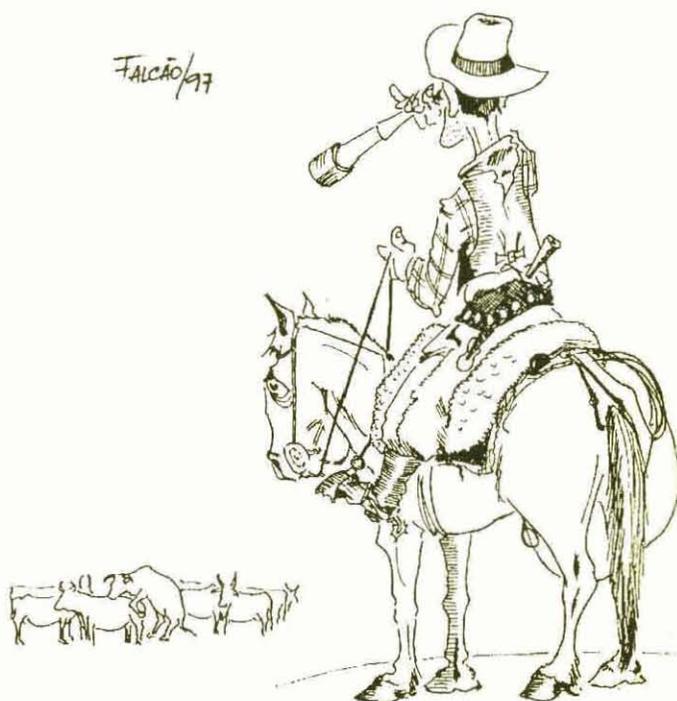


MANUAL DE SINCRONIZAÇÃO DE CIOS EM OVINOS E BOVINOS



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente: Fernando Henrique Cardoso

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO

Ministro: Francisco Turra

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA

Presidente: Alberto Duque Portugal

Diretores: Dante Daniel Giacomelli Scolari

Elza Angela Battaglia Brito da Cunha

José Roberto Rodrigues Peres

CENTRO DE PESQUISA DE PECUÁRIA DOS CAMPOS SULBRASILEIROS – CPPSuI

Chefe Geral: Eduardo Salomoni

Chefe Adjunto Técnico: Roberto Silveira Collares

Chefe Adjunto de Apoio: José Felipe Carbonell Pereira

Documentos, 13/98

ISSN 0103-376X

Julho, 1998

MANUAL DE SINCRONIZAÇÃO DE CIOS EM OVINOS E BOVINOS

Carlos José Hoff de Souza
José Carlos Ferrugem Moraes

Embrapa

Pecuária Sul

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Pecuária Sul

Área de Comunicação Empresarial e Negócios Tecnológicos

BR 153 – km 595 – Vila Industrial

Caixa Postal 242

CEP 96400-970 – Bagé, RS

Tel.: (0532) 42-8499 – FAX: (0532) 42-4395

Tiragem: 500 exemplares

Comitê de Publicações

Coordenador: Roberto Silveira Collares

Membros: Ana Maria Sastre Sacco

Fernando Rogério Costa Gomes

Flávio Augusto Menezes Echevarria

Joal José Brazzalle Leal

José Carlos Ferrugem Moraes

Produção gráfica

Diagramação e capa: Roberto Cimirro Alves

Arte da capa: Cláudio Falcão

Souza, C.J.H. de & Moraes, J.C.F. Manual de Sincronização de Cios em Ovinos e Bovinos. Bagé, Embrapa Pecuária Sul, 1998. 76p.

(Embrapa Pecuária Sul, Documentos, 13)

1. Cio. 2. Sincronização. 3. Fisiologia. 4. Reprodução. I. Título.

CDD 636.089

SUMÁRIO

Apresentação	05
1. O CICLO ESTRAL	07
1.1. Crescimento folicular	07
1.1.1. Folículos primordiais	09
1.1.2. Folículos comprometidos	09
1.1.3. Folículos responsivos a gonadotrofinas	10
1.1.4. Folículos dependentes de gonadotrofinas	12
1.1.5. Folículos ovulatórios	13
1.2. Cio	14
1.3. Luteinização e ovulação	15
1.4. Desenvolvimento do corpo lúteo	18
1.5. Função plena do corpo lúteo	18
1.6. Luteólise	19
2. GONADOTROFINAS	21
2.1. Controle da secreção das gonadotrofinas	23
2.2. Controle hormonal do ciclo estral	26
2.2.1. Fase luteínica	27
2.2.2. Fase folicular	30
2.3. Anestro	31
3. MÉTODOS DE SINCRONIZAÇÃO DE CIOS EM OVINOS	34
3.1. Efeito macho	35
3.2. Alternativas hormonais para sincronização de cios na estação reprodutiva	38
3.2.1. Progestágenos	38
3.2.2. Prostaglandinas	41
3.3. Alternativas hormonais para sincronização/indução de cios fora da estação reprodutiva	44
3.3.1. Progestágenos e gonadotrofina sérica eqüina	44
3.4. Comparação de despesas e resultados esperados	46
4. MÉTODOS DE SINCRONIZAÇÃO DE CIOS EM BOVINOS	53
4.1. Controle do ciclo estral com progesterona e progestágenos	54
4.2. Esponjas intra-vaginais (Sincrobovi)	56
4.3. Controle do ciclo estral com prostaglandinas	60
4.4. Comparação de despesas e resultados esperados	63
5. REFERÊNCIAS CITADAS	68

APRESENTAÇÃO

Para o atendimento da demanda de treinamento de mão de obra especializada em práticas de sincronização deaios em ovinos e bovinos, o Centro de Pesquisa de Pecuária dos Campos Sulbrasilieiros – CPPSul, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, promoveu em Bagé, no mês de abril próximo passado, um “Curso sobre Sincronização deaios em ovinos e bovinos”. Para um melhor aproveitamento no curso e disponibilização de uma fonte de consulta atualizada e condensada em português, foi preparado o “Manual de Sincronização deaios”. A idéia central foi de preparar um material didático para consulta posterior, quando as técnicas venham a ser implementadas pelos usuários.

Algumas mensagens sobre o uso das técnicas de sincronização devem ser apresentadas para evitar que as possíveis vantagens das mesmas venham a se transformar em desvantagens ao produtor e condená-las ao desuso. O primeiro aspecto a ser considerado é que as técnicas de sincronização devem ser empregadas quando já estão atendidas as necessidades básicas de manejo e de alimentação dos animais; o segundo, é que a sincronização deaios é uma tecnologia complementar à inseminação artificial e seu uso em associação com monta natural deve ser monitorado cuidadosamente; e, finalmente, que existem protocolos básicos já bem definidos através de estudos planejados para essa finalidade, portanto, USE os protocolos já testados NÃO INVENTE sem maiores estudos sobre cada técnica.

