

Dinâmica folicular e taxa de prenhez em novilhas receptoras de embrião (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) tratadas com o protocolo “Ovsynch” para inovulação em tempo fixo

Follicular dynamics and pregnancy rate in embryo recipient (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) treated with “Ovsynch” protocol for fixed-time embryo transfer

Pietro Sampaio BARUSELLI¹;
Márcio de Oliveira MARQUES¹;
Nelcio Antonio Tonizza de CARVALHO¹;
Rodolfo Cassimiro de Araújo BERBER¹;
Renato VALENTIM¹;
Ademário Fernandes de CARVALHO FILHO¹;
Waldyr Pinto COSTA NETO²

1- Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, São Paulo - SP
2- Médico Veterinário autônomo

Correspondência para :
PIETRO SAMPAIO BARUSELLI
Departamento de Reprodução Animal
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo
Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87
Cidade Universitária Armando Salles de Oliveira
05508-270 - São Paulo - SP
barusell@usp.br

Recebido para publicação: 31/03/2003
Aprovado para publicação: 19/02/2004

Resumo

Objetivou-se avaliar a eficiência da sincronização da ovulação para inovulação em tempo fixo em novilhas *Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus* receptoras de embrião. No Experimento 1, a dinâmica folicular foi acompanhada durante o protocolo “Ovsynch” (G1; n=35) e após a aplicação de PGF₂α (G2; n=34). No Experimento 2, os mesmos tratamentos foram realizados a campo em 168 (G1) e 177 (G2) novilhas. No D6, colheu-se sangue para dosagem de P4 e se realizaram exames ultra-sonográficos. No D7, realizou-se a inovulação. No Experimento 1, 45,7% dos animais ovularam após o 1º GnRH (P<0,05) e 74,3% após o 2º. A taxa de ovulação foi de 58,8% no G2. Foram detectadas em estro 64,7% das novilhas no G2 e 22,9% no G1 (P<0,01). No Experimento 2, observaram-se mais receptoras aptas a inovulação no G1 que no G2 (72,6% vs. 45,2%; P<0,01). A taxa de concepção foi de 49,2% para o G1 e de 56,3% para o G2 (P>0,05). Ao final, a taxa de prenhez no G1 foi de 35,7% e no G2 de 25,4% (P<0,05). Foram detectadas em estro 53,7% das novilhas do G2 e 33,3% do G1 (P<0,05). Os corpos lúteos com maior área determinaram maiores concentrações de P4 e taxa de concepção (P<0,05). A sincronização da ovulação para inovulação em tempo fixo aumentou as taxas de ovulação, de aproveitamento e de prenhez em novilhas receptoras de embrião.

Palavras-chave:

Progesterona.
Taxa de prenhez.
Receptora de embrião.
Bovino.
Corpo lúteo.

Introdução

A dificuldade de detecção do estro é um dos fatores que limitam o desempenho

reprodutivo em bovinos.¹ A baixa taxa de detecção do estro acarreta comprometimento da eficiência reprodutiva com conseqüente aumento do período de serviço e do intervalo

entre partos e diminuição da taxa de prenhez.² Além disso, o custo da mão-de-obra para a detecção de estro e o custo de manutenção das receptoras também determinam grande ônus aos programas de transferência de embriões (TE) em bovinos. Dessa forma, a utilização de metodologias que visam eliminar a necessidade de detecção de estro e aumentar a taxa de prenhez colaboram sobremaneira para aumentar a eficiência de biotécnicas da reprodução.

Normalmente, a aplicação única de análogos da prostaglandina ($\text{PGF}_2\alpha$) induz baixo percentual de receptoras aptas a inovulação, diminuindo assim, a taxa de prenhez e a viabilidade da TE. Objetivando controlar a dinâmica folicular e aumentar a eficiência reprodutiva, diversos autores têm estudado os efeitos da aplicação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) associado ao tratamento com $\text{PGF}_2\alpha$.^{3,4,5} Ao aplicar o GnRH em qualquer fase do ciclo estral ocorre um pico de LH (hormônio luteinizante), que promoverá a ovulação de folículos $\geq 0,9 \text{ cm}^6$ ou a luteinização dos folículos que não ovulam.⁷ Após 2 a 3 dias do tratamento, verifica-se a emergência sincronizada de uma nova onda de crescimento folicular.^{1,8,9,10} Em decorrência da ovulação após a administração de GnRH observa-se a formação de um corpo lúteo (CL) e o aumento da concentração de progesterona (P4). Assim, sete dias após o tratamento com GnRH aplica-se $\text{PGF}_2\alpha$ para que ocorra a luteólise e homogeneidade no desenvolvimento folicular.¹¹ Para aumentar a taxa de ovulação sincronizada, uma segunda dose de GnRH é aplicada 48 horas após a administração de $\text{PGF}_2\alpha$.^{3,4,11} Essa seqüência de tratamentos com GnRH e $\text{PGF}_2\alpha$ foi denominada "Ovsynch".¹⁰

Pesquisas realizadas com o emprego do protocolo "Ovsynch" têm demonstrado eficiência na sincronização da ovulação, aumento do número de animais inseminados sem a necessidade de detecção de estro, satisfatórias taxas de concepção e prenhez.¹² No entanto, existem limitadas informações

na literatura quanto ao emprego deste protocolo em receptoras de embriões para inovulação em tempo fixo. Baseado nestes fatos, a hipótese desse trabalho é a de que a sincronização da ovulação com o protocolo "Ovsynch" aumenta a taxa de ovulação sincronizada, o número de receptoras inovuladas em tempo fixo, e a taxa de prenhez sem a necessidade de detecção de estro. Assim, esse trabalho objetivou comparar a eficiência do protocolo "Ovsynch" seguido de inovulação em tempo fixo com a administração isolada de $\text{PGF}_2\alpha$ com inovulação após a detecção de cio em novilhas (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) receptoras de embrião.

