH é produzido no hipotálamo, sendo responsável pela secreção de FSH e LH pela hipófise. É requerido para o desenvolvimento do folículo antral, mas não pré-antral (FORTUNE, et al., 2004), aumenta a secreção de LH para promover a ovulação ou luteinização do folículo dominante acima de 10mm (MOORE e THATCHER, 2006).

Análogos de GnRH são utilizados em protocolos de sincronização de ovulação em substituição ao GnRH. A buserelina é um composto nonapeptídico agonista de GnRH, com aproximadamente 40 vezes a potência do GnRH endógeno (STEVEN, 1983), capaz de alterar a função ovariana, modulando as ondas de crescimento folicular, prolongando a vida útil do corpo lúteo e a duração do ciclo estral (TWAGIRAMUNGU, et al., 1992).

Pursley, et al. (1995) desenvolveram trabalhos para viabilização da IATF, com o objetivo de otimizar a reprodução em fêmeas bovinas leiteiras. Para essa finalidade, foi testado um protocolo hormonal envolvendo o hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) e a prostaglandina $F2_{\alpha}$ ($PGF2_{\alpha}$), formando ambos, a base do primeiro protocolo para IATF, sendo denominado de *Ovsynch*.

Em 1998, Pursley, et al., trabalharam com 733 vacas de diferentes granjas leiteiras de Wisconsin (EUA), divididas em cinco grupos, para avaliação do tempo ótimo para realização da IA com ovulação sincronizada, utilizando-se o protocolo *Ovsynch*. As fêmeas foram inseminadas 0, 8, 16, 24 e 32 horas após a segunda dose de GnRH. O grupo zero hora foi inseminado no momento da aplicação da segunda dose de GnRH, sendo denominado de protocolo *Cosynch*, diminuindo ainda mais a utilização da mão-de-obra.

Segundo Santos, et al. (2008), estratégias para aumentar a ovulação após a primeira dose de GnRH em protocolos *Ovsynch*, podem aumentar a eficiência reprodutiva, tanto pelo aumento da taxa de sincronização, quanto pelo aumento da taxa de concepção. Após a aplicação de GnRH há uma indução da ovulação (folículo dominante) ou luteinização (folículos antrais), no primeiro caso ocorre a formação de um corpo lúteo (CL) funcional, que sintetiza e secreta progesterona (P_4) endógena suficiente para evitar o pico de LH. Já no segundo caso (luteinização), não ocorrerá a produção de P_4 suficiente para evitar o pico de LH, que poderá desencadear um estro antes do término do protocolo.

Os agentes luteolíticos são fundamentais em protocolos de IATF, tais como a $PGF_{2\alpha}$ e análogos sintéticos, que podem ser associados a substâncias que prolongam artificialmente o estado funcional do corpo lúteo, progesterona e progestágenos, ou que induzam a ovulação, como o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), gonadotrofinas coriônicas (hCG e eCG) e estrógenos (FONSECA e MAFILLI, 2002).

Em bovinos de corte, o uso de drogas luteolíticas tem aumentado, devido à necessidade de concentrar a época de cobertura, bem como a época de parição dos animais. Segundo a teoria de Bó, et al. (1994), os animais que apresentam folículos dominantes em fase de crescimento, durante o momento de administração de $PGF_{2\alpha}$, manifestam estro 48 a 60 horas após o uso do agente luteolítico, enquanto aqueles que possuem folículos em fase estática ou de regressão levam cerca de 5 a 7 dias.

A aplicação de $PGF_{2\alpha}$, seis a sete dias após o tratamento com GnRH, promove a regressão do corpo lúteo, concentrando a manifestação de estro em um curto período de tempo (BERBER, et al., 2002).

De acordo com Gregory, et al. (2009), os fármacos utilizados para a indução da ovulação agem por retroalimentação positiva na liberação pulsátil de LH (estrógenos e GnRH) ou agem diretamente nos receptores de LH das células da granulosa dos folículos (gonadotrofina coriônica humana - hCG). Indutores da ovulação quando administrados isoladamente não são capazes de sincronizar adequadamente a ovulação para IATF. No entanto, quando associados aos tratamentos com progesterona/progestágeno, estradiol e $PGF_{2\alpha}$ induzem a

ovulação sincronizada do folículo dominante presente no final do tratamento, possibilitando o emprego da IATF (BARUSELLI, et al., 2004).

A gonadotrofina coriônica humana (hCG) é estruturada pela combinação não covalente de duas subunidades, alfa (α hCG) e beta (β hCG), sintetizadas separadamente pelo tecido trofoblástico normal, mola hidatiforme, coriocarcinoma, células hipofisárias e tecidos tumorais de diversos tipos histológicos (MEDEIROS, et al., 2006). A heterogeneidade na estrutura e composição da cadeia de peptídeos e ramificações de carboidratos da molécula da hCG é achado comum no soro, urina, líquido amniótico e outros fluidos orgânicos (NORMAN, et al., 1990).

A molécula da hCG tem peso molecular de aproximadamente 38.000 daltons, com 70% de sua estrutura representada pelo arcabouço protéico e 30% pelas ramificações e unidades de carboidratos. Está estruturada em duas subunidades, a subunidade alfa (α hCG), com cadeia polipeptídica de 92 aminoácidos, é virtualmente idêntica às subunidades alfa das outras glicoproteínas hipofisárias numa mesma espécie (GRAY, 1998).