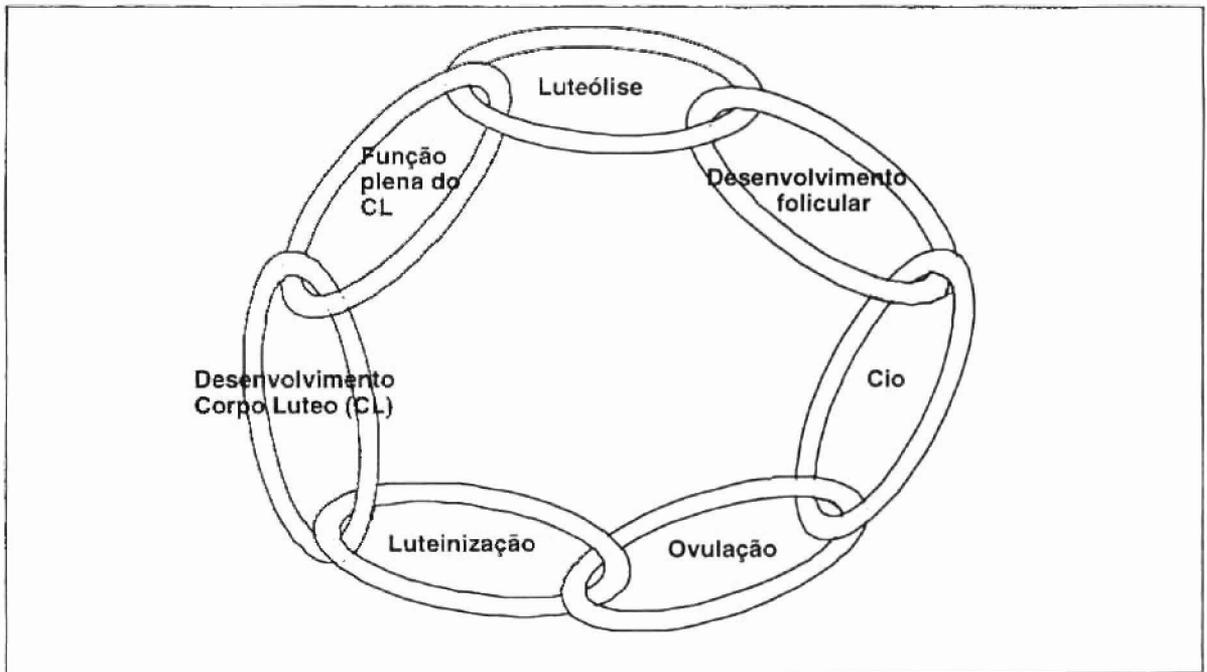
Cabe agradecer ao Dr. Carlos Jaime (Embrapa Pecuária Sul) pela leitura e sugestões apresentadas e ao Dr. Graeme Martin (University of Western Australia) pela cessão de algumas ilustrações de sua autoria.

Os autores

1. O CICLO ESTRAL

As fêmeas ruminantes domésticas são poliéstricas, ou seja, quando não estão prenhes e a condição ambiental é favorável, apresentam cio ou estro em intervalos regulares. O intervalo mais comum é de 21 dias na vaca e 17 dias na ovelha. Durante o ciclo estral ocorre uma cadeia de eventos (Figura 1) que se repetem até que esta cadeia se rompa com o impedimento da luteólise por ocasião da prenhez (nas ovelhas também pode ser por ocasião do anestro estacional que será discutido mais tarde).

Figura 1: Eventos que ocorrem durante o ciclo estral dos ruminantes

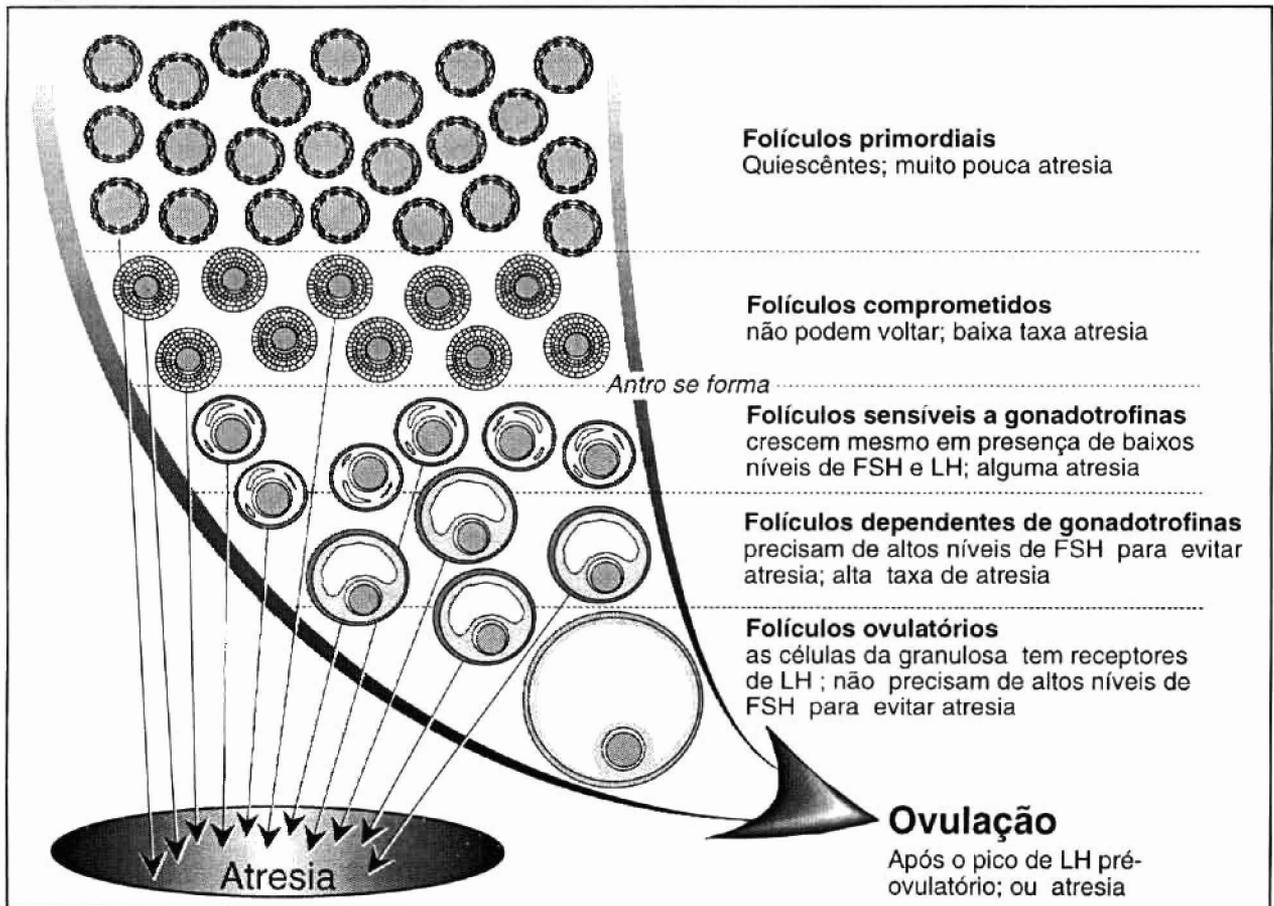


1.1. Crescimento folicular

Na vaca e na ovelha o processo de foliculogênese (crescimento/maturação folicular) tem início com a

formação dos folículos durante o estágio final da vida fetal, ou seja, ao nascimento a terneira ou cordeira já tem determinado o seu número de folículos primordiais. A maioria destes folículos durante o seu processo de maturação vão se degenerar no processo conhecido por atresia folicular enquanto que uma minoria vai chegar a completar sua maturação e ovular. As diversas etapas da foliculogênese podem ser divididas de acordo com as características fisiológicas de cada grupo de folículos nas seguintes categorias: folículos primordiais, comprometidos, sensíveis a gonadotrofinas, dependentes de gonadotrofinas e ovulatórios (Figura 2).

Figura 2: Esquema das etapas chave da foliculogênese nos ruminantes



G. B. Martin

1.1.1. Folículos primordiais

Os folículos primordiais compõem o estoque de folículos formados durante a fase fetal e que vão se desenvolver durante a vida reprodutiva da fêmea. Estes folículos em estado quiescente são caracterizados por um ovócito bloqueado no estágio de prófase da primeira divisão meiótica, sem zona pelúcida, rodeado por uma camada de células da granulosa de aspecto achatado e envolvidas pela membrana basal. Os folículos neste estágio não tem suprimento sanguíneo próprio e desta forma recebem nutrientes por difusão (1).