Materiais e Métodos

Animais e local do experimento

O experimento foi realizado em duas propriedades nos municípios de Poços de Caldas/MG e Itapetininga/SP, nos meses de fevereiro e março de 2000. Foram utilizadas 414 novilhas mestiças *Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus* isentas de moléstias infecciosas e mantidas a pasto com sal mineral e água *ad libitum*. As receptoras utilizadas possuíam escore de condição corporal 3,0 (escala de 1 a 5; 1 = muito magra e 5 = muito gorda).¹³ Destas, 69 novilhas foram selecionadas para acompanhamento da dinâmica folicular e 345 para avaliação dos tratamentos a campo.

Experimento 1. Avaliação da dinâmica folicular

Tratamento hormonal

Os animais do Grupo 1 (G1, n=35) receberam 25 mg de GnRH (D-9), IM (Lecirelina; Gestran-plus®; Tecnopec) sendo aplicado, 7 dias mais tarde (D-2), 15 mg de análogo da $\text{PGF}_2\alpha$, IM (Luprostiol; Prosolvin®; Intervet). Após 48 horas da administração da $\text{PGF}_2\alpha$ (D0), os animais receberam 25 mg de GnRH, IM. As novilhas do G2 (n=34) receberam aplicação única de 15 mg de $\text{PGF}_2\alpha$, IM em dia desconhecido

Figura 1

Esquema de sincronização do estro e da ovulação, dos exames ultra-sonográficos e da observação do comportamento de estro em receptoras de embrião bovino (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) tratadas com o protocolo “Ovsynch” (G1) e com dose única de $PGF_{2\alpha}$ (G2)

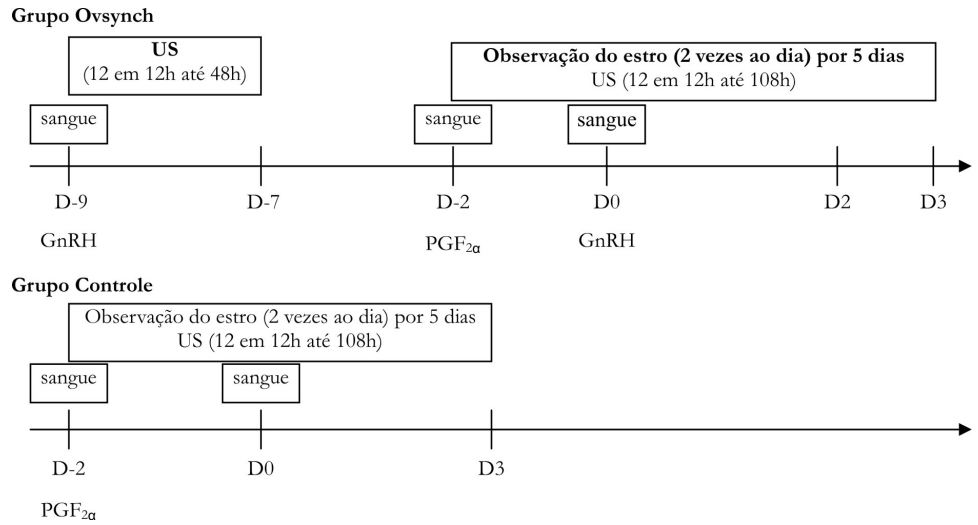
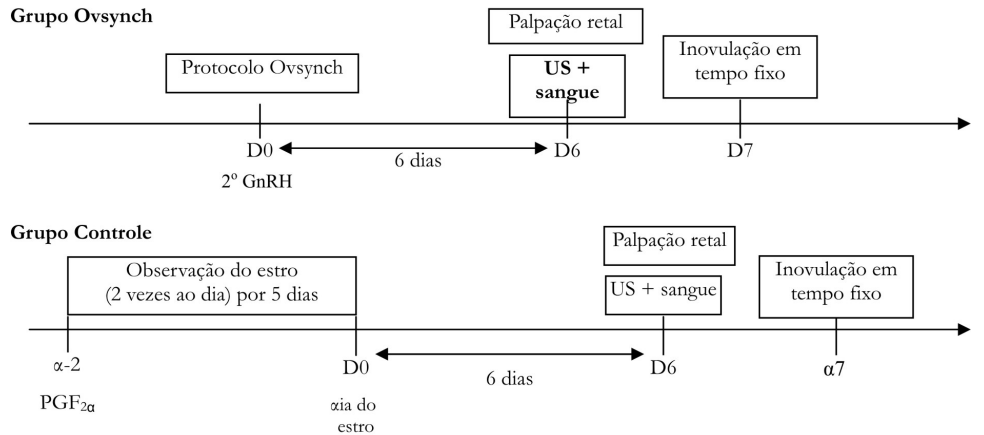


Figura 2

Esquema de sincronização do estro e da ovulação, dos exames ultra-sonográficos e da observação do comportamento de estro em receptoras de embrião bovino (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) tratadas com o protocolo “Ovsynch” (G1) e com dose única de $PGF_{2\alpha}$ (G2)



do ciclo estral.