A hCG é uma glicoproteína que está estruturalmente relacionada ao LH e ambos hormônios se ligam ao mesmo receptor, já relatado em tecidos gonadais e extra-gonadais. Com isto, o uso da hCG tem sido um método viável para induzir a formação de corpos lúteos acessórios, evitar a regressão prematura do corpo lúteo e, conseqüentemente, promover uma função luteal materna adequada. Além disso, a hCG tem potencial para aumentar a vascularização do ovário e corpo lúteo e melhorar o desenvolvimento do concepto devido a suas ações vasoativa e embriotrófica já relatadas em outros estudos (OLIVEIRA, 2008). O CL induzido pela hCG é maior e produz mais progesterona do que o CL induzido pelo GnRH. Conseqüentemente, ela pode ter uma melhor capacidade de manter a gestação por produzir mais P_4 (SCHMITT, et al., 1996).

2.2 Eficiência dos protocolos livres de progestágenos

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 qual envolve o desenvolvimento sincronizado de um

grupo de folículos, denominado onda folicular (GINTHER, et al., 1996). Com isso, o estudo da dinâmica folicular associado à administração de hormônios que estimulam o crescimento folicular possibilita a descoberta de novos protocolos para sincronização da ovulação cada vez mais eficientes.

O ciclo estral da fêmea bovina é controlado por uma complexa interação neuroendócrina, coordenada pelo eixo hipotálamo-hipófise-ovário-útero, envolvendo mecanismos intra-ovários que estabelecem uma dinâmica folicular a qual permite o desenvolvimento de um folículo maduro capaz de ovular em um momento propício e produzir assim, uma oócito capaz de ser fecundado (CALLEJAS, 2001).

Ginther, et al. (2003) descrevem que uma onda de crescimento folicular é caracterizada por um grupo de pequenos folículos que são recrutados (emergência folicular) e iniciam uma fase de crescimento comum por cerca de três dias. Destes, normalmente apenas um folículo continua seu desenvolvimento (folículo dominante), enquanto os outros entram em processo de atresia (folículos subordinados). O crescimento do folículo dominante em ambiente com baixa concentração de progesterona promove o aumento das concentrações de estrógenos, que desencadeia o mecanismo de retroalimentação positiva para a secreção do GnRH e o consequente pico de LH, promovendo a ovulação (FORTUNE, 2004).

Foi por meio do conhecimento do desenvolvimento folicular que se descobriu que vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* se comportavam de maneira diferente quanto ao número de ondas foliculares (BÓ, et al., 2003), tamanho folicular na divergência (SARTORELLI, et al., 2005; CASTILHO, et al., 2006) e tamanho do folículo ovulatório (GIMENES et al., 2008). Ondas de crescimento folicular não ovulatórias ocorrem na presença de um corpo lúteo funcional, e a inibição exercida pela progesterona pode limitar o suporte gonadotrófico, necessário para os estádios finais do desenvolvimento folicular (BERBER, et al., 2006).

Utilizando protocolo *Cosynch*, Geary, et al. (2001b) obtiveram taxa de prenhez, para vacas sincronizadas com GnRH, com ou sem remoção de bezerros e hCG com ou sem remoção de bezerros de 46, 49, 35, e 34%, respectivamente.

Autores como Alvarez, et al. (2003) afirmam que o tratamento *Ovsynch* seguido de inseminação artificial com tempo pré-fixado permite a obtenção de taxas de concepção semelhantes às alcançadas em animais inseminados no estro observado, natural ou induzido, sem influência da raça. Assim como Palhano, et al. (2012) não encontraram nenhuma diferença após seleção de animais cíclicos entre os protocolos *Ovsynch* e *Cosynch*, com ou sem P₄. Esses resultados mostram que o uso de *Cosynch* pode ser uma ferramenta viável na otimização de IATF.

Geary, et al. (2001b) utilizando vacas, substituindo GnRH por hCG em protocolo *Cosynch*, observaram sinais de estros numericamente inferiores à taxa de ovulação, os níveis de progesterona altos no momento da inseminação e uma maior frequência de ciclo estral curto, que resultou em uma menor taxa de gestação.

Geary et al. (2001a) observaram que as taxas de concepção não foram diferentes entre os animais submetidos ao *Cosynch* (58%) comparado aos submetidos ao *Ovsynch* (57%).

Segundo Santos, et al. (2008), o número de animais que entram em estro após a segunda dose de GnRH é influenciada pela resposta ovulatória do folículo a primeira dose de GnRH, sendo as taxas de prenhez à IATF no protocolo *Ovsynch* melhores em animais que respondem com ovulação após a primeira dose de GnRH por produzirem maiores concentrações de progesterona evitando a antecipação do estro ao término do protocolo.

Bremer, et al. (2004) observaram em estudos no qual um dispositivo intravaginal de liberação lenta de progesterona (CIDR) foi adicionado ao protocolo *Cosynch*, sendo tempo de AI variando em 48-72h, que a taxa de prenhez após a IA na 48 h foi inferior comparada às 54 ou 66h (56%, 67% e 71%), respectivamente, mas não foi detectada diferença quando a IATF foi feito 48 ou 60 horas após a PGF_{2α}. Entretanto, Dobbins, et al. (2009) concluíram que inseminações feitas em 56h ou mais tarde, possibilita maiores taxas de gestação. Observaram também a existencia de uma interação entre idade do animal com o tempo da AI, verificando que 56h parecia ser o ideal para as vacas de até 3 anos.

Geary, et al. (2001a) observaram que em vacas primíparas submetidas ao protocolo *Cosynch*, as taxas de gestação foram maiores para as vacas tratadas

com hCG sem remoção do bezerro, do que para vacas que receberam GnRH com remoção do bezerro, enquanto que aquelas tratadas com hCG com remoção de bezerros e GnRH sem remoção de bezerros foram intermediárias.

3. METODOLOGIA

O estudo foi realizado no Setor de Bovinocultura da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, na cidade de Cruz das Almas, Bahia, compreendendo o período de novembro de 2013 à janeiro de 2014.

Foram utilizadas 11 vacas adultas, aneloradas, com escore de condição corporal média de $4,62 \pm 0,69$, segundo Nicholson e Butterworth (1986), previamente selecionadas quanto à condição reprodutiva, avaliação clínica e atividade ovariana, por meio de avaliação ginecológica com ultrassonografia.