1.1.2. Folículos comprometidos

Uma vez que os folículos reiniciam seu desenvolvimento não podem voltar ao estado de quiescência e estão comprometidos a crescer, resultando em atresia ou ovulação. O mecanismo determinante da passagem do estágio de folículo primordial para o de folículo primário (onde as células da granulosa começam a se avolumar e multiplicar) não é totalmente conhecido, mas acredita-se que este ocorra sem a participação de gonadotrofinas. Existem evidências apontando para os fatores GDF-9 (fator de crescimento e diferenciação 9, expresso pelo ovócito) e bFGF (fator de crescimento fibroblástico básico) como potencialmente envolvidos no reinício do desenvolvimento folicular.

Os sinais do reinício do desenvolvimento folicular são a síntese RNA e proliferação das células da granulosa, seguidas de aumento de tamanho do ovócito. O ovócito cresce rapidamente, chegando ao seu tamanho total precocemente no processo de desenvolvimento folicular e muito antes que as células da granulosa parem de proliferar. As células da granulosa inicialmente tem um aspecto achatado e vão se tornando cuboidais a medida que se desenvolvem e expressam mRNA para receptor de FSH (Hormônio Folículo Estimulante), enquanto a segunda camada de células da granulosa emerge. Subseqüentemente as células da teca evoluem das células vizinhas do estroma.

Na ovelha adulta a qualquer momento existem até 400 folículos comprometidos ou pré-antrais. Eles variam em diâmetro de 0,03 mm a 0,1 mm e podem conter até 5 mil células da granulosa no maior diâmetro (2,3).

1.1.3. Folículos responsivos a gonadotrofinas

Na ovelha os folículos responsivos a gonadotrofinas variam entre 0,1 a 2,5 mm e também são conhecidos como folículos pré-antrais tardios ou pequenos folículos antrais. Eles possuem receptores para FSH nas células da granulosa e receptores de LH (Hormônio Luteinizante) nas células da teca, entretanto, suporte de gonadotrofinas não é essencial para o seu desenvolvimento (3,4). As células da granulosa originadas de folículos com diâmetro

maior que 0,1 mm podem gerar resposta de segundo mensageiro (AMP cíclico) quando estimuladas por FSH *in vitro* (5).

A medida que os folículos crescem, aumenta a resposta à gonadotrofinas e eles passam a secretar progesterona e andrógenos quando cultivados *in vitro* (6). Entretanto, eles não secretam volumes detectáveis de estradiol *in vitro* até que atinjam diâmetro maior que 0,3 mm (5,6). Embora folículos próximos do estágio de formação do antro tenham o potencial de sintetizar todos os principais hormônios esteróides ovarianos, o fazem em quantidades bastante pequenas. Portanto o desenvolvimento folicular precoce provavelmente ocorre independente de esteróides endógenos (7).

A formação de fluido que preenche a cavidade antral ocorre em folículos com diâmetro ao redor 0,2-0,4 mm (ovários fixados) (2,8). Logo após a formação do antro os folículos entram num período rápido de crescimento, marcado por alta proliferação celular (granulosa e teca), o que se reflete nos elevados índices mitóticos observados em folículos entre 0,7 e 1,5 mm, declinando quando estes atingem diâmetro maior que 2,2 mm (2,8). Tem sido estimado que na ovelha um folículo leva aproximadamente 5 dias para crescer de 0,5 a 2,2 mm em diâmetro (8).

Na ovelha adulta, o tempo para que um folículo evolua até o estágio antral foi estimado por histologia em 130 dias (2), esta estimativa foi recentemente confirmada

in vivo em ovelhas que receberam implante autógeno de ovário (9). Após a formação do antro a velocidade do crescimento folicular aumenta, tendo sido estimado que são necessários entre 34-43 dias para um folículo alcançar o tamanho de 5 mm em diâmetro (2,8). Atresia precoce é raramente observada em folículos com diâmetro menor que 1 mm enquanto que a maior incidência de atresia ocorre quando os folículos tem diâmetro entre 1,5 e 2,5 mm.

1.1.4. Folículos dependentes de gonadotrofinas

O requerimento de gonadotrofinas para crescimento folicular acima de 2,5 mm em diâmetro, tem sido demonstrado em várias circunstâncias tais como: após hipofisectomia (10), imunização ativa contra GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas) (11) e infusão crônica de agonistas de GnRH (12). Das gonadotrofinas, somente o FSH, tem sido observado como capaz de estimular desenvolvimento folicular enquanto que a presença de somente LH não é capaz de suportar desenvolvimento de folículos até o estágio pré-ovulatório (13).

A necessidade aguda de FSH nos folículos dependentes de gonadotrofinas é a característica que distingue esta classe dos folículos responsivos a gonadotrofinas e dos folículos ovulatórios, tornando esta classe particularmente susceptível a atresia (14). Durante

este estágio os folículos sobreviventes dobram seu tamanho em aproximadamente 4 dias. Este crescimento rápido em volume é devido quase que exclusivamente a acumulação de fluido folicular, já que a taxa de proliferação celular declina progressivamente após o diâmetro de 3,5 mm (2,8). Simultâneo com o declínio da proliferação celular, as células da granulosa e da teca se diferenciam, o que se reflete no aumento de responsividade a FSH. A resposta a gonadotrofina medida pela produção de cAMP, nas células da granulosa, aumenta 2-10 vezes enquanto o folículo progride de 2,5 para 6 mm em diâmetro (15).

Esta fase do desenvolvimento folicular é crucial já que neste momento ocorre a sincronização do desenvolvimento/maturação terminal do folículo e o ciclo estral. Desta forma, permitindo que o folículo ovulatório cumpra o seu propósito que é de liberar um ovócito viável, num ambiente adequado e no momento apropriado para então maximizar as chances de concepção.

1.1.5. Folículos ovulatórios

Os folículos estrogênicos ou ativados também são designados como dominantes pela sua habilidade de resistir a atresia e passar aos estágios finais de maturação e não pela sua ação direta nos folículos contemporâneos (16). Estes folículos tem o potencial de se tornar ovulatórios se expostos a um ambiente endócrino

adequado, especialmente um padrão pulsátil de LH com alta frequência.

A principal característica desta classe de folículos é a expressão de receptores de LH na camada de células da granulosa (17,18) e altas concentrações de estradiol no fluído folicular (19). Estes folículos secretam mais que 80% do estradiol e também são responsáveis por 55% da inibina liberada na circulação (20). As mudanças da arquitetura intracelular destes folículos também reflete a sua alta capacidade de produção de hormônios, já que eles apresentam maior área de retículo endoplasmático liso, de sistema de Golgi e o dobro de membranas mitocondriais quando comparado com folículos antrais pequenos (5).

1.2. Cio

O cio ou estro é um complexo de sinais fisiológicos e comportamentais que ocorrem logo antes da ovulação. A duração do cio varia de 24-48 horas na ovelha e de 12-24 horas na vaca. Os sinais de cio são: a fêmea fica imóvel quando montada, vulva edemaciada, mucosa vaginal hiperêmica, descarga de muco vaginal claro e elástico, inserção da cauda arrepiada, inquietude, formação de grupo, lordose e algumas vezes redução no consumo alimentar e na produção de leite. Muitos destes sinais também podem estar presentes no pró-estro, por isto, o sinal da fêmea ficar imóvel quando montada é o mais característico e confiável da manifestação de cio.