Avaliação da dinâmica folicular

No G1 foram realizados exames ultra-sonográficos via transretal (Pie Medical Scanner 100 LC com transdutor de 6 e 8 MHz)

no momento da 1ª aplicação de GnRH, para verificar o “status folicular” e, em seguida, de 12 em 12h durante 48h para avaliação da dinâmica folicular e da taxa de ovulação. Os folículos que ovularam até 48h da aplicação de GnRH foram considerados responsivos ao tratamento. Outra avaliação ultra-sonográfica

foi realizada em seguida à aplicação de $\text{PGF}_2\alpha$ (12 em 12h durante 108h no G1 e no G2). Foram realizadas duas observações diárias do comportamento sexual dos animais de ambos os grupos (7:00 às 8:00 e 17:00 às 18:00 h), por 5 dias após a aplicação de $\text{PGF}_2\alpha$.

Colheita de sangue e dosagem hormonal

Amostras de sangue foram colhidas por venopunção a vácuo da jugular em tubos de Vacutainer® heparinizados (Becton & Dickinson, USA). As colheitas foram realizadas nos D-9, D-2 e D0 no G1 (n=35) e, no dia da aplicação de $\text{PGF}_2\alpha$ e 48h após esta no G2 (n=34). O sangue foi mantido refrigerado entre 2 e 8°C por até 4h e então centrifugado a 800G por 10 minutos. O plasma obtido foi transferido para tubo plástico identificado e então congelado a -20°C para posterior análise no Laboratório de Dosagens Hormonais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. A concentração plasmática de P4 foi determinada pelo teste comercial de radioimunoensaio (DPC, Diagnostic Products Cooperation, Los Angeles, USA).

Experimento 2. Avaliação dos protocolos a campo

Tratamento hormonal

Os animais do G1 (n=168) receberam 25 mg de Lecirelina (D-9) IM e, 7 dias mais tarde (D-2), 15 mg de Luprostiol, IM. Após 48h da administração de $\text{PGF}_2\alpha$, os animais receberam 25mg de GnRH, IM (D0). As novilhas do G2 (n=177) receberam aplicação única de 15 mg de $\text{PGF}_2\alpha$, IM em dia desconhecido do ciclo estral. Foram realizadas duas observações diárias do comportamento sexual dos animais de ambos os grupos (7:00 às 8:00 e 17:00 às 18:00 h). Os animais foram mantidos a pasto, à semelhança do Experimento 1.

Avaliação ultra-sonográfica e classificação dos CL para inovulação em tempo fixo

No D6 do ciclo estral (D0=dia da aplicação da 2ª dose de GnRH no G1 ou dia do estro no G2) foram realizados exames ultra-sonográficos (Pie Medical Scanner 100 LC) para aferir a área do CL em parte dos animais a serem inovulados (G1=74; G2=66). As receptoras foram consideradas aptas à inovulação quando diagnosticado CL com área superior a 1,0 cm². O CL foi ainda classificado em: CL 1 (área > 2,0 cm²), CL 2 (área entre 1,5 cm² e 2,0 cm²) ou CL 3 (área ≤ 1,50 cm²). Para as fêmeas que não foram examinadas ultra-sonograficamente (G1=94; G2=111), considerou-se aptas à inovulação aquelas que apresentaram CL diagnosticado por palpação retal.

No D7, em todas as receptoras aptas, inovulou-se um embrião a fresco (grau 1, 2 ou 3 – IETS) originário de doadoras da raça Limosin, no corno uterino ipsilateral ao CL e pelo método não cirúrgico. Os embriões foram divididos homoganeamente quanto a qualidade entre os grupos. Todas as inovulações foram realizadas pelo mesmo veterinário.

Colheita de sangue e dosagem hormonal

Amostras de sangue foram colhidas por venopunção a vácuo da jugular em tubos de Vacutainer® heparinizados. As colheitas foram realizadas 6 dias após a última aplicação de GnRH no G1 ou 6 dias após o estro no G2, juntamente com o exame ultra-sonográfico (G1=74; G2=66). O sangue foi mantido refrigerado entre 2 e 8°C por até 4 h e então centrifugado a 800G por 10 minutos. O plasma obtido foi transferido para tubo plástico identificado e então congelado a -20°C para posterior análise no Laboratório de Dosagens Hormonais da FMVZ-USP. A concentração plasmática de P4 foi determinada pelo teste comercial de radioimunoensaio (DPC).

Análise dos resultados

As variáveis binomiais como as taxas de ovulação após as aplicações de GnRH e

PGF₂α, de concepção e de prenhez foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado. As variáveis contínuas (diâmetros folicular, do folículo ovulatório, área do CL e concentração plasmática de P4) foram avaliadas por análise de variância. As diferenças entre as médias foram avaliadas pelo teste “T-Student”. Para investigar se os tratamentos sincronizaram a ovulação após a aplicação de PGF₂α, adotou-se o teste de Bartlett, que avaliou a homogeneidade da variabilidade das variáveis.

Resultados

Experimento 1. Avaliação da dinâmica folicular

Os animais do G1 apresentaram maior taxa de ovulação (P<0,05) após a 2ª aplicação de GnRH (74,3%; 26/35) quando comparado à 1ª (45,7%; 16/35). Verificou-se que dois animais (5,7%) ovularam entre as administrações de PGF₂α e do 2º GnRH. A taxa de ovulação ao final dos tratamentos não diferiu entre os grupos (G1=74,3% vs.