Os animais foram submetidos a regime semi-intensivo de produção, onde durante dia tiveram livre acesso à pastagem (*Brachiaria decumbens*) e receberam concentrado à base de farelo de milho e soja. Água e suplemento mineral foram fornecidos à vontade.

As vacas foram distribuídas aleatoriamente em dois tratamentos (T) e as aplicações hormonais foram realizadas por via intramuscular no membro posterior, sendo: T1 (n=6): vacas que receberam no D0, 100 μ g de gonadorelina (Profertil®, Tortuga, Brasil), análogo de GnRH; no D7, 150 μ g de d-cloprostenol (Prolise®, Arsa, Argentina) e no D9 100 μ g de gonadorelina (Profertil®, Tortuga, Brasil), análogo de GnRH e T2 (n=5): vacas que receberam no D0, 1000UI de hCG (Vetecor®, Calier, Brasil); no D7, 150 μ g de d-cloprostenol (Prolise®, Arsa, Argentina) e no D9 1000UI de hCG (Vetecor®, Calier, Brasil). O local de aplicação foi higienizado seguindo os padrões de antissepsia, utilizando álcool à 70%. Foi realizada a IATF no D9 do protocolo após aplicação hormonal.

Para as avaliações de dinâmica folicular ovariana foram realizadas avaliações ultrassonográficas via transretal, inicialmente foram feitas a partir do dia anterior ao D0 até o D6 de 24 em 24 horas. A partir do D7 as avaliações foram realizadas a cada 12 horas até 12 horas após a detecção da ovulação.

As imagens dos ovários foram obtidas por via transretal utilizando ultrassom, marca Pie Medical (modelo Àquila Vet) acoplado a um transdutor linear de 6,0/8,0 MHz. Os exames foram realizados por um único avaliador. Foram avaliados o crescimento folicular, ovulação e formação de corpo lúteo, por meio do número de folículos pré-ovulatórios, diâmetro dos folículos pré-ovulatórios (mm), momento da ovulação (h), intervalo entre o início do estro e a ovulação (h),

intervalo entre a ovulação e o final do estro (h). O tempo de ovulação foi considerado como a média entre a última vez que o folículo ovulatório foi visto e a primeira vez que não foi observada na avaliação ultrassonográfica.

O intervalo da 2ª aplicação do GnRH à ovulação foi mensurado em horas. A ovulação foi calculada pela média entre o horário da última visão do folículo ovulatório e o horário onde se detectou a ovulação. A taxa de crescimento do folículo ovulatório (mm/dia) foi obtida por meio da diferença dos diâmetros final e inicial, dividido pelo número de horas e multiplicando por 24, a fim de alcançar a taxa de crescimento diário.

O diâmetro folicular foi obtido através do maior comprimento da cavidade antral. O folículo dominante foi o que possuía o maior diâmetro e excedia o de todos os demais, sendo seu diâmetro determinado pela média das duas maiores distâncias. Considerou-se apenas um folículo subordinado, sendo classificado como um dos que apareceram simultaneamente com o folículo dominante, porém com menor diâmetro.

Para análise da população folicular, foi feita a mensuração e contagem de todos os folículos visualizados durante as análises ultrassonográficas, sendo classificados de acordo com seu tamanho em folículos pequenos (3 à 5mm), folículos médios (6 à 8mm) e folículos grandes (maiores que 9mm), como descrito por Ferreira, et al. (2004).

Para análise estatística foi utilizada o delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram avaliados quanto à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. Algumas variáveis apresentaram comportamento não normal (Taxa de ovulação após primeira aplicação do indutor de ovulação; Período da segunda aplicação do indutor à ovulação; Tamanho do folículo no D9; Tamanho do maior folículo e Taxa de ovulação após segunda aplicação do indutor de ovulação) sendo aplicado o teste não paramétrico Mann-Whitney. As outras variáveis (Taxa crescimento folicular; Tamanho da maior folículo no D0 e Tamanho do Segundo maior folículo) apresentaram comportamento normal, sendo avaliados por ANOVA à 5% de significância.

Para os parâmetros de população folicular foi realizado o teste de Shapiro-Wilk onde alguns dos dados apresentaram distribuição não normal e outros (a maioria) apresentaram distribuição normal. Para os dados que apresentaram

comportamento não normal foi aplicado teste não paramétrico (teste Wilcoxon W) e os que apresentaram distribuição normal foi aplicado o teste ANOVA a 5% de significância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença para os parâmetros de crescimento e ovulação entre os tratamentos avaliados ($P>0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Crescimento folicular e ovulação de vacas submetidas a protocolo de sincronização *Cosynch* com diferentes indutores de ovulação

Parâmetros	T1 (GnRH)	T2 (hCG)
TMF D0 (mm) ₁	9,49±2,57	8,57±2,08
TMFD9 (mm) ₂	11,60±4,92	12,08±2,03
TMF ovulação (mm) ₂	13,98±4,98	14,07±4,07
TSMF ovulação (mm) ₁	8,05±2,92	8,43±5,45
TCF (mm/d) ₁	0,65±0,33	0,66±0,23
Taxa Ovulação Primeira Aplicação (%) ₂	33,33 (2/6)	80,00 (4/5)
Taxa Ovulação Segunda Aplicação (%) ₂	33,33 (2/6)	60,00 (3/5)
Intervalo Segunda Aplicação-Ovulação(h) ₂	35,99±8,51	34,38±7,03

TMF=tamanho do maior folículo, TSMF=tamanho do segundo maior folículo; TCF= taxa de crescimento folicular, 1=dados paramétricos, 2=dados não paramétricos. Não houve diferença entre os tratamentos, **ANOVA** ($P>0,05$) para dados paramétricos e **Mann-Whitney Test** para os dados não paramétricos.