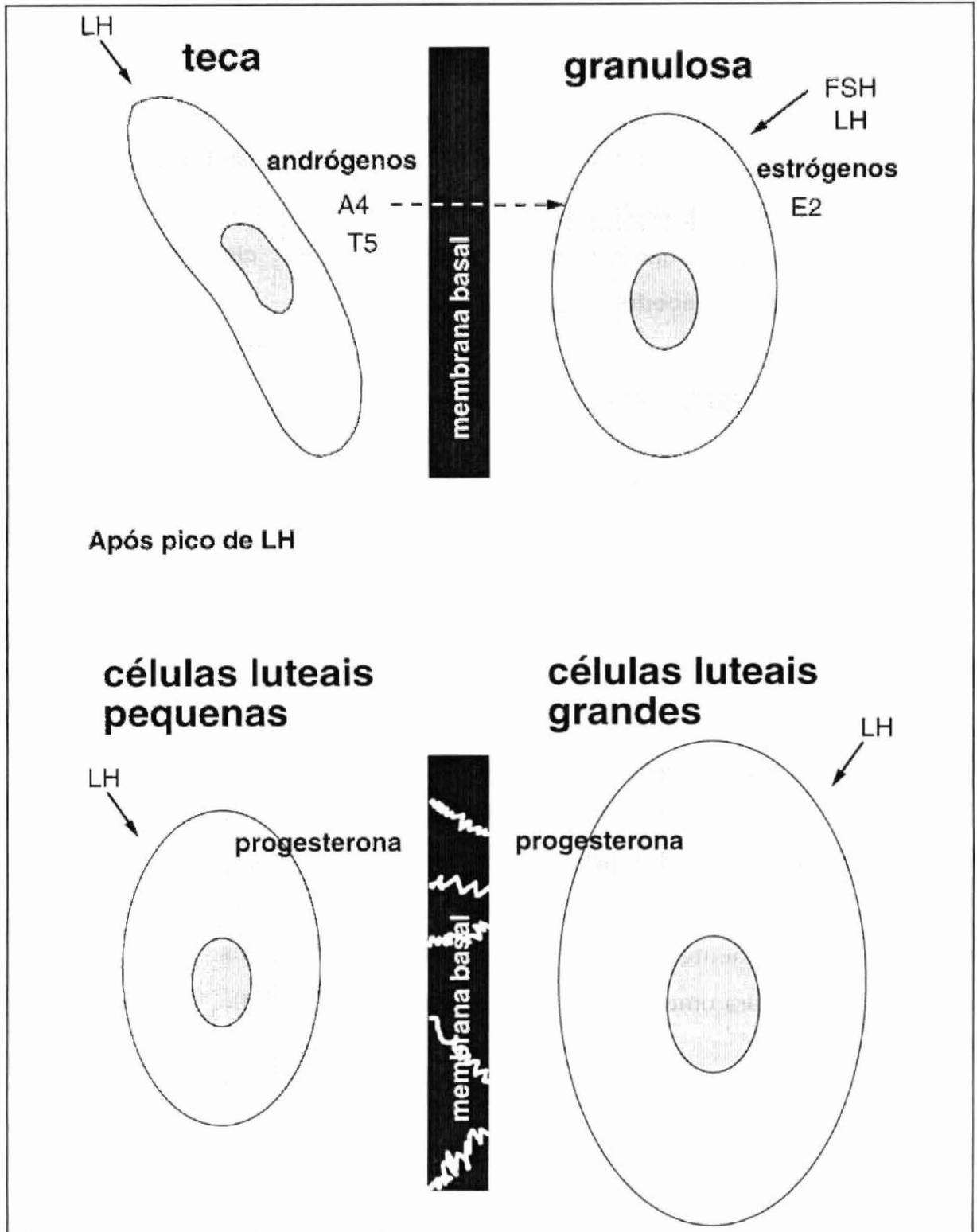
Estes sinais de cio são induzidos pela elevada concentração de estradiol na circulação, proveniente do folículo pré-ovulatório, que atua em centros cerebrais (principalmente hipotalâmicos) e medulares. A ação do estradiol é potencializada pela pré-exposição à progesterona, fato este, que é lógico e não trás maiores conseqüências quando num ciclo estral normal, mas que tem implicações quando da sincronização de cio notadamente em períodos de anestro.

1.3. Luteinização e ovulação

O pico de LH que inicia síncrono com o começo do cio resulta em dois fenômenos simultâneos mas independentes: a luteinização das camadas celulares da parede folicular (granulosa e teca) e a ovulação que é a ruptura do folículo ovulatório (dominante, maduro).

O processo de luteinização resulta em mudanças estruturais e funcionais pela ruptura da membrana basal, que no folículo separa a camada da teca da camada granulosa (avascular), causando mudanças bioquímicas que tornam uma estrutura que secreta predominantemente andrógenos (teca) e estrógenos (granulosa) para uma que secreta progesterona (Figura 3).

Figura 3: Esquema das mudanças morfológicas e funcionais das células foliculares antes e após o pico de LH pré-ovulatório



A ovulação nos mamíferos é similar ao processo inflamatório e ocorre durante os primeiros estágios do processo de luteinização que é iniciado pelo pico de gonadotrofinas originário da hipófise. Embora o processo de luteinização não necessite da ovulação, o processo ovulatório é parte integrante dos estágios iniciais da luteinização. Durante a ovulação os folículos pré-ovulatórios tornam-se hiperêmicos dentro de poucas horas do pico de LH. Esta hiperemia é provavelmente mediada por agentes vasoativos tais como: histamina, quininas e produtos metabólicos da lipogênese do ácido aracdônico. Neste período também aumentam os níveis de proteases e metaloproteinases como ativador de plasminogênio, calicreína e colagenase. Também ocorre aumento de permeabilidade dos capilares da teca que leva a aumento do volume folicular, acompanhado de dissociação dos fibroblastos da teca. Este afrouxamento do tecido do ápice do folículo aliado a ação das proteinases, especialmente a colagenase, leva a formação do estigma ovulatório, que no momento da ovulação tem aproximadamente 20% da espessura da parede do folículo. A medida que o processo ovulatório prossegue as camadas da granulosa e da teca se rompem com modesto aumento da pressão intra-folicular e o ovócito então é liberado para ser captado pelo oviduto através da pressão negativa gerada pelos movimentos ciliares.

1.4. Desenvolvimento do corpo lúteo

Após a luteinização, a estrutura que antes formava o folículo sofre grandes alterações morfológicas, marcadas pela intensa angiogênese, proliferação de células fibroblásticas e hipertrofia das células luteínicas. As células esteroidogênicas, entretanto, não proliferam após a ovulação, portanto a qualidade da função lútea depende do estado do folículo que a originou. As células da granulosa dão origem as células luteais grandes e as da teca as pequenas células luteais (Figura 3), cada linhagem celular mantém antígenos de membrana específicos que indicam a sua origem, desaparecendo com o decorrer do tempo no caso de gestação. As células grandes tem formato arredondado ou poliédrico, possuindo características esteroidogênicas e grânulos secretórios próximos a membrana, que são constituídos de relaxina entre outros hormônios. A células pequenas são menores que 20 μm , tem formato irregular e numerosas gotículas de lipídios no citoplasmas mas não apresentam grânulos secretórios. Ambas as células constituem aproximadamente 50% do volume do corpo lúteo sendo o restante formado por vasos e células fibroblásticas.

