

## Eficácia da dose reduzida de gonadorelina e diferentes prostaglandinas no protocolo *ovsynch* em vacas holandesas

[*Efficacy of decreasing dose of gonadorelin and comparison between different prostaglandins on ovsynch protocol in lactating Holstein cows*]

R.M. Santos<sup>1</sup>, J.L.M. Vasconcelos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária – UFU  
Av. Pará, 1720  
38400-902 – Uberlândia, MG

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP – Botucatu, SP

### RESUMO

Avaliou-se a eficácia da dose de 0,10 ou de 0,25mg de gonadorelina nas taxas de ovulação e de sincronização no protocolo *Ovsynch* e de 150mcg de D-cloprostenol ou 0,530mg de cloprostenol sódico na regressão do corpo lúteo (CL) de sete dias e de todos os CL. Foram utilizadas 136 vacas lactantes da raça Holandesa, com média de produção de leite de 23,7±5,8kg/dia, com 138,4±72,0 dias em lactação. As vacas foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos, de acordo com a dose de gonadorelina e o tipo da prostaglandina. As taxas de ovulação e de sincronização foram de 52,9% e 80,9% para 0,10mg de gonadorelina e de 57,4% e 80,9% para 0,25mg de gonadorelina, respectivamente. A taxa de regressão do CL de sete dias foi de 97,1% para o D-cloprostenol e de 97,5% para o cloprostenol sódico. A taxa de prenhez não foi influenciada pelos tratamentos, mas foi influenciada pela taxa de ovulação à primeira aplicação de gonadorelina, 16,0% vs. 6,6% para as vacas que ovularam e não ovularam, respectivamente. Conclui-se que 0,10mg de gonadorelina foi eficiente e ambas prostaglandinas podem ser usadas em protocolos de sincronização da ovulação.

Palavras-chaves: vacas de leite, sincronização, gonadorelina

### ABSTRACT

*The efficacy of 150mcg D-cloprostenol or 0.530mg cloprostenol sodium on the 7- day corpus luteum (CL) regression rate, and of two doses of gonadorelin, 0.10mg vs. 0.25mg, on the ovulation and synchronization rates during the Ovsynch protocol were evaluated. Lactating Holstein cows (n=136), producing 23.7±5.8kg milk/d and 138.4±72.0 days in milk were randomly assigned to four groups, according to dose of gonadorelin and prostaglandin type. No effect of the products and doses tested on conception rate were observed. The ovulation and synchronization rates using 0.10mg or 0.25mg of gonadorelin were 52.9% and 80.9% vs. 57.4% and 80.9%, respectively. The CL regression rates in cows ovulating after the first GnRH using D-cloprostenol or cloprostenol sodium were 97.1% and 97.5%, respectively. The pregnancy rate was not affected by treatment, but by ovulation rate after the first injection of GnRH. The pregnancy rates were 16.0% and 6.6% for ovulated and non ovulated cows, respectively. The results suggest that 0.10mg dose of gonadorelin was efficient and both prostaglandins can be used in synchronization of ovulation protocols.*

Keywords: dairy cow, synchronization, gonadorelin, prostaglandin

### INTRODUÇÃO

A eficiência da detecção de estro em vacas de leite é baixa, estimada em menos de 50% (Senger, 1994), e considerada um fator limitante para a obtenção de boa eficiência reprodutiva. Inadequados momentos e duração dos períodos

de detecção de estro associados à curta duração do comportamento de estro em vacas lactantes reduzem a eficiência da detecção (Nebel et al., 1997). Falhas na detecção de estro aumentam o intervalo parto/primeira inseminação artificial (IA) e a média da duração do intervalo entre as inseminações (Stevenson e Call, 1983). A

Recebido em 15 de outubro de 2007

Aceito em 30 de setembro de 2008

E-mail: ricasantos@yahoo.com

expressão do estro também é afetada negativamente pelo aumento da produção de leite (Harrison et al., 1990; Nebel e McGilliard, 1993; Lopez et al., 2004). A eficácia da detecção do estro vai, provavelmente, continuar afetando negativamente a eficiência reprodutiva nas fazendas de leite, enquanto a seleção genética e as práticas de manejo continuarem aumentando a produção de leite por vaca.