Tabela 1

Dinâmica folicular em receptoras de embrião bovino (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) tratadas com o protocolo “Ovsynch” (G1) e com dose única de PGF₂α (G2). Itapetininga – SP, 2000

Parâmetro	Ovsynch (G1)	PGF ₂ α (G2)	P
Taxa de ovulação - 1º GnRH (%)	45,7 (16/35) ^a	-	-
Taxa de estro após PGF ₂ α (%)	22,9 (8/35) ^c	64,7 (22/34) ^d	0,0006
Taxa de ovulação - Pós - PGF ₂ α (%)	74,3 (26/35) ^b	58,8 (20/34)	0,13
Ø do folículo no dia da PGF ₂ α (cm)	1,05 ± 0,41 (n =35)	1,04 ± 0,30 (n=34)	0,90
Ø do folículo ovulatório (cm)	1,19 ± 0,16 (n =26)	1,26 ± 0,18 (n=20)	0,17
Intervalo PGF ₂ α -ovulação (h)	74,3 ± 12,0 (n =26)	72,60 ± 21,8 (n=20)	0,74
Intervalo 1º GnRH-ovulação (h)	30 ± 7,6 (n=16)	-	-
Intervalo 2º GnRH-ovulação (h)	28,5 ± 9,6 (n=24)	-	-
P4 no dia da aplicação de PGF ₂ α (ng/ml)	1,90 ± 0,9	1,58 ± 1,4	0,12
Taxa de animais com P4 < 1 ng/ml (%)	65,7 (23/35)	58,8 (20/34)	0,36

(a ≠ b na mesma coluna; P<0,05 e c ≠ d na mesma linha P<0,01)

Tabela 2

Manifestação de estro e diâmetro folicular no D0 em novilhas receptoras de embrião bovino (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) tratadas com o protocolo “Ovsynch” (G1) e com dose única de PGF₂α (G2). Itapetininga – SP, 2000.

Estro após o 2º GnRH	Número de receptoras	Diâmetro folicular no momento do 2º GnRH – D2 (cm)
Estro (G1)	6	1,40 ± 0,20 ^a
Ausência de estro (G1)	27	1,12 ± 0,26 ^{bc}
Estro (G2)	22	1,26 ± 1,18 ^{ab}
Ausência de estro (G2)	14	1,06 ± 1,94 ^c

(a ≠ b ≠ c na mesma coluna; P<0,05).

Tabela 3

Taxas de aproveitamento, concepção e prenhez em novilhas receptoras de embrião bovino (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) tratadas com o protocolo “Ovsynch” (G1) e com dose única de PGF₂α (G2). Itapetininga – SP, 2000

	G1- Ovsynch	G2 – PGF ₂ α	P
Taxa de aproveitamento	72,6% (122/168) ^a	45,2% (80/177) ^b	<0,0001
Taxa de Concepção	49,2% (60/122)	56,3% (45/80)	0,20
Taxa de Prenhez	35,7% (60/168) ^c	25,4% (45/177) ^d	0,03

(a ≠ b; c ≠ d na mesma linha; P<0,05)

Figura 3

Distribuição das ovulações (horas) após a aplicação da PGF₂α em receptoras de embrião bovino (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) tratadas com o protocolo "Ovsynch" (G1) e com dose única de PGF₂α (G2)

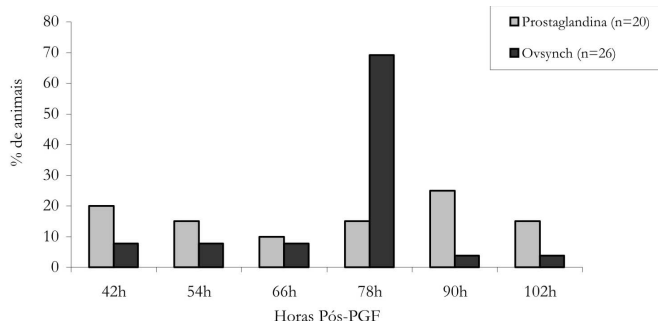


Tabela 4

Manifestação de estro, área do corpo lúteo, concentração plasmática de progesterona e taxa de concepção em novilhas receptoras de embrião bovino (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) tratadas com o protocolo "Ovsynch" (G1) e com dose única de PGF₂α (G2). Itapetininga – SP, 2000

Grupos	Número de receptoras	Área média do CL (cm ²)	Concentração de P4 (ng/ml)	Taxa de concepção (%)
G1 com manifestação de estro	32	2,69 ± 0,78 ^a	2,38 ± 1,26 ^a	53,1 (17/32) ^{d,e}
G1 sem manifestação de estro	42	1,88 ± 0,58 ^b	1,30 ± 0,76 ^b	38,1 (16/42) ^e
G2 (PGF _{2α})	66	2,37 ± 0,7 ^c	2,18 ± 0,66 ^a	57,6 (38/66) ^d

(^a ≠ ^b ≠ ^c na mesma coluna; P < 0,01 e ^d ≠ ^e; P < 0,05)

Tabela 5

Concentração plasmática de progesterona e taxa de concepção conforme a área do corpo lúteo no dia 6 do ciclo estral em novilhas receptoras de embrião bovino (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) tratadas com o protocolo "Ovsynch" e com dose única de PGF₂α. Itapetininga – SP, 2000

Número de receptoras	Área do CL (ultra-sonografia)	Área média do CL (cm ²)	Concentração de P4 (ng/ml)	Taxa de concepção (%)
77	CL1 (> 2,0 cm ²)	2,66 ± 0,51	2,44 ± 0,86 ^a	58,4 (47/77) ^d
41	CL2 (1,5 a 2,0 cm ²)	1,74 ± 0,10	1,75 ± 0,69 ^b	41,5 (17/41) ^e
22	CL3 (< 1,5 cm ²)	1,19 ± 0,20	0,96 ± 0,56 ^c	31,8 (7/22) ^e

(^a ≠ ^b ≠ ^c; P < 0,01 e ^d ≠ ^e; P < 0,05).

G2=58,8%; P>0,05; Tabela 1).