Os valores encontrados para tamanho do maior folículo no D0 foi de 9,49±2,57mm e 8,57±2,08mm para os animais do T1 (GnRH) e T2 (hCG), respectivamente ($P>0,05$; Tabela 1). Vasconcelos, et al. (2009), utilizando vacas nelores lactantes independente da ciclicidade, observou que a taxa de ovulação após o tratamento com GnRH foi influenciada pelo diâmetro do folículo no dia 0 ($P<0,05$). Sendo assim, maior diâmetro folicular contribuiu para que os animais apresentassem maior taxa de ovulação. A ovulação ao primeiro estímulo ovulatório é importante para que ocorra a segunda ovulação após o segundo estímulo aumentando a chance de concepção.

Keskin, et al. (2010) trabalharam com vacas em lactação submetidas ao protocolo *Ovsynch*, utilizando GnRH e hCG como indutores de ovulação observaram o tamanho do maior folículo no D0 de $15,8\pm 0,2$ mm e $15,4\pm 0,2$ mm, respectivamente. Valores maiores aos encontrados no presente estudo. Já Vasconcelos, et al. (2009) encontraram valores mais próximos, quando utilizaram vacas nelore lactantes (45 a 120 dias pós-parto), independente da ciclicidade, e observaram diâmetro do folículo no dia 0 do protocolo de $10,6\pm 0,22$ mm, utilizando GnRH como indutor de ovulação.

Os valores encontrados para tamanho do maior folículo no D9 do protocolo foi de $11,60\pm 4,92$ mm e $12,08\pm 2,03$ mm, para T1 (GnRH) e T2 (hCG), respectivamente ($P>0,05$; Tabela 1). Weiss, et al. (2012) mencionam que a utilização de GnRH, hCG e/ou hormônio luteinizante (LH) no dia 9 tem como objetivo, promover a indução sincronizada da ovulação do folículo dominante ($>9,0$ mm) pelo efeito fisiológico de estimular a liberação de LH e hormônio folículo estimulante (FSH) na hipófise anterior. Desta forma, os valores encontrados do tamanho do maior folículo no D9 em ambos os tratamentos mostram estarem aptos à ação dos indutores de ovulação.

Borges, et al. (2004), com base na dinâmica folicular de vacas, observaram que o diâmetro máximo dos folículos dominantes para as diversas ondas foi, em média, de $8,9\pm 0,6$ mm e para os folículos subordinados, a média foi de $6,3\pm 0,7$ mm. Sendo os valores encontrados no presente trabalho superiores à média descrita por estes autores. Os valores para tamanho do folículo ovulatório foi de $13,98\pm 4,98$ mm e $14,07\pm 4,07$ mm, para os tratamentos T1 (GnRH) e T2 (hCG) ($P>0,05$; Tabela 1), respectivamente e de $8,05\pm 2,92$ mm e $8,43\pm 5,45$ mm, para tamanho do segundo maior folículo no T1 e T2 ($P>0,05$; Tabela 1), respectivamente.

A taxa de crescimento folicular observada foi de $0,65\pm 0,33$ mm/dia no T1 (GnRH) e de $0,66\pm 0,23$ mm/dia no T2 (hCG) ($P>0,05$; Tabela 1), possuindo valores inferiores aos observados por Coutinho, et al. (2007), que na primeira onda foi de $1,48\pm 0,60$. Borges, et al. (2004) analisando o desenvolvimento folicular em vacas Gir, utilizou GnRH e hCG como indutores de ovulação, obtiveram taxa de crescimento folicular maiores que o obtidos nesse trabalho,

com médias de $1,6\pm 0,6$ mm no tratamento usando hCG e de $1,5\pm 0,6$ mm, com GnRH.

Apesar de não haver diferença entre os grupos para a taxa de ovulação à primeira aplicação do indutor de ovulação, observou-se que os animais submetidos ao protocolo, utilizando como indutor de ovulação a hCG, obtiveram um número maior de fêmea ovulando após a segunda aplicação do indutor, que corresponde a 60,00% dos animais tratados com hCG, quando comparado ao uso do GnRH, que obteve rendimento de 33,33%.

Em vacas cíclicas, a ausência de ovulação após utilização de GnRH pode comprometer a ovulação após o tratamento com o segundo indutor, uma vez que a onda folicular não será sincronizada e, portanto, pode não haver um folículo dominante no momento do pico de LH induzido pelo segundo indutor. Em vacas em anestro, a ausência de ovulação, após o tratamento com GnRH, pode comprometer a taxa de concepção, pois nesse caso os animais que ovularem após o tratamento com o segundo indutor não terão sido expostos previamente à progesterona, apresentando luteólise prematura comprometendo assim a eficiência do protocolo (VASCONCELOS, et al., 2009).

Os resultados obtidos por Weiss, et al. (2012), utilizando bufalas, indicam que não houve diferença entre os tratamentos para taxa de ovulação após a primeira aplicação do indutor, no entanto observou-se uma tendência de melhores resultados no grupo de búfalas que receberam o protocolo com o hCG em relação ao grupo que recebeu GnRH. Autores como Pursley, et al. (1998), utilizando o protocolo *Ovsynch* em fêmeas bovinas, verificaram que todos os animais haviam ovulado entre 24 e 32 horas após a aplicação da segunda dose de GnRH, o que diverge dos resultados encontrado no presente trabalho.