Progressos na redução do impacto negativo da baixa eficiência de detecção de estro em vacas lactantes têm sido obtidos com o uso de protocolos de sincronização da ovulação e IA com tempo fixo, que podem ser iniciados em qualquer fase do ciclo estral. Pursley et al. (1995) desenvolveram o protocolo *Ovsynch*, que sincroniza o desenvolvimento folicular, a regressão do corpo lúteo (CL) e a ovulação, permitindo a IA em tempo fixo após a segunda dose de gonadorelina (hormônio sintético liberador de gonadotrofina - GnRH). A IA em tempo fixo após a sincronização da ovulação resulta em taxas de concepção semelhante as obtidas com IA após observação de cio (Burke et al., 1996; Pursley et al., 1997).

Estudos estimaram os custos do protocolo *Ovsynch* no manejo reprodutivo de vacas de leite e indicaram que a maior parte dos custos com hormônio é relativa aos custos da gonadorelina (Britt e Gaska, 1998; Nebel e Jobst, 1998). Fricke et al. (1998) mostraram que doses reduzidas de gonadorelina são eficazes para ovular folículos dominantes durante o protocolo *Ovsynch*.

Os custos com a prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) são menores que os com GnRH, porém sua eficácia é muito importante para o sucesso do protocolo. Estudos de Moreira et al. (2000) mostraram que vacas com regressão incompleta do CL, 48 horas após a aplicação de  $PGF_{2\alpha}$ , tiveram menor taxa de prenhez que vacas com regressão completa. Burke et al. (1996) mostraram que vacas com concentração plasmática de progesterona (P4) maior que 1,0ng/ml 48 horas após à aplicação de  $PGF_{2\alpha}$ , não conceberam após o protocolo de IA com tempo fixo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do uso de dose reduzida de gonadorelina (0,10 vs. 0,25mg) e de D-cloprostenol (150mcg) ou de cloprostenol sódico (0,530mg) no protocolo *Ovsynch* em vacas lactantes da raça Holandesa.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 136 vacas lactantes da raça Holandesa, de um rebanho comercial, com média de produção de leite de  $23,7 \pm 5,8$ kg/dia, e com  $138,4 \pm 72,0$  dias em lactação no momento da inseminação. As vacas foram mantidas em sistema *free-stall*, agrupadas em lotes, de acordo com ordem de lactação, dias em lactação e produção de leite. Os animais foram tratados com ração completa constituída de silagem de milho e feno de alfafa, balanceada de acordo com os níveis recomendados pelo NRC (Nutrient..., 2001), e ordenhadas três vezes ao dia.

Vacas com mais de 60 dias em lactação e vazias foram agrupadas, aleatoriamente, em quatro grupos: (G). As do G1 (n=35) receberam 0,10mg de gonadorelina<sup>1</sup> e 150mcg de D-cloprostenol<sup>2</sup>; as do G2 (n=33) receberam 0,10mg de gonadorelina e 0,530mg de cloprostenol sódico<sup>3</sup>; as do G3 (n=34), 0,25mg de gonadorelina e 150mcg de D-cloprostenol e as do G4 (n=34), 0,25mg de gonadorelina e 0,530mg de cloprostenol sódico. As vacas, também receberam 0,10 ou 0,25mg de gonadorelina no dia 9. Os animais receberam a primeira injeção (IM) de gonadorelina em dia predeterminado da semana, independente do dia do ciclo estral em que se encontravam, quando foi avaliada a presença de folículos e de CL. Sete dias após receberam  $PGF_{2\alpha}$  (150mcg de D-cloprostenol ou 0,530mg cloprostenol sódico - IM), quando foi avaliada a presença de CL resultante da ovulação em resposta à primeira aplicação de gonadorelina e a manutenção do CL presente no dia 0. No dia da segunda aplicação de gonadorelina (dois dias após a aplicação  $PGF_{2\alpha}$ ), foi avaliado o tamanho do folículo dominante e a regressão do CL (Fig. 1).

Os exames ultra-sonográficos foram realizados com aparelho Aloka (SSD500-V), com transdutor linear retal de 7,5MHz. A ovulação após a primeira aplicação de gonadorelina foi determinada pela presença de um ou mais folículos (diâmetro  $\geq 9$ mm) no momento da aplicação de gonadorelina e subsequente presença de CL sete dias depois. A resposta à segunda aplicação de gonadorelina foi determinada pela comparação entre a presença e a posterior ausência de um ou mais folículos detectados no dia da segunda aplicação de gonadorelina e 48 horas depois.

<sup>1</sup>Intervet International B.V. – Holanda.

<sup>2</sup>Hoechst Roussel Vet GmbH – Unterschleißheim.

<sup>3</sup>Coopers Brasil Ltda. – Brasil.