No dia da aplicação de PGF₂α, os animais apresentaram diâmetro do foliculo dominante de 1,05 ± 0,41 cm (0,3 a 2,15 cm; n=35) e de 1,04 ± 0,3 cm (0,3 a 1,7 cm; n=34; P>0,05), respectivamente para o G1 e G2. O diâmetro do foliculo ovulatório ao final do tratamento foi de 1,19 ± 0,16 cm (n=26) para o G1 e de 1,26 ± 0,18 cm (n=20) para o G2 (P>0,05; Tabela 1).

No G1, não foi verificada diferença (P>0,05) entre os intervalos 1º GnRH-ovulação (30 ± 7,6 h) e 2º GnRH-ovulação

(28,5 ± 9,6 h). O intervalo entre a aplicação da PGF₂α e a ovulação foi de 74,3 ± 12 h (n=26) para o G1 e de 72,6 ± 21,8 h (n=20) para o G2 (P>0,05; Figura 3), havendo menor variabilidade no G1 (P<0,01). Foram detectadas em estro 22,9% (8/35) das novilhas no G1 e 64,7% (22/34) no G2 (P<0,01). No D0, as novilhas em estro do G1 apresentaram maior diâmetro do foliculo ovulatório do que as não detectadas em estro (1,40 ± 0,20 cm vs. 1,12 ± 0,26 cm; P<0,05). O mesmo foi observado nas novilhas do G2 (1,26 ± 1,18 cm vs. 1,06 ± 1,94 cm; P<0,05; Tabela 2).

A concentração plasmática de P4 não influenciou ($P>0,05$) a taxa de ovulação após o 1º GnRH [$<1\text{ng/ml}=42,9\%$ (9/21) vs. $>1\text{ng/ml}=50,0\%$ (7/14)], e não diferiu entre o G1 e o G2 no dia da aplicação de $\text{PGF}_2\alpha$ ($1,90 \pm 0,9\text{ ng/ml}$ vs. $1,58 \pm 1,4\text{ ng/ml}$, respectivamente; $P>0,05$). Também não foi verificada diferença na taxa de animais com P4 acima de 1ng/ml entre os G1 (65,7%) e o G2 (58,8%; $P>0,05$). No D0 foi observado 100% de luteólise (P4 inferior a $0,4\text{ ng/ml}$) nas receptoras que apresentaram $P4 \geq 1\text{ng/ml}$ no D-2.

Experimento 2. Avaliação dos protocolos a campo

O G1 apresentou maior taxa de aproveitamento de receptoras (72,6%; 122/168) do que o G2 (45,2%; 80/177; $P<0,01$). No entanto, a taxa de concepção não diferiu, sendo de 49,2% (60/122) para o G1 e de 56,3% (45/80) para o G2 ($P>0,05$). Já as taxas de prenhez foram de 35,7% (60/168) para o G1 e de 25,4% (45/177) para o G2, apresentando diferença significativa entre os grupos ($P<0,05$; Tabela 3).

A área do CL foi de $2,23 \pm 0,74\text{ cm}^2$ para o G1 e de $2,37 \pm 0,7\text{ cm}^2$ para o G2 ($P>0,05$). Observou-se menor percentual de novilhas detectadas em estro no G1 (33,3%; 56/168) que no G2 (53,7%; 95/177; $P<0,05$). As receptoras do G1 que manifestaram estro (32/74) apresentaram CL com maior área e maior concentração plasmática de P4 ($2,69 \pm 0,78\text{ cm}^2$ e $2,38 \pm 1,26\text{ ng/ml}$, respectivamente) que àqueles que não manifestaram (42/74; $1,88 \pm 0,58\text{ cm}^2$ e $1,30 \pm 0,76\text{ ng/ml}$, respectivamente). No entanto, a taxa de concepção não diferiu entre as fêmeas que manifestaram ou não estro neste grupo (53,1% vs. 38,1%, respectivamente; $P>0,05$; Tabela 4). Nas receptoras do G2, a área do CL foi maior que nas do G1 que não manifestaram estro ($2,37 \pm 0,7$ vs. $1,88 \pm 0,58$; $P<0,01$), porém, foi menor que nas do G1 que manifestaram estro ($2,37 \pm 0,7$ vs. $2,69 \pm 0,78$, respectivamente; $P<0,01$). A concentração plasmática de P4 não diferiu entre os animais

que manifestaram estro, assim como a taxa de concepção (Tabela 4). No entanto, as receptoras do G2 apresentaram maior concentração plasmática de P4 ($2,18 \pm 0,66\text{ ng/ml}$ vs. $1,30 \pm 0,76\text{ ng/ml}$; $P<0,01$) e taxa de concepção (57,6% vs. 38,1%; $P<0,05$) que as novilhas do G1 que não manifestaram estro (Tabela 4).

Verificou-se correlação entre a área do CL e a concentração plasmática de P4 ($r=0,41$; $P<0,01$). A área do CL e a concentração plasmática de P4 interferiram na taxa de concepção (Tabela 5). Corpo lúteo com área superior determinou maior concentração plasmática de P4 ($P<0,01$) e taxa de concepção ($P<0,05$). Receptoras prenhes apresentaram maior área do CL e concentração plasmática de P4 que as receptoras vazias ($2,33 \pm 0,71\text{ cm}^2$ e $2,27 \pm 0,85\text{ ng/ml}$ vs. $2,00 \pm 0,65\text{ cm}^2$ e $1,78 \pm 0,96\text{ ng/ml}$, respectivamente; $P<0,01$).