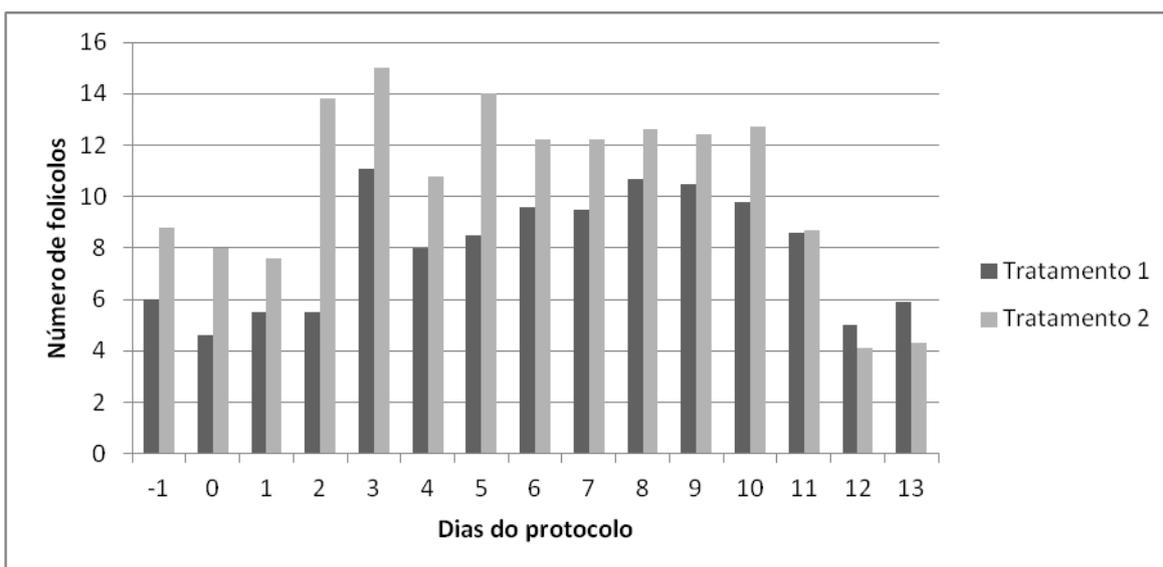
Alvarez, et al. (2003) relataram que em média 6,2% das vacas submetidas ao tratamento *Ovsynch* apresentaram estro no período compreendido entre a primeira aplicação de GnRH e a $PGF_{2\alpha}$. Esses resultados confirmam que, embora o tratamento *Ovsynch* possa ser iniciado ao acaso em qualquer período do ciclo estral, a capacidade de GnRH induzir a ovulação ou a luteinização do folículo dominante dependerá do estágio do desenvolvimento folicular no momento do tratamento.

Em bovinos, os folículos podem atingir o diâmetro de 8mm independentemente do suporte de LH, mas o crescimento além de 9mm requer LH endógeno ou FSH exógeno (GONG, et al., 1996). O que justifica os achados do presente trabalho, onde os folículos após a aplicação da segunda dose do indutor de ovulação obtiveram uma média de $9,70 \pm 4,10$ no T1 e $9,05 \pm 15,45$ mm no T2.

Não houve diferença para o intervalo entre a segunda aplicação do indutor e a ovulação (T1 - $35,99 \pm 8,51$ h e T2 - $34,38 \pm 7,03$ h) ($P < 0,05$; Tabela 1). A sincronização entre os intervalos da primeira e segunda aplicação à ovulação é importante, pois uma nova onda se inicia somente quando o folículo dominante da onda anterior ovula ou inicia o processo de atresia. Esse intervalo é fundamental para determinar o melhor momento para realização da IATF, garantindo uma melhor eficiência do protocolo (KESKIN, et al., 2010).

Analisando a população de pequenos, médios e grandes folículos entre os tratamentos não foi observada diferença ($P > 0,05$; Figura 1, 2 e 3), com diferença apenas para o número de folículos pequenos no segundo e décimo dia do protocolo ($P < 0,05$; Figura 1).

Figura 1 - População de pequenos folículos de vacas submetidas ao protocolo *Cosynch* utilizando diferentes indutores de ovulação.