1.5. Função plena do corpo lúteo

O corpo lúteo começa a se organizar em seguida da ovulação, mas nos ruminantes só começa a funcionar

após 1 ou 2 dias, tendo função plena após 5 dias. As variações das concentrações de progesterona durante a fase luteínica refletem os sucessivos estágios de crescimento, manutenção e regressão do corpo lúteo. A funcionalidade do corpo lúteo dos ruminantes (medido pela secreção de progesterona) é regulada por LH proveniente da hipófise anterior. Após a ligação do LH ao seu receptor, este induz a ativação da adenil-ciclase e subsequente aumento dos níveis de cAMP. A presença de cAMP estimula a esteroidogênese em poucos minutos, facilitando o transporte de colesterol para dentro da célula e do meio intracelular para dentro da mitocôndria, resultando em aceleração da conversão de colesterol em pregnenolona pela ação da enzima clivadora de cadeia lateral (side chain cleavage), localizada na membrana interna da mitocôndria. A ação do LH (via cAMP) a longo prazo é de aumentar a concentração das enzimas esteroidogênicas.

1.6. Luteólise

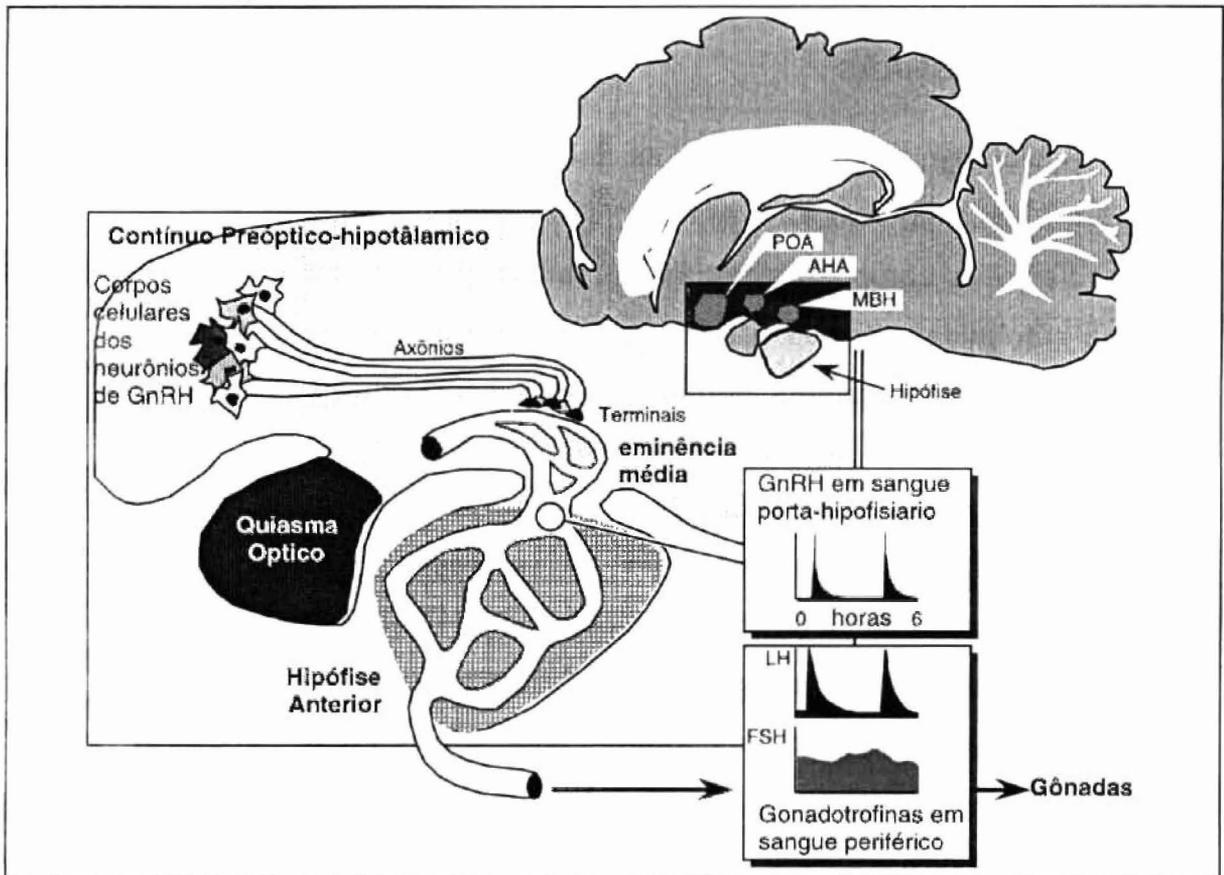
A regressão do corpo lúteo nos ruminantes não pode ser atribuída a queda nos estímulos luteotróficos (especialmente LH), mas sim da presença de um fator luteolítico prostaglandina F₂α (PGF₂α). A PGF₂α é produzida pelo endométrio durante todo o ciclo estral mas sua concentração máxima é atingida no momento da luteólise de cada espécie. Durante este período a

secreção de $\text{PGF2}\alpha$ é pulsátil, na razão de 3 a 4 pulsos por dia, tendo sido estabelecido que são necessários cerca de 5 pulsos para que ocorra luteólise completa. A $\text{PGF2}\alpha$ é extremamente sensível a oxidação que acontece na passagem do hormônio pelos pulmões, desta forma a prostaglandina ativa chega aos ovários pelo mecanismo de contra corrente que opera transferindo a prostaglandina da veia uterovariana para a artéria ovariana, desta forma evitando que o hormônio seja inativado. A prostaglandina age de duas formas para promover a regressão do corpo lúteo, reduzindo o fluxo sanguíneo para o corpo lúteo e agindo diretamente nas células luteínicas pela redução da síntese de cAMP induzida por LH e inibindo a ação esteroidogênica de cAMP. A luteólise pode ser bloqueada naturalmente pela ação de uma proteína produzida pelo conceptoo chamada trofoblastina (também chamada de oTP ou mais recentemente interferon τ) que é produzida durante o período próximo a implantação do embrião nos dias 15 a 25 após a ovulação e fertilização.

2. GONADOTROFINAS

A hipófise anterior secreta as duas gonadotrofinas FSH e LH (Figura 4). Ambas são glicoproteínas heterodiméricas compostas de uma sub-unidade α comum e uma sub-unidade β que é hormônio específica (21). A síntese e secreção destes hormônios está sob controle primário do GnRH, o qual é regulado por sistemas aminérgicos e de neuromodulação que atuam a nível central (22). Adicionalmente, a secreção de gonadotrofinas pode ser modulada pela ação direta de peptídios e esteróides gonadais na hipófise, que atuam regulando a expressão de receptores para GnRH ou a transcrição e tradução dos genes das gonadotrofinas (23,24). Embora ambas as gonadotrofinas sejam produzidas no mesmo tipo celular (gonadotrófo) elas são secretadas de maneira distinta. O LH é secretado de forma pulsátil em resposta a aumentos de ions de cálcio intracelular (Ca^{+}) que são gerados pela ligação do GnRH ao seu receptor específico no gonadotrófo. O FSH é secretado de maneira constitutiva, ou seja, a maior parte do hormônio é liberado na mesma velocidade em que é produzido, embora uma pequena parcela possa ser armazenada para ser liberada em resposta ao GnRH (25). Menos de 10% do conteúdo de LH da hipófise é liberado num período de 24 horas comparado com 60-80% de liberação do conteúdo de FSH no mesmo período (26).