Discussão

No Experimento 1, a 1ª aplicação de GnRH induziu a ovulação em 45,7% dos animais do G1, resultado inferior àquele observado por Wiltbank⁷—85% de ovulação em vacas pluríparas. Pursley, Mee e Wiltbank¹⁰ utilizaram o protocolo “Ovsynch” e obtiveram menor taxa de ovulação ao primeiro GnRH em novilhas que em vacas. Martinez et al.¹⁴ confirmaram a baixa taxa de ovulação em novilhas *Bos taurus indicus* (56%), que receberam tratamento com GnRH no dia 6 do ciclo estral. Estudos indicam que nem sempre o tratamento com GnRH promove a ovulação ou a luteinização do folículo dominante em novilhas, e que a emergência sincronizada da nova onda de crescimento folicular ocorre somente quando o tratamento induz a ovulação.¹⁴ A taxa de ovulação após a segunda aplicação de GnRH foi de 74,3%, considerada relativamente baixa quando comparada aos 100% de taxa de ovulação verificado em vacas *Bos taurus taurus*.¹⁰ Como, no presente experimento, o 1º GnRH não induziu eficientemente a ovulação e conseqüentemente a emergência da nova

onda de crescimento folicular, a sincronização da ovulação após o 2º GnRH pode ter apresentado comprometimentos. Confirmando as baixas taxas de ovulação deste experimento, Barros et al.¹⁵ verificaram 33% de ovulação após a primeira e 76% após a segunda administração de GnRH em vacas *Bos taurus indicus*.

Neste experimento, a concentração plasmática de P4 no momento da aplicação do 1º GnRH não interferiu na taxa de ovulação, sugerindo taxas semelhantes de ovulação na ausência ou na presença de P4. Tais achados estão em conformidade com os de Martínez et al.¹⁴ que observaram altas taxas de ovulação mesmo em animais tratados com GnRH na fase de diestro. Estes resultados sugerem que o status folicular no momento do tratamento apresenta considerável importância na taxa de ovulação de animais tratados com GnRH, independentemente da concentração plasmática de P4.

O intervalo entre a aplicação da PGF₂α e a ovulação não diferiu entre o G1 (74,3 ± 12,0 h) e o G2 (72,6 ± 21,8 h). Entretanto, observou-se maior sincronização do momento da ovulação no G1 que no G2. O momento da ovulação após a aplicação de PGF₂α e de GnRH nas receptoras *Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus* desse experimento foi semelhante às encontradas por Bodensteiner et al.⁹ e Pursley, Mee e Wiltbank¹⁰ em *Bos taurus taurus*, e Barros et al.¹⁵ em *Bos taurus indicus*.

Os animais tratados com o protocolo "Ovsynch" e que manifestaram estro após a aplicação de PGF₂α apresentaram maiores diâmetros foliculares que àqueles que não manifestaram (1,40 ± 0,20 cm vs. 1,12 ± 0,26 cm, respectivamente). Segundo alguns autores, a aplicação de GnRH interrompe o desenvolvimento folicular e conseqüentemente a produção estrogênica, pela liberação antecipada do pico pré-ovulatório de LH^{3,16}. No entanto, essa interrupção somente ocorre em folículos que não atingiram o desenvolvimento máximo.¹⁷ Assim, os resultados sugerem que os animais com manifestação de estro estavam em fase mais avançada de crescimento folicular, o que

também pode ter ocorrido nos animais do G2, que não receberam tratamento para indução da ovulação após a aplicação de PGF₂α.

Esperava-se que no G1 houvesse maior número de animais com P4 acima de 1ng/ml no D-2 que no G2, o que não foi observado. Animais que ovulam após a 1ª aplicação de GnRH, apresentam formação de CL e aumento das concentrações plasmáticas de P4.^{10,18,19} Provavelmente, isso ocorreu devido à baixa taxa de ovulação ao 1º GnRH.

No Experimento 2, o G1 apresentou maior taxa de aproveitamento de receptoras que o G2. Observou-se que 72,6% das receptoras do grupo sincronizado com GnRH/PGF₂α/GnRH foram consideradas aptas a inovulação pela presença de um CL viável no dia anterior a inovulação (D6). Segundo De Rensis e Peters³, uma das vantagens da utilização da sincronização da ovulação com GnRH e PGF₂α consiste no aumento do número de animais inseminados, aumentando assim, o número de animais prenhes ao final da estação reprodutiva. Estes dados também foram observados por Macmillan e Thatcher²⁰, que verificaram aumento do número de animais sincronizados quando se utilizou GnRH e PGF₂α comparado àqueles que receberam dose única de PGF₂α. No presente experimento, o grupo sincronizado com GnRH/PGF₂α/GnRH apresentou maior taxa de prenhez (35,7%) que o grupo tratado com dose única de PGF₂α (25,4%). Tais resultados ocorreram pelo aumento na taxa de aproveitamento, com similares taxas de concepção entre os grupos. Embora a diferença entre as taxas de concepção não tenha sido significativa, a utilização do protocolo de inovulação em tempo fixo apresenta como contrapartida ausência da necessidade de detecção de estro e aumento na taxa de prenhez.

É importante ressaltar que os animais deste experimento apresentavam boa condição corporal¹³ (3,0), com alto grau de ciclicidade, o que proporcionou resultados satisfatórios quando inovuladas em tempo fixo com o protocolo GnRH/PGF₂α/GnRH. Geary et al.²¹ obtiveram maiores taxas de concepção em

fêmeas bovinas tratadas com GnRH que apresentavam melhor condição corporal. De acordo com Cavallieri e Fitzpatrick²², a condição corporal exerce influência direta na ciclicidade ovariana e, conseqüentemente, na resposta aos tratamentos que visam controlar o ciclo estral e a ovulação.