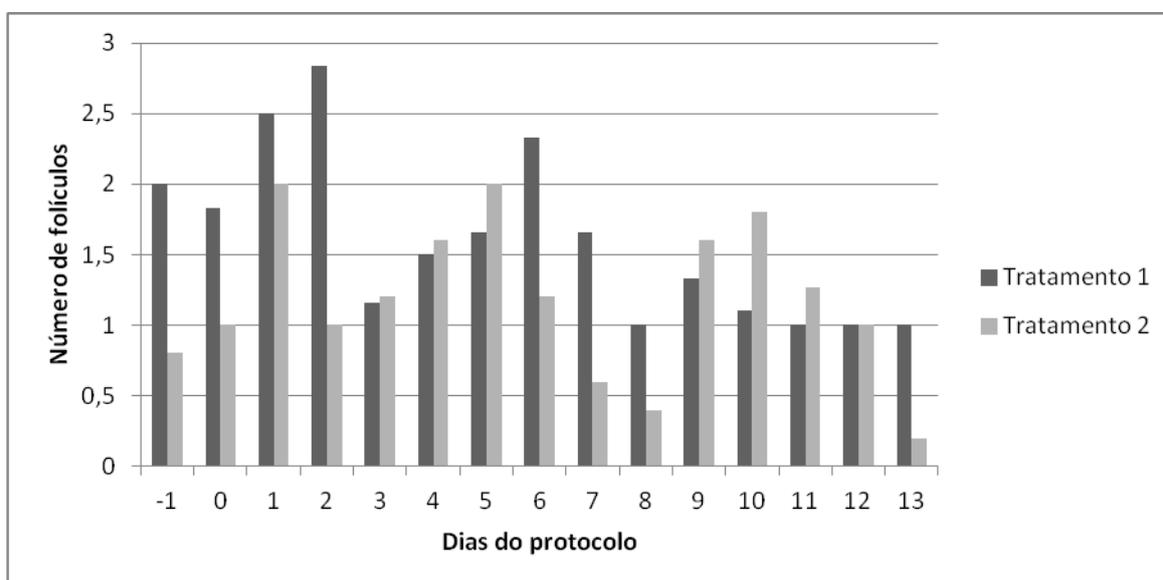


O número de folículos pequenos foi influenciado pelo tratamento ($P < 0,05$; Figura 1), como média no D2 de $5,5 \pm 3,3$ (T1) e $13,8 \pm 3,1$ (T2) e no D10 de $9,8 \pm 1,9$ (T1) e $12,7 \pm 2,1$ (T2). Este aumento no número de folículos pequenos no D2 e D10 do protocolo caracteriza o processo de emergência folicular, onde um grupo de folículos cresce simultaneamente no ovário, estimulado pelo pico de liberação de FSH (ADAMS, et al., 1992). Esses folículos apresentam em torno de 4 mm de diâmetro, sendo responsivos e dependentes dessa gonadotrofina (GINTHER, et al., 2002). Segundo Borges, et al. (2004), utilizando acetato de buserelina ou hCG em vacas Gir aos 56 dias pós parto, observaram o surgimento de nova onda folicular cerca de 1,4 dias após o tratamento, resultados estes semelhantes ao encontrado no presente trabalho.

A diferença observada entre o número de folículos pequenos no D2 e D10 do protocolo, ou seja, após a aplicação do indutor de ovulação, com um maior número de folículos observado no tratamento utilizando o hCG, pode ser justificado pela ação de 25% de FSH presente na molécula de hCG, o que possivelmente recrutou um número maior de folículos.

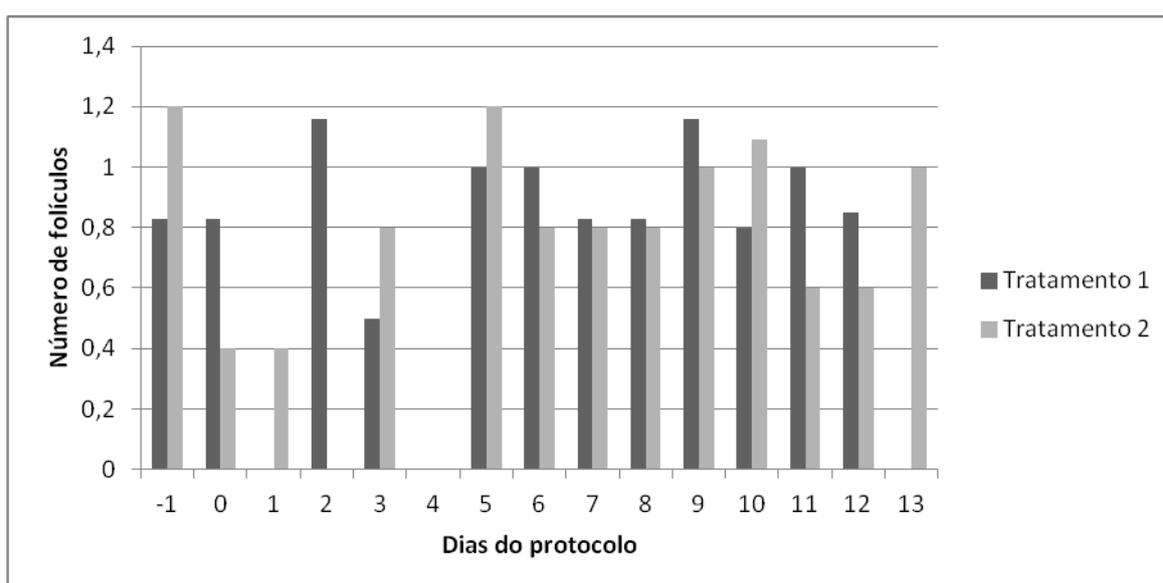
Twagiramungu, et al. (1994), utilizando buserelina como indutor de ovulação em vacas cíclicas e acíclicas, observaram que o número de folículos médios foi maior no D3, porém menor no D6 para grupo tratado com buserelina. O que difere do presente trabalho onde apesar de não ter tido diferença para o número de folículos médios entre os tratamentos, observa-se um aumento do número de folículos médios para os animais tratados com hCG no D2 e no D6 (Figura 2).

Figura 2 - População de médios folículos de vacas submetidas ao protocolo *Cosynch* utilizando diferentes indutores de ovulação.



A ausência de folículos grandes no D4 retrata que houve uma resposta à primeira aplicação do indutor, onde tem por finalidade estimular a ovulação ou atresia do folículo maior para que haja uma resposta após a segunda aplicação do indutor, gerando os estímulos necessários para uma nova ovulação.

Figura 3 - População de grandes folículos de vacas submetidas ao protocolo *Cosynch* utilizando diferentes indutores de ovulação.



5. CONCLUSÃO

A utilização de 1000UI de hCG em substituição a 100µg de gonadorelina, como indutor de ovulação, em protocolo *Cosynch* para vacas de corte demonstrou ser eficiente, com base no crescimento folicular e taxa de ovulação.

6. REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; KASTELIC, J. P.; KO, J. C. H.; GINTHER, O. J.. **Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers.** J Reprod Fertil, v.94, p.177-188, 1992.
- ALVAREZ, R. H.; MARTINEZ, A.C.; CARVALHO, J. B. P.; ARCARO, J. R. P.; PIRES, R. M. L.; OLIVEIRA, C. A. **Eficácia do tratamento Ovsynch associado à inseminação artificial prefixada em rebanhos *Bos taurus* e *Bos indicus*.** Pesq. agropec. bras., Brasília, v. 38, n. 2, p. 317-323, fev. 2003
- ALVAREZ, R.H.. **Eficiência da inseminação artificial em tempo fixo em novilhas holandesas tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona associado ao GnRH ou ao benzoato de estradiol.** Biblioteca Virtual FAPESB, 11/14358-9 2012.
- ASBIA. Associação brasileira de Inseminação Artificial. In: ASBIA realiza **Simpósio sobre Inseminação Artificial durante a reunião da SBTE.** Imprensa, 2012. Disponível em: <<http://www.asbia.org.br/novo/imprensa/>> Acesso em: fevereiro de 2013.
- BARRUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O. et al. **The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates.** Animal Reproduction Science, v. 82-83, p. 479-486, 2004.
- BARUSELLI, P. S., MARQUES, M. O., CARVALHO, N. A. T., MADUREIRA, E. H., & CAMPOS FILHO, E. P. **Efeito de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo na eficiência reprodutiva de vacas de corte lactantes.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, 26(3), 218-221, 2002.
- BARUSELLI, P.S.; JACOMINI, J.O; SALES J.N.S.; CREPALDI, G. **Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo.** In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Londrina. *Anais.* [s.n.]. p.146-167, 2008.
- BERBER, R. C. A.; SILVA, M. A.; CARDOSO, M. J. L. **Sincronização da ovulação utilizando protocolos Ovsynch em bovinos e bubalinos.** Revisão. Biosci J. v18, n.1, p. 103-120, 2006
- BO, G. A.; ADAMS, J. P.; PIERSON, R. A.; TRIBULO, H. E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R. J. **Follicular waves dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant.** Theriogenology, Stoneham, v. 41, n. 8, p. 1555-1569, 1994.
- BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTINEZ, M .F. **Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus*.** Animal Reproduction Science, v.78, p.307-326, 2003.
- BORGES, A. M.; TORRES, C. A. A.; ROCHA JUNIOR, V. R.; RUAS, J. R. M.; CARVALHO, G. R.; NETO, A. M.; CARVALHO, B. C. (2004). **Desenvolvimento folicular no pós-parto de vacas da raça Gir tratadas com Acetato de Buserelina (GnRH) ou Gonadotrofina coriônica humana (hCG).** Rev. Bras. Zootec, 33, 1396-1404, 2004.

BREMER, V. R.; DAMIANA, .SM.; IRELAND, F. A.; FAULKNER, D. B.; KESLER, D. J. **Optimizing the interval from PGF to timed AI in the CoSynch + CIDR and 7-11 Synch estrus synchronization protocols for postpartum beef cows.** J Anim Sci; 82(Suppl 2): 106 (Abstr) 2004.

BRUSVEEN D, J.; CUNHA, A. P.; SILVA, C. D.; CUNHA, P.M.; STERRY, R. A.; SILVA, P. B. **Altering the Time of the Second Gonadotropin-Releasing Hormone Injection and Artificial Insemination (AI) During Ovsynch Affects Pregnancies per AI in Lactating Dairy Cows.** Journal of Dairy Science. 91:1044-1052, 2007

CALLEJAS, S. S. Fisiología del ciclo estral bovino. *In*: Palma GA. **Biotecnología de la reproducción.** Mar del Plata: Reprobiootec,. p.37-49, 2001.

CASTILHO, C.; GARCIA, J. M.; RENESTO, A. **Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers.** Animal Reproduction Science, v.98, p.189-96, 2006.

COUTINHO, G. T. R. M; VIANA, J. H. M; SÁ, W. F; CAMARGO, L. S; FERREIRA, A. M; PALHÃO, P. M; NOGUEIRA, L. A. G.. **Avaliação ultra-sonográfica da dinâmica folicular e lútea em vacas da raça Guzará.** Arq. bras. med. vet. zootec;59(5):1089-1096, 2007.

DISKIN, M. G.; AUSTIN, E. J.; ROCHE, J. F. **Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle.** Domestic Animal Endocrinology, Stoneham, v.23, n1/2, p.211-228, 2002.

DOBBINS, C.A.; EBORN, D.R.; TENHOUSE, D.E.; BREINER, R. M; JOHNSON S. K.; MARSTON T. T.; STEVENSON, J. S. **Insemination timing affects pregnancy rates in beef cows treated with CO-Synch protocol including an intravaginal progesterone insert.** Theriogenology 72 1009–1016, 2009.

FERREIRA, A. D. M.; Viana, J. H. M.; Camargo, L. S. D. A., Sá; W. F. D.; Pereira, P. A. C.. **População folicular ovariana durante o ciclo estral em vacas da raça Gir.** Revista Brasileira de Zootecnia, 33, 2004.

FONSECA, J. F., MAFFILI, V. V. **Biotecnologias da reprodução de ruminantes.** In: Jornada de medicina veterinária da UNIPAR, 7, 2002, Umuarama. Anais. Umuarama: UNIPAR,. p. 85-90, 2002.

FORTUNE, J .E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. **Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle.** Anim Reprod Sci, 82/83, p.109-126, 2004.

GEARY, T. W.; SALVERSON, R. R.; WHITTIER, J. C. **Synchronization of ovulation using GnRH or hCG with the CO-Synch protocol in suckled beef cows.** Journal of animal science, v. 79, n. 10, p. 2536-2541, 2001 (b).

GEARY, T. W.; WHITTIER, J. C.; HALLFORD, D. M.; MACNEIL, M. D. **Calf removal improves conception rates to the Ovsynch and CO-Synch protocols.** J ANIM SCI, 79:1-4, 2001(a).

GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; CARVALHO, N. A. T. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* capacity. *Theriogenology*, v.69, p.852-858. 2008

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; KOT, K.. **Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle.** *Reproduction*, v.124, p.475-482, 2002.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; DONADEU, F. X.; BERGFELT, D. R. **Mechanism of follicle deviation in monovular farm species.** *Anim Reprod Sci.* v.78, p.239-257, 2003.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R., KO, T. K. **Selection of the dominant follicle in cattle.** *Biol Reprod*, v.55, p.1187-1194, 1996.