Figura 4: Localização dos neurônios de GnRH e padrão secretório de GnRH e das gonadotrofinas



G. B. Martin

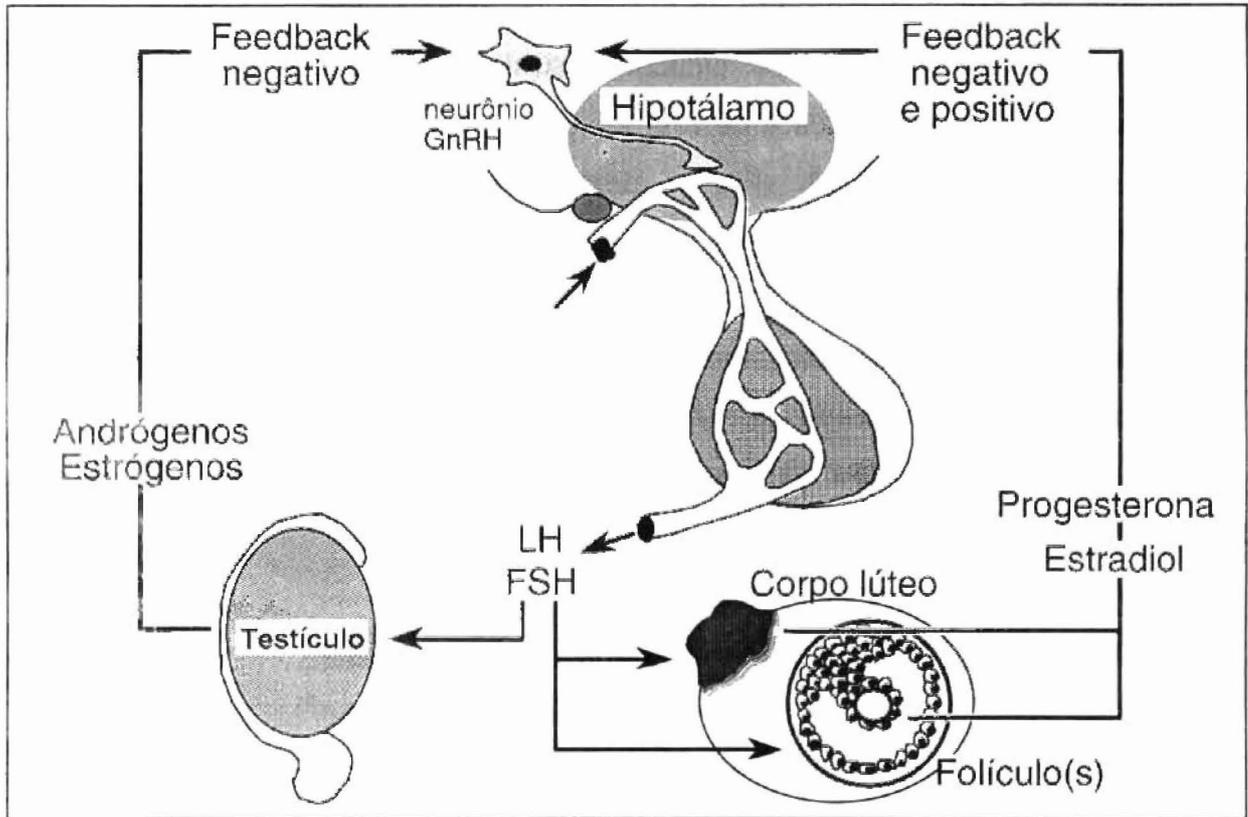
As gonadotrofinas agem nas suas células alvo através de receptores hormônio específico na superfície celular. Estes receptores são caracterizados por uma porção extracelular, com uma região terminal-N que é responsável pela ligação com o hormônio (ligando), de sete domínios transmembrana que ancoram o receptor na membrana e uma porção intracelular que esta acoplada a proteína-G para ativar a sinalização intracelular (segundos mensageiros). A região intracelular terminal-C não é necessária para ligação do hormônio ao receptor, mas está envolvida na reciclagem do receptor (27). A ligação da gonadotrofina ao seu receptor ativa as proteína-G

associadas, promovendo a conversão de GDP em GTP, o qual se liga a subunidade alfa da proteína-G, estimulando a adenil-ciclase a gerar AMP cíclico. O AMP cíclico por sua vez aciona uma cascata de fosforilação nas quinases dependentes de cAMP (PKA), desta forma então controlando múltiplos aspectos da função celular através da fosforilação de substratos protéicos. Uma vez que a interação receptor-ligando tenha se estabelecido, o complexo é internalizado por endocitose e degradado pelos lisossomas. Então o receptor é reciclado de volta a membrana celular por exocitose (28).

2.1. Controle da secreção das gonadotrofinas

A secreção de FSH embora controlada por GnRH, parece ser contínua e não agudamente responsiva aos pulsos de GnRH, resultando num padrão não pulsátil de secreção quando medido na circulação periférica. A secreção tônica de FSH (Figura 5) está sob controle de feedback negativo de dois hormônios gonadais, estradiol e inibina (29) que diminuem a transcrição de mRNA na glândula pituitária (30,31). A secreção de FSH exhibe variações cíclicas durante o ciclo estral (32-34) que estão relacionadas com o desenvolvimento e involução de folículos dominantes (44).

Figura 5: Mecanismos de feedback de hormônios esteróides que controlam a secreção de gonadotrofinas



G. B. Martin

A secreção de LH é imediatamente regulada pela liberação pulsátil do GnRH hipotalâmico na circulação porta, que resulta num pulso de LH correspondente liberado pela hipófise anterior (35). A regulação da secreção de LH pelo feedback ovariano é devida a ação dos esteróides progesterona e estradiol (30). A importância de cada hormônio no controle do LH varia de acordo com a fase do ciclo estral e época do ano (estacionalidade, na ovelha)(36). Brevemente, durante o anestro estacional da ovelha somente a presença de estradiol é capaz de reduzir a frequência dos pulsos de LH (GnRH) devido a interação com baixas concentrações de

melatonina presentes. Em fêmeas ciclando, durante a fase folicular, na ausência de progesterona, o estradiol aumenta a frequência dos pulsos de LH e diminui sua amplitude, desencadeando o pico de LH. Na fase luteínica precoce a progesterona age sinergisticamente com estradiol no controle da frequência dos pulsos de LH enquanto que posteriormente na fase luteínica média/tardia a progesterona sozinha é capaz de regular a frequência dos pulsos de LH.