*Eficácia da dose reduzida...*

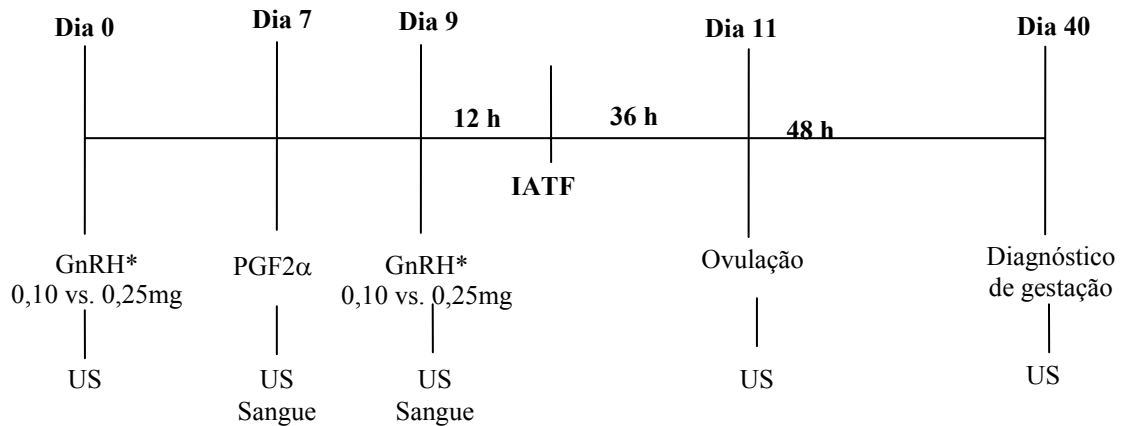


Figura 1. Representação esquemática do protocolo utilizado. As vacas que receberam 0,10mg de gonadorelina no dia 0 de tratamento, também receberam 0,10mg de gonadorelina no dia 9.

A taxa de sincronização foi determinada pelo número de vacas que ovularam um ou mais folículos até 48 horas após a segunda aplicação de gonadorelina, expressa em porcentagem do total de vacas que receberam o protocolo.

A taxa de prenhez foi determinada 30 dias após a inseminação artificial, por ultra-sonografia. A visualização do embrião com batimento cardíaco foi usada como indicação de prenhez positiva, expressa em porcentagem do total de vacas submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação. A taxa de regressão do CL foi determinada por ultra-sonografia e por dosagem de progesterona (comparação entre as amostras colhidas no dia da aplicação da PGF<sub>2α</sub> e 48h depois)

As amostras de sangue, colhidas da veia coccígea, em tubos do tipo vacutainer, sem anticoagulante, foram imediatamente colocadas no gelo em posição vertical e mantidas a 4°C por 24h. Após centrifugação a 1200 x g por 15 min para separação do soro, foram armazenadas a -20°C até a realização das dosagens. A concentração sérica de progesterona foi determinada com *kit* de radioimunoensaio em fase sólida, validado para o uso em vacas. Foram realizados três ensaios, em duplicata, com sensibilidade variando de 0,01 a 0,005ng/ml: os coeficientes de variação intra-ensaio foram de 4,2% a 10,0% para os valores baixos ( $\cong$  0,1ng/ml) e de 1,8% a 3,4% para os valores altos ( $\cong$  20ng/ml), e o coeficiente de variação inter-ensaio foi de 11,8%.

A taxa de regressão do CL após a aplicação de PGF<sub>2α</sub> foi determinada pela presença de um ou mais CL no exame ultra-sonográfico, pela concentração de progesterona  $\geq$ 1ng/ml no momento da aplicação de PGF<sub>2α</sub>, pela ausência desses CL e pela redução da concentração de progesterona para menos de 1ng/ml, 48 horas depois. A taxa de regressão dos CL de sete dias foi expressa em relação às vacas que ovularam após a primeira aplicação de GnRH e a taxa de regressão de todos os CL foi expressa em relação ao total de vacas com presença de CL no dia da aplicação da PGF<sub>2α</sub>.