Nesse experimento, foram verificadas concentrações semelhantes de P4 em animais do G1 – que manifestaram estro - e do G2. No entanto, ao comparar as concentrações de P4 dos animais do G1 – sem manifestação de estro - com receptoras do G2, a diferença mostrou-se significativa. Estes resultados sugerem que os animais sem manifestação de estro tiveram o desenvolvimento folicular interrompido pela antecipação do pico pré-ovulatório de LH³, proporcionando a ovulação de folículos que não atingiram o diâmetro máximo, acarretando a diminuição da área do CL e da síntese de P4. Mantovani et al.²³ verificaram associação entre os diâmetros do folículo dominante, do CL e a concentração plasmática de P4 em novilhas *Bos taurus indicus* receptoras de embrião.

No presente experimento, também foi observado que a área do CL influenciou a concentração plasmática de P4 e a taxa de concepção de receptoras de embrião bovino *Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*. Verificou-se que CL maior proporcionou maiores concentrações plasmáticas de P4 e taxa de concepção. De acordo com Vasconcelos et al.²⁴, os CL que possuem maior área secretam maiores quantidades de P4, o que pode ter efeito positivo no reconhecimento materno da gestação e, conseqüentemente, na taxa de prenhez.

Receptoras com CL 1 (> 2,0 cm²) apresentaram maiores concentrações plasmáticas de P4 e taxa de concepção que àquelas com CL 2 (1,5 a 2,0 cm²) e CL 3 (< 1,5cm²). Além disso, as novilhas prenhes apresentaram concentrações plasmáticas de P4 superiores às das novilhas vazias. Essas observações são similares aos achados de Vasconcelos²⁵ e Taponen et al.¹⁷, que observaram que o tamanho do CL pode ser utilizado como método para estimar a função

secretora de P4 e a taxa de concepção em bovinos. Aparentemente, a concentração de P4 está relacionada ao reconhecimento materno-fetal em bovinos¹³. Falhas nessa interação podem desencadear o processo de luteólise, o que irá culminar com a morte do embrião.²⁶ Mann et al.²⁷ demonstraram que vacas com maiores concentrações de P4 possuíam embriões que sintetizavam mais bIFN-t, sugerindo que o aumento da concentração de P4 é benéfico para o desenvolvimento embrionário. Esse achado pode explicar o aumento na taxa de concepção das receptoras de embrião com maiores diâmetros do CL e concentração plasmática de P4 no presente estudo.

Embora alguns autores tenham verificado efeitos benéficos do aumento nas concentrações plasmáticas de P4 sobre a taxa de concepção, outros não verificaram o mesmo. Tríbulo et al.²⁸ não obtiveram incremento na taxa de concepção após o tratamento com CIDR-B inserido no momento da transferência de embriões. Do mesmo modo, Ellington et al.²⁹ não observaram aumento na taxa de prenhez em receptoras tratadas com GnRH no mesmo momento. Garcia e Salaheddine³⁰, trabalhando com receptoras *Bos taurus taurus*, também não obtiveram diferença na taxa de prenhez e na concentração plasmática de P4 conforme o diâmetro do CL. Como nestes experimentos as taxas de concepção foram acima de 60%, é provável que o aumento nas concentrações plasmáticas de P4 não exerça efeito positivo quando a taxa de concepção é elevada.

Foi verificado menor percentual de receptoras em estro no G1 que no G2, apesar da maior taxa de aproveitamento no G1. Com a luteólise, a relação estrógeno/P4 aumenta, promovendo manifestações externas de estro e mudanças nos padrões de liberação de gonadotrofinas³. No protocolo “Ovsynch”, conforme já relatado no Experimento1, a produção de estradiol pelo folículo ovulatório pode ter sido bloqueada pela antecipação do pico de LH promovido pela 2ª aplicação de GnRH, como relatado por Fortune, Rivera e

Komar.¹⁶ Assim, o número de novilhas detectadas em estro foi maior para o grupo com luteólise induzida pela $\text{PGF}_2\alpha$ (G2) do que para o G1.

Em resumo, o protocolo "Ovsynch",

quando empregado para inovulação em tempo fixo, aumenta as taxas de ovulação sincronizada, de aproveitamento e de prenhez em novilhas *Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus* receptoras de embrião.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the efficacy of the synchronization of ovulation for fixed-time embryo transfer in crossbred recipient heifers (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*). At Experiment 1, ovarian ultrasonography was performed to evaluate follicular dynamics during the "Ovsynch" protocol (G1; n=35) or single $\text{PGF}_2\alpha$ injection (G2; n=34). At Experiment 2, the same treatments were used at field conditions in 168 (G1) and 177 (G2) heifers. On D6, ovarian ultrasonography and blood collection for P4 assay were performed. On D7, a embryo was transferred. At Experiment 1, 45.7% of the heifers ovulated after the 1st and 74.3% after the 2nd GnRH injection ($P<0.05$). The ovulation rate in G2 was 58.8%. In G2, 64.7% of the heifers were detected in estrus and in G1, 22.9% ($P<0.01$). At Experiment 2, G1 had more selected heifers for embryo transfer than G2 (72.6% vs. 45.2%; $P<0.01$). Conception rates were 49.2% and 56.3% in G1 and G2, respectively ($P>0.05$). Thus, the pregnancy rate in G1 was 35.7% and 25.4% in G2 ($P<0.05$). Estrus was detected in 53.7% of the recipients in G2 and 33.3% in those of the G1 ($P<0.05$). It was verified that CL with larger area induced an increase on P4 concentration and on the conception rate of both groups ($P<0.05$). The synchronization of ovulation for fixed-time embryo transfer increased the ovulation, the selection and the pregnancy rates in recipient heifers.