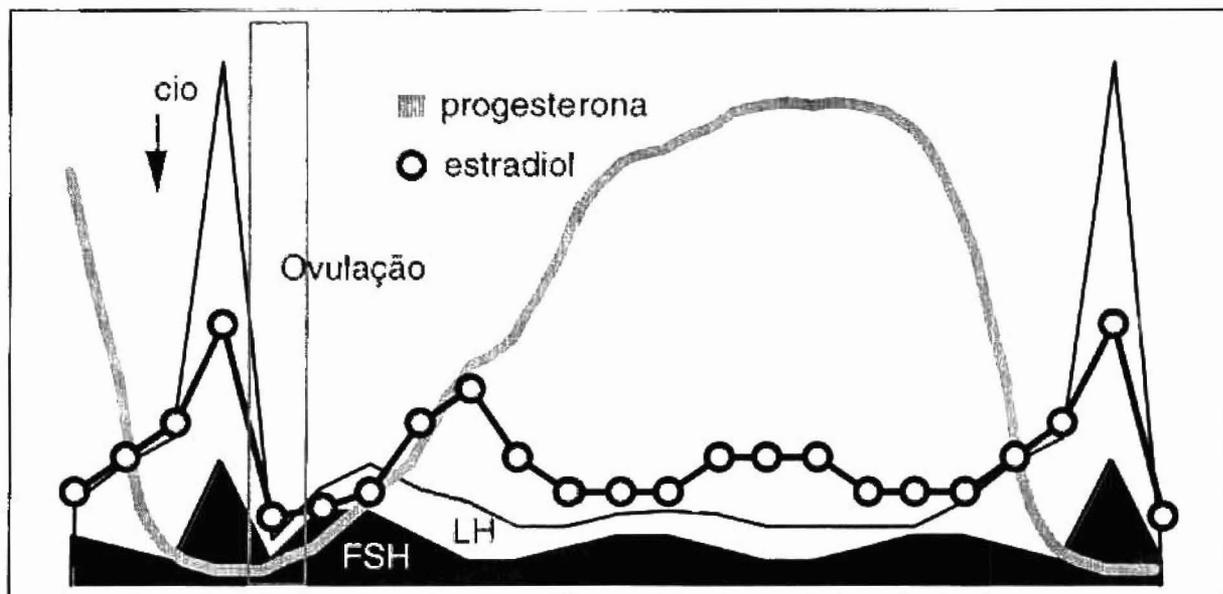
A secreção de GnRH é regulada pelos esteróides gonadais, progesterona e estradiol, que alteram as características desta secreção no ciclo estral e nas diferentes condições estacionais. Entretanto, estes esteróides não podem exercer sua ação diretamente nos neurônios de GnRH. Esta ação deve ser mediada por outros sistemas neurais esteróide-sensitivos, como por exemplo, o que envolve o ácido gama amino butírico (GABA). Os neurônios GABA contém receptores para os esteróides e fazem sinápses com os neurônios de GnRH. Tem sido demonstrado que as concentrações de GABA estão diminuídas quando a secreção de GnRH está sendo estimulada por estradiol durante o período pré-pico (fase folicular) e as concentrações de GABA estão aumentadas quando a progesterona está deprimindo a secreção de GnRH. Este neurotransmissor também pode ser importante nas ações de feedback negativo de estradiol. Durante a estação de anestro das ovelhas, quando o estradiol é um potente inibidor da secreção de GnRH,

antagonistas específicos para o receptor de GABA podem estimular a liberação de neurohormônio, ação esta que não é observada durante a estação reprodutiva quando os estrógenos são muito menos potentes (37).

2.2. Controle hormonal do ciclo estral

A ovelha é um animal poliéstrico estacional caracterizado por períodos de atividade sexual durante os dias curtos (outono e inverno) com ciclos regulares. Durante os dias longos (primavera-verão) a atividade sexual diminui com os animais apresentando completo anestro ou irregularidade dos ciclos. A vaca por sua vez não é tão influenciada pelo fotoperíodo, apresentando ciclos durante todo o ano. De qualquer maneira em ambas as espécies o crescimento folicular ocorre em intervalos regulares durante todo o ano. O ciclo estral (Figura 6) na ovelha dura 17 dias e na vaca 21 dias, com o dia 0 sendo designado como o dia do início do cio, e a ovulação ocorrendo no dia 1. O ciclo é dividido na fase luteínica que vai da ovulação até a luteólise por volta do dia 14 na ovelha e do dia 17 na vaca, e, na fase folicular que compreende o período que vai da luteólise até a ovulação (38).

Figura 6: Esquema da variação das concentrações hormonais durante o ciclo estral



2.2.1. Fase luteínica

A fase luteínica é caracterizada por um ovário contendo um corpo lúteo (CL), que resultou do rompimento do folículo ovulatório. A medida que a fase lútea progride o CL produz um volume crescente de progesterona até que chegue a um platô que inicia por volta do dia 6 e se mantém até a luteólise (39). A secreção de LH no início da fase lútea consiste de pulsos com alta freqüência e baixa amplitude (aproximadamente um pulso/hora) (40) que vão aumentando de amplitude a medida que a freqüência diminui para um pulso a cada 2-4 horas sob a influência do aumento das concentrações plasmáticas de progesterona produzida pelo CL. A freqüência dos pulsos de LH durante a fase de platô da progesterona consiste de pulsos de baixa freqüência (1 cada 4-6 horas) e alta amplitude (41). A secreção de FSH

não é afetada pela progesterona (30,42) mas é regulada pelo estradiol e inibina produzidos pelos folículos que maturam (dominantes) durante esta fase do ciclo (43,44).

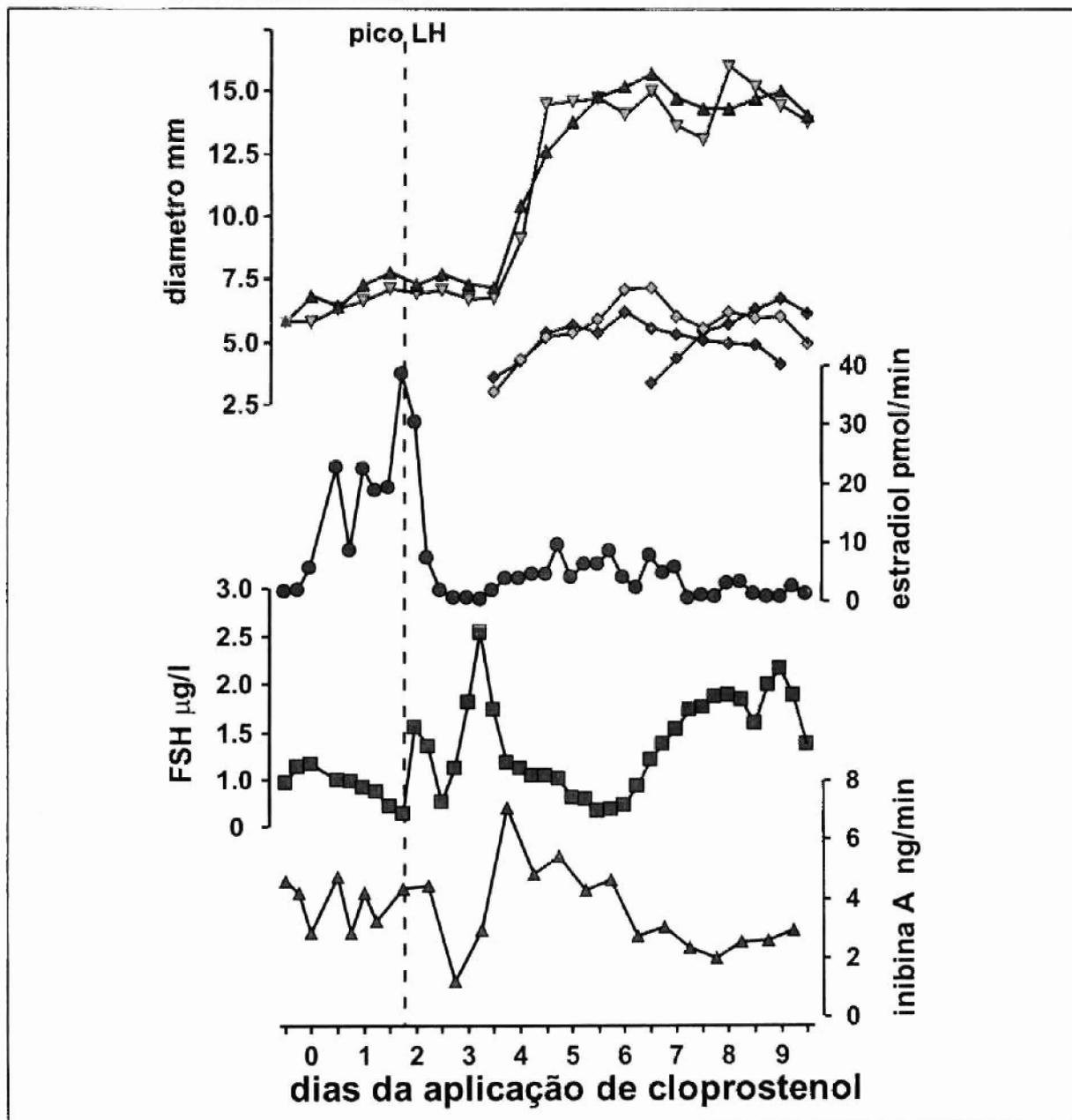
Após o pico de LH todos os folículos antrais grandes que não ovularam se tornam atréticos (8), e em consequência, a secreção de hormônios ovarianos esteróides e protéicos está nas mais baixas concentrações observadas durante o ciclo (38,44). No dia 1 as baixas concentrações de estradiol e inibina estão associadas com um rápido aumento nas concentrações de FSH (segundo pico de FSH) que é seguido por um aumento nas concentrações de estradiol e inibina que por sua vez inibem a secreção de FSH (29).