GONG, J. G.; CAMPBELL, B. K., BRAMLEY, T. A.; GUTIERREZ, C. G.; PETERS, A. R.; WEBB, R. **Suppression in the secretion of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin releasing hormone agonist.** *Biology of Reproduction*, v. 55, p. 68-74, 1996.

GRAY, C.J. **Glycoprotein gonadotropins. Structure and synthesis.** *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)*;228:20-7; 1998.

GREGORY, R. M.; MELO, L. C.; BESKOW, MATTOS, A.; JOBIM R. C.; M. I. M.; GREGORY, J. W. **Dinâmica folicular e uso de hormonioterapias na regulação do ciclo estral na vaca Follicular dynamics and hormone therapy in the regulation of estrous cycle in cows.** *Rev Bras Reprod Anim Supl, Belo Horizonte, n.6, p.148-152, dez. 2009.*

KESKIN, A.; YILMAZBAS-MECITOGLU, G.; GUMEN, A.; KARAKAYA, E.; DARICI, R.; OKUT, H.. **Efeito de hCG vs GnRH no início do Ovsynch sobre as taxas de ovulação e concepção primeiro em vacas em lactação cíclicas.** *Theriogenology*, 74(4), 602-607, 2010.

MEDEIROS, S. F.; NORMAN, R. J.. **Formas moleculares da gonadotrofina coriônica humana: características, ensaios e uso clínico.** *Rev Bras Ginecol Obstet*, v. 28, n. 4, p. 251-63, 2006.

MOOR, K.; THATCHER, W. W.. **Major advances associated with reproduction in dairy cattle.** *J. Dairy Sci.* v 89, p. 1253-1266, 2006.

NICHOLSON, M.J.; BUTTERWORTH, M.H. **A guide to condition scoring of zebu cattle.** *Addis Ababa: International Livestock for Africa*, 1986.

NORMAN, R. J; BUCK, R.H; MEDEIROS, S.F.. **Measurement of human chorionic gonadotrophin (hCG): indications and techniques for the clinical laboratory.** *Ann Clin Biochem.* 27(Pt 3):183-94; 1990.

OLIVEIRA, C. A.. **Avaliação da dinâmica folicular e administração do hCG pós-monta com o uso de diferentes dispositivos vaginais no protocolo curto de sincronização de cios de ovelhas Santa Inês.** Biblioteca Virtual FAPESB, 08/05175-5 2008.

PALHANO, H. B.; JESUS, V. L. T.; FIGUEIREDO, M. A.; BALDRIGHI, J. M.; MELLO, M. R. B. **Efeito da ciclicidade de vacas nelore sobre as taxas de concepção e de prenhez após protocolos de sincronização para inseminação artificial em tempo fixo.** Rev. Bras. Med. Vet., 34(1):63-68, 2012.

PURSLEY J. R.; WILTBANK M. C.; SILCOX R. W. **Effect of time of artificial inseminations on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows.** J. Dairy Sci., 81:1239-1244, 1998.

PURSLEY, J. R.; WILTBANK, M. C.; STEVENSON, J. S.; OTTOBRE, J. S.; GARVERICK, H. A.; ANDERSON, L. L. **Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus.** J Dairy Sci.;80:295-300, 1997.

PURSLEY, J.R.; MEE, M.O.; WILTBANK, M.C. **Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH.** Theriogenology, Woburn, v. 44, n. 7, p. 915- 923, Nov. 1995

SANTOS, R. M.; VASCONCELOS, J. L. M. **Eficácia da dose reduzida de gonadorelina e diferentes prostaglandinas no protocolo *ovsynch* em vacas holandesas.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.60, n.6, p.1323-1328, 2008.

SARTORELLI, E.S.; CARVALHO, L.M.; BERGFELT, D.R. et al. **Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows.** Theriogenology, v.63, p.2382- 2394, 2005.

SCHMITT, E. J. P.; DIAZ, T. C.; BARROS, C. M.; SOTA, R. L.; DROST, M.; FREDRIKSSON, E.W.; STAPLES, C.R.; THORNER, R.; THATCHER, W.W. **Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotropin or an agonist of gonadotropin-releasing hormone.** Journal of Animal Science, 74: 1074-1083, 1996.

STEVEN, J.O.. **Clinical uses of luteinizing hormone-releasing hormone.** Fertility and Sterility, 39(5):577-590, 1983.

TWAGIRAMUNGU, H., GUILBAULT, L. A.; PROULX, J.; RAMKUMAR, R.; DUFOUR, J. J.. **Histological Populations and Atresia of Ovarian Follicles in Postpartum Cattle Treated with an Agonist of Gonadotropin-Releasing Hormone.** Journal of Animal Science, 72 (1), 192-200, 1994.

TWAGIRAMUNGU, H., GUILBAULT, L.A., PROULX, J.. **Synchronization of estrus and fertility in beef cattle with two injections of buserelin and prostaglandin.** Theriogenology, 38:1131-1144, 1992.

VASCONCELOS, J. L.; VILELA, E. R.; SÁ FILHO, O. G. **Remoção temporária de bezerros em dois momentos do protocolo de sincronização da ovulação GnRH-PGF2alpha-BE em vacas Nelore pós-parto; Temporary weaning of calves at two different times of the GnRH-PGF2alpha-EB synchronization protocol for ovulation in post-partum Nelore cows.** Arq. bras. med. vet. zootec, v. 61, n. 1, p. 95-103, 2009.

WEISS, R. R.; COSTA, F. P. D.; FRARES, L. F.; KOZICKI, L. E.; MURADAS, P. R.; ABREU, R. A. **Avaliação do Emprego do Protocolo Ovsynch Modificado na taxa de prenhez e Mortalidade fetal lós *Bubalus bubalis*.** Revista Veterinária e Zootecnia Vol.19, No. 4, p. 531-538, 2012.