Key-words:

Progesterone.
Pregnancy rate.
Embryo recipient.
Bovine.
Corpus Luteum.

Referências

1. TWAGIRAMUNGU, H.; GUILBAULT, L. A.; DUFOUR, J. J. Synchronization of ovarian waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: a review. **Journal Animal Science**, v. 73, p. 3141-3151, 1995.
2. LARISON, L. L.; BALL, P. J. H. Regulation of estrus cycle in dairy cattle: a review. **Theriogenology**, v. 38, p. 255-267, 1992.
3. DE RENSIS, F.; PETERS, A. R. The control of follicular dynamics by $\text{PGF}_2\alpha$, GnRH, hCG and oestrus synchronization in cattle. A review. **Reproduction Domestic Animal**, v. 34, p. 49-59, 1999.
4. SCHIMITT, E. J. P. et al. Use of a gonadotropin-releasing hormone or human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle. **Journal Animal Science**, v. 74, p. 1084-1091, 1996.
5. THATCHER, W. W. et al. New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 33, p. 27-49, 1993.
6. VASCONCELOS, J. L. M. Avaliação do protocolo de sincronização de ovulação "Ovsynch" e de fatores relacionados à associação entre produção de leite e taxa de concepção. 1998. 128 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1998.
7. WILTBANK, M. C. How information on hormonal regulation of the ovary has improved understanding of timed breeding programs. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1997. Proceedings... p. 83-97.
8. BODENSTEINER, K. J. et al. Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. **Theriogenology**, v. 45, p. 455-512, 1996a.
9. BODENSTEINER, K. J. et al. Synchronization of emergence of follicular wave in cattle. **Theriogenology**, v. 45, p. 1115-1128, 1996b.
10. PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using $\text{PGF}_2\alpha$ and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, p. 915-923, 1995.
11. BARROS, C. M.; FERNANDES, P.; NOGUEIRA, M. F. G. Controle farmacológico do ciclo estral e superovulação em zebuínos de corte. In: SIMPÓSIO SOBRE O CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES. **Anais...** São Paulo: Fundação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, 2000. p. 158-189.

12. PURSLEY, J. R. et al. A. Pregnant rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at synchronization of ovulation. **Journal Dairy Science**, v. 80, p. 295-300, 1997.
13. BINELLI, M. et al. Anti-luteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1451-1463, 2001.
14. MARTINEZ, M. F. et al. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 57, p. 23-33, 1999.
15. BARROS, C. M. et al. Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using GnRH, PGF₂α and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 53, p. 1121-1134, 2000b.
16. FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; KOMAR, C. M. Selection and differentiation of dominant ovarian follicle in cattle. In: BR MONOGRAPHS OF REPRODUCTION & CATALOG GROUP. Ribeirão Preto – SP: Arte e Ciência, USP, 2001, p. 21-38.
17. TAPONEN, J. et al. Induction of ovulation with gonadotropin-releasing hormone during proestrus in cattle: influence on subsequent follicular growth and luteal function. **Animal Reproduction Science**, v. 55, p. 91-105, 1999.
18. MARQUES, M. O. et al. Avaliação ultra-sonográfica e concentração plasmática de progesterona em novilhas *Bos taurus* x *Bos indicus* submetidas a diferentes tratamentos no dia 7 do ciclo estral. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1., Córdoba. 2001. **Anais...** v. 1, p. 265.
19. RUSBRIDGE, S. M.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. A. Comparison of GnRH-induced corpora lutea and spontaneously formed CL in heifers. **Journal Reproduction Fertility. Abstract series**, v. 9, p. 33, 1992.
20. MACMILLAN, K. L.; THATCHER, W. W. Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. **Biology Reproduction**, v. 45, p. 883-889, 1991.
21. GEARY, T. W. et al. Pregnancy rates of postpartum beef cows that were synchronized using Syncromate-B® or the ovsynch protocol. **Journal Animal Science**, v. 76, p. 1523-1527, 1998.
22. CAVALIERI, J.; FITZPATRICK, L. A. Artificial insemination of *Bos indicus* heifers: The effects of body weight, condition score, ovarian cyclic status and insemination regimen on pregnancy rate. **Australian Veterinary Journal**, v. 72, p. 441-447, 1995.
23. MANTOVANI, A. P. et al. Aumento nas dimensões do folículo dominante e do corpo lúteo, da concentração plasmática de progesterona e da taxa de aproveitamento de receptoras de embrião bovino sincronizadas com CIDR-B por tempo prolongado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, p. 231-233, 2002.
24. VASCONCELOS, J. L. M. et al. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v. 56, p. 307-314, 2001.
25. VASCONCELOS, J. L. M. Controle do estro e da ovulação visando na inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de leite. In: CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES. São Paulo: Fundação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, 2000, p. 115-157.
26. THATCHER, W. W. et al. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. **Theriogenology**, v. 47, p. 131-140, 1997.
27. MANN, G. E. et al. The regulation of interferon tau production and uterine receptors during early pregnancy. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 317-328, 1999. Supplement.
28. TRÍBULO, R. et al. Pregnancy rates in recipients receiving CIDR-B devices immediately following embryo transfer. **Theriogenology**, v. 47, n. 5; p. 372, 1997. Abstract.
29. ELLINGTON, J. et al. The use of a GnRH analogue in embryo transfer field trial. **Theriogenology**, v. 33, n. 1, p. 225, 1990. Abstract.
30. GARCIA, A.; SALAHEDDINE, M. Ultrasonic morphology of the corpora lutea and central luteal cavities during selection of recipients for embryo transfer. **Reproduction Domestic Animal**, v. 35, p. 113-118, 2000.