Foi considerada regressão natural do CL quando as vacas apresentaram CL no dia 0 e não mais no dia da aplicação da PGF<sub>2α</sub>. Nas que ovularam após a primeira aplicação de GnRH foi considerada regressão natural quando, ao exame ultra-sonográfico, o CL, resultante dessa ovulação, estava presente no dia da aplicação da PGF<sub>2α</sub> mas a dosagem de progesterona era menor que 1ng/ml

As variáveis taxa de ovulação após a primeira aplicação de GnRH, taxa de regressão do CL de sete dias, taxa de regressão de todos os CL, taxa de sincronização da ovulação, taxa de concepção e taxa de prenhez foram analisadas por regressão logística no SAS (User's..., 1988). Foram incluídas no modelo as variáveis presença de CL no dia 0 do experimento, dias em lactação, produção de leite, ordem de lactação e índice da condição corporal.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A porcentagem de vacas que ovularam após a primeira aplicação de GnRH não foi diferente entre os grupos que receberam 0,10 ou 0,25mg de gonadorelina (Tab. 1), sendo de 52,9% e 57,4%, respectivamente, ou seja, dose reduzida de gonadorelina foi eficiente para ovular o folículo dominante. A taxa de ovulação após a primeira aplicação de GnRH foi menor que a observada por

Vasconcelos et al. (1999b), de 64% de ovulação após a primeira aplicação de GnRH, provavelmente, devido à maior proporção de vacas com três ondas de crescimento folicular, já que esse experimento foi realizado em fevereiro e vacas sob estresse térmico apresentam atresia do folículo dominante mais rápido, o que reduz a porcentagem de resposta para a primeira aplicação GnRH, concordando com os resultados de Vasconcelos et al. (2000).

Tabela 1. Número e porcentagem de vacas de raça Holandesa em lactação que ovularam após a primeira aplicação de gonadorelina, de acordo com a dose

Dose de gonadorelina	Número de animais	Ovuladas	Não ovuladas
0,10mg	68	36 (52,9%)	32 (47,1%)
0,25mg	68	39 (57,4%)	29 (42,7%)

A concentração de progesterona no dia 7 foi influenciada pela ovulação após a primeira aplicação de GnRH ( $P<0,01$ ), sendo de  $2,85\pm 0,22$  e de  $1,89\pm 0,24$ ng/ml nas vacas que ovularam e nas que não ovularam, respectivamente. Essa diferença foi, provavelmente, devido à presença do CL de sete dias, resultante da ovulação após a primeira aplicação de GnRH.

A taxa de regressão do CL de sete dias e a taxa de regressão de todos os CL não foram influenciadas pelos tratamentos com 150mcg de D-cloprostenol ou 0,530mg de cloprostenol sódico, sendo de 97,1 e 97,5% para os CL de sete dias e de 97,0 vs. 98,5% para todos os CL, respectivamente.

O destino do corpo lúteo foi influenciado pela resposta à primeira dose de GnRH (Tab. 2). As vacas que não ovularam após a primeira aplicação de GnRH apresentaram maior ( $P<0,01$ ) taxa de regressão natural do CL que as vacas que ovularam, 32,8 (20/61) vs. 13,3% (10/75), respectivamente. Vacas que não ovularam após a primeira aplicação

de GnRH apresentaram regressão natural, provavelmente, devido à fase do ciclo estral (Vasconcelos et al., 1999b), e aquelas que ovularam e apresentaram regressão natural, pode ter sido em decorrência de ciclo curto ou sincronia com regressão do CL anterior (animais entre os dias 9 ou 10 do ciclo estral no momento da primeira aplicação de GnRH).

A taxa de sincronização da ovulação após a segunda aplicação de GnRH não foi influenciada pela dose, porém, o destino do folículo dominante variou ( $P<0,01$ ) de acordo com a resposta à primeira aplicação de GnRH (Tab. 3). Das 61 vacas que não ovularam após a primeira aplicação de GnRH, 11 (18%) apresentaram ovulação antes da aplicação da segunda dose, reduzindo a taxa de sincronização e mostrando a importância da ovulação após a primeira aplicação de GnRH na taxa de sincronização e na subsequente eficiência do protocolo de IA com tempo fixo.

Tabela 2. Destino do corpo lúteo de vacas da raça Holandesa em lactação agrupadas de acordo com o tipo de prostaglandina e com a resposta após a primeira aplicação de gonadorelina (1ª GnRH)

Ovulação após 1ª GnRH	Tipo de prostaglandina	Destino do corpo lúteo			
		Regressão natural <sup>(1)</sup>	Regressão <sup>(2)</sup>	Não regressão <sup>(3)</sup>	Anestro ou cisto <sup>(4)</sup>
Não	D-Cloprostenol	29,4% (10/34)a	58,8% (20/34)a	2,9% (1/34)	8,8% (3/34)
Não	Clop. Sódico	37,0% (10/27)a	55,6% (15/27)a	0,0% (0/27)	7,4% (2/27)
Sim	D-Cloprostenol	11,4% (04/35)b	85,7% (30/35)b	2,7% (1/35)	0,0% (0/35)
Sim	Clop. Sódico	15,0% (06/40)b	82,5% (33/40)b	2,5% (1/40)	0,0% (0/40)

<sup>(1)</sup>Antes da aplicação de PGF2 $\alpha$ ; <sup>(2)</sup>devido a aplicação de PGF2 $\alpha$ ; <sup>(3)</sup>até 48h após a aplicação de PGF2 $\alpha$ ; <sup>(4)</sup>vacas em anestro ou císticas que não apresentavam corpo lúteo.

Valores seguidos por letras distintas na mesma coluna diferem entre si ( $P<0,01$ ).

### Eficácia da dose reduzida...

A taxa de sincronização (porcentagem de ovulação em resposta à segunda aplicação de GnRH) foi de 80,9%, menor do que a encontrada por Vasconcelos et al. (1999b), que obtiveram 87% de sincronização de ovulação em vacas lactantes. Estes resultados foram obtidos, provavelmente, pela maior proporção de vacas com três ondas de crescimento folicular devido ao estresse térmico, e com atresia do folículo dominante antecipada, o que reduziu a porcentagem de resposta após primeira aplicação de GnRH e, conseqüentemente, após a segunda aplicação, o que está de acordo com os resultados de Vasconcelos et al. (2000).

A taxa de prenhez não foi influenciada pelos tratamentos (Tab. 4), mas foi influenciada pela taxa de ovulação após a primeira aplicação de GnRH ( $P<0,05$ ), sendo de 16,0% (12/75) nas vacas que ovularam e de 6,6% (4/61) nas que não ovularam.

A análise destes dados mostra a importância da ovulação após a primeira aplicação de GnRH no protocolo *Ovsynch*, já que esta influencia a taxa de sincronização da ovulação e, conseqüentemente, a taxa de prenhez.

Tabela 3. Vacas da raça Holandesa em lactação que responderam à segunda aplicação de gonadorelina (2ª GnRH) agrupadas de acordo com a dose e com a resposta à primeira aplicação (1ª GnRH)

Ovulação após 1ª GnRH	Dose da 2ª GnRH (mg)	Resposta à 2ª GnRH		
		Ovulação antes da 2ª GnRH <sup>(1)</sup>	Ovulação <sup>(2)</sup>	Sem ovulação até 48 horas <sup>(3)</sup>
Não	0,10	15,6% (5/32)a	71,9% (23/32)a	12,5% (4/32)
Não	0,25	20,7% (6/29)a	69,0% (20/29)a	10,3% (3/29)
Sim	0,10	0,0% (0/36)b	88,9% (32/36)b	11,1% (4/36)
Sim	0,25	0,0% (0/39)b	89,7% (35/39)b	10,3% (4/39)

<sup>(1)</sup>Entre a aplicação da PGF<sub>2α</sub> e a 2ª GnRH; <sup>(2)</sup>entre a 2ª GnRH e 48 horas depois; <sup>(3)</sup>exame 48h após a 2ª GnRH. Valores seguidos por letras distintas na mesma coluna diferem entre si ( $P<0,01$ ).

Apesar de baixa (11,8%; 16/136) a taxa de prenhez foi semelhante à taxa de concepção obtida com inseminação artificial após a observação de cio, na mesma época, na propriedade (10,1%; 14/138). Esta taxa de concepção é semelhante à obtida em outros experimentos realizados durante o período de estresse térmico tanto no Brasil (Vasconcelos et al., 1999a), como nos Estados Unidos (Arechiga et al., 1998; De La Sota et al., 1998). Estes dados mostram que a estratégia de sincronização da

ovulação não altera a taxa de concepção e que a melhora na eficiência reprodutiva é devido a inseminação de maior número de animais. Portanto, para a obtenção de melhores resultados os fatores que afetam a concepção também devem ser controlados. As estratégias, para aumentar a ovulação após a primeira aplicação de GnRH, podem aumentar a eficiência reprodutiva tanto pelo aumento da taxa de sincronização como pelo aumento da taxa de concepção.

Tabela 4. Taxa de prenhez de vacas da raça Holandesa em lactação de acordo com dose de gonadorelina e o tipo de prostaglandina

Dose de gonadorelina	Tipo de prostaglandina	Número de animais	Concepção
0,10mg	D-cloprostenol	35	8,6% (3/35)
0,10mg	cloprostenol sódico	33	18,2% (6/33)
0,25mg	D-cloprostenol	34	11,8% (4/34)
0,25mg	cloprostenol sódico	34	8,8% (3/34)

### CONCLUSÃO

Conclui-se que a dose de 0,10mg de gonadorelina foi eficiente na ovulação do folículo dominante, e pode ser utilizada em protocolos de sincronização da ovulação e, por

não haver diferença entre 150mcg de D-cloprostenol e 0,530mg de cloprostenol sódico, ambas as prostaglandinas podem ser usadas em protocolos de sincronização da ovulação em vacas da raça Holandesa em lactação.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Intervet Brasil, pela doação dos medicamentos, à Fazenda São José, pela disponibilização dos animais, e ao Laboratório de Dosagem Hormonal da FMVZ-USP, pela realização do radioimunoensaio.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARECHIGA, C.F.; SATPLES, C.R.; MCDOWELL, L.R. et al. Effects of timed insemination and supplemental beta-carotene on reproductive and milk yield of dairy cows under heat stress. *J. Dairy Sci.*, v.81, p.390-402, 1998.
- BRITT, J.S.; GASKA, J. Comparison of two estrus synchronization programs in a large, confinement-housed dairy herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.212, p.210-212, 1998.
- BURKE, J.M.; DE LA SOTA, R.L.; RISCO, C.A. et al. Evaluation of timed insemination using a gonadotropin-releasing hormone agonist in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.79, p.1385-1393, 1996.
- DE LA SOTA, R.L.; BURKE, J.M.; RISCO, C.A. et al. Evaluation of timed insemination during summer heat stress in lactating dairy cattle. *Theriogenology*, v.49, p.761-770, 1998.
- 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.
- HARRISON, R.O.; FORD, S.P.; YONG, J.W. et al. Increased milk production versus reproductive and energy status of high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.73, p.2749-2758, 1990.
- LOPEZ, H.; SATTER, L.D.; WILTBANK, M.C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.81, p.209-223, 2004.
- MOREIRA, F.; RISCO, C.A.; PIRES, M.F.A. et al. Use of Bovine Somatotropin in Lactating Dairy Cows Receiving Timed Artificial Insemination. *J. Dairy Sci.*, v.83, p. 1237-1247, 2000.
- NUTRIENT requirements of dairy cattle. 7.ed. Washington, DC: National Academic, 2001.
- NEBEL, R.L.; JOBST, M.B.G. Gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin for estrus synchronization. *J. Dairy Sci.*, v.81, p.1169-1174, 1998.
- NEBEL, R.L.; JOBST, M.B.G.; DRANSFIELD, S.M. et al. Use of radio frequency data communication system, HeatWatch®, to describe behavioral estrus in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v.80, suppl.1, p.179, 1997. (Abstract).
- NEBEL, R.L.; MCGILLIARD, M.L. Interactions of milk yield and reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.76, p.3257-3268, 1993.
- PURSLEY, J.R.; MEE, M.O.; WILTBANK, M.C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF<sub>2α</sub> and GnRH. *Theriogenology*, v.44, p.915-923, 1995.
- PURSLEY, J.R.; WILTBANK, M.C.; STEVENSON, J.S. et al. Pregnancy rate per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J. Dairy Sci.*, v.80, p.295-300, 1997.
- SENGER, P.L. The estrus detection problem: new concepts, technologies, and possibilities. *J. Dairy Sci.*, v.77, p.2745-2753, 1994.
- STEVENSON, J.S.; CALL, E.P. Influence early estrus, ovulation, and insemination on fertility in postpartum Holstein cows. *Theriogenology*, v.19, p.367-375, 1983.
- USER'S guide: statistics. Version 6.02. Cary, NC: SAS Institute, 1988.
- VASCONCELOS, J.L.M.; ARAUJO, T.P.B.; CERRI, R.L.A. et al. Ovulation and synchronization rates in Holstein and crossbred lactating dairy cows during two seasons when receiving the PGF<sub>2α</sub> injection on d 6 or 7 of the Ovsynch protocol. *J. Dairy Sci.*, v.83, suppl.1, p.214, 2000.
- VASCONCELOS, J.L.M.; SANTOS, R.M.; COSTA, D.A. et al. Effects of progesterone concentration on size of the ovulatory follicle and double ovulation rate in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.82, suppl.1, p.99, 1999a (Abstract).
- VASCONCELOS, J.L.M.; SILCOX, R.W.; ROSA, G.L.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, 1999b.