Este padrão de aumento nas concentrações de FSH, seleção do folículo dominante, atividade do folículo dominante (secreção de estradiol e inibina), inibição da secreção de FSH, regressão do folículos dominante (baixa de estradiol e inibina) e consequente aumento dos níveis de FSH, ocorre várias vezes durante a fase luteínica no fenômeno conhecido como ondas de crescimento folicular (Figura 7).

A presença de altas concentrações de progesterona durante a fase luteínica mantém a freqüência da secreção de LH baixa, reduzindo a secreção de androstenediona pela teca e consequentemente a de estradiol pela granulosa dos folículos dominantes. Como resultado os folículos dominantes presentes durante esta fase não ovulam devido a concentração de estradiol insuficiente

para induzir o pico de LH. Entretanto, os folículos dominantes presentes no ovário neste período tem capacidade de ovular se suplementação artificial de LH for administrada (aplicação de hCG ou GnRH).

Figura 7: Dinâmica folicular (topo) e secreção hormonal na fase folicular e luteínica na ovelha. No gráfico do topo os folículos ovulatórios/CL estão representados por triângulos e os folículos dominantes da fase luteínica por losangos



2.2.2. Fase folicular

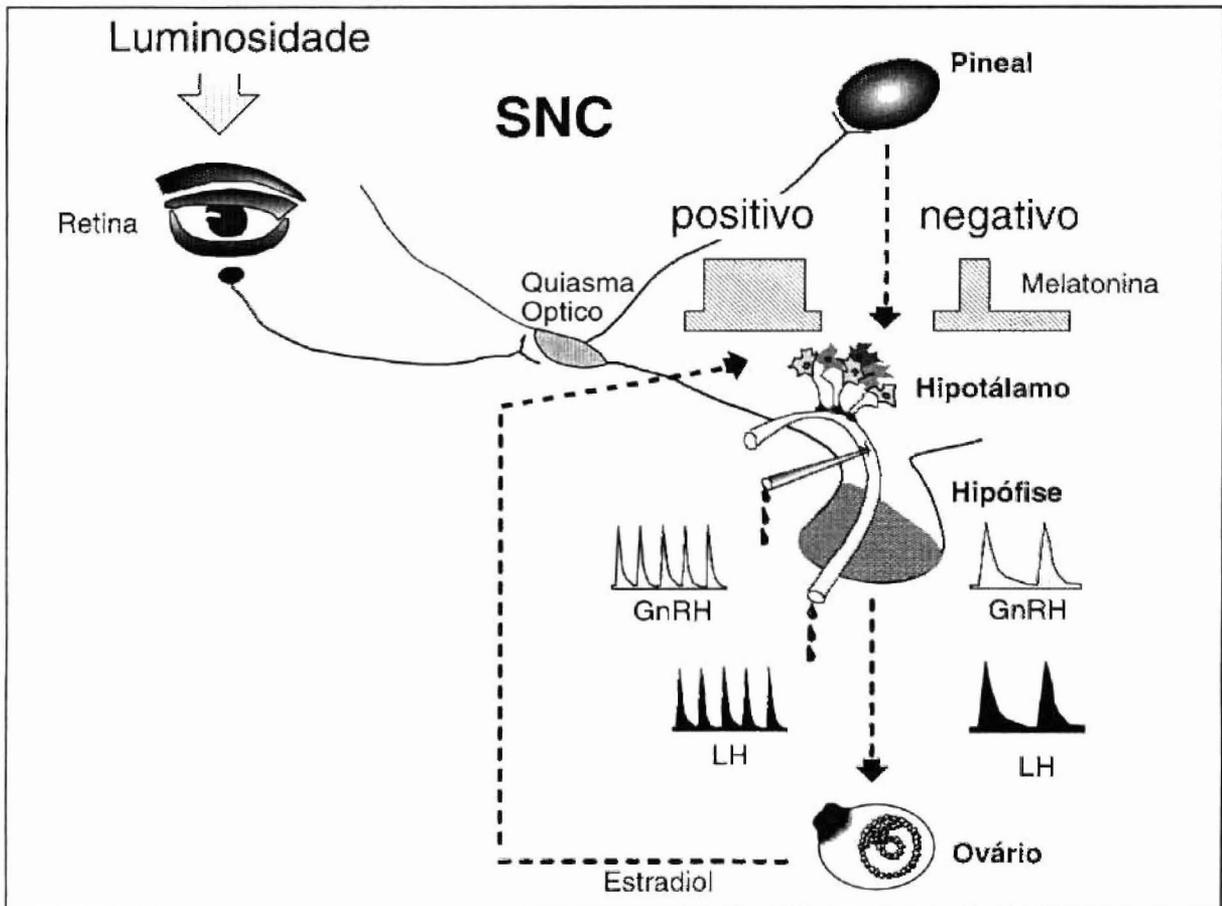
A queda dos níveis de progesterona plasmática após a luteólise deixa o estradiol sozinho incapacitado de inibir a frequência dos pulsos de LH (45). Dentro de 24 horas do declínio da concentração periférica de progesterona o intervalo entre pulsos de LH fica em torno de 1 por hora (46,47). Este aumento na frequência de pulsos, pela secreção de GnRH, é acompanhado por uma redução na amplitude dos pulsos, que é mediada pela ação do estradiol modulando a resposta da hipófise ao GnRH (47,48). Apesar da baixa amplitude dos pulsos de LH, o ovário (folículos) responde a cada um destes com um pulso de androstenediona e estradiol (40,46). À medida que a frequência dos pulsos aumenta há um aumento das concentrações médias de LH e um correspondente aumento na secreção de esteróides ovarianos (47,49,50). O aumento de estradiol durante a fase folicular resulta na queda das concentrações de FSH (50) prevenindo o crescimento e maturação de folículos adicionais. Eventualmente a secreção de estradiol aumenta a um nível suficiente para induzir o comportamento de cio (51,52) e desencadear o pico de LH. O pico de LH é caracterizado por um rápido aumento dos níveis basais para uma concentração de 20-100 ng/ml dentro de 4-8 horas, com as concentrações retornando aos níveis basais 10 horas depois, resultando

num pico com aproximadamente 10-18 horas de duração (48,53). Na ovelha o pico de LH ocorre dentro de 4-8 horas do início do cio e a ovulação aproximadamente 24 horas após o pico de LH ou em torno de 32 horas após o início do cio (54). Estes fenômenos estão ilustrados na Figura 7.

2.3. Anestro

O anestro estacional (Figura 8) da ovelha é resultado de uma mudança no mecanismo de feedback por estradiol, mediado pelo fotoperíodo, de uma maneira que somente o estradiol é capaz de suprimir a secreção de LH. As mudanças de fotoperíodo (horas de luz/horas de escuridão) são percebidas pela retina, traduzidas em sinais nervosos e transmitidas a glândula pineal. A pineal responde com a secreção de melatonina que inicia imediatamente após o início do período de escuridão e se mantém até o começo do período de luz, criando um ritmo circadiano de secreção hormonal (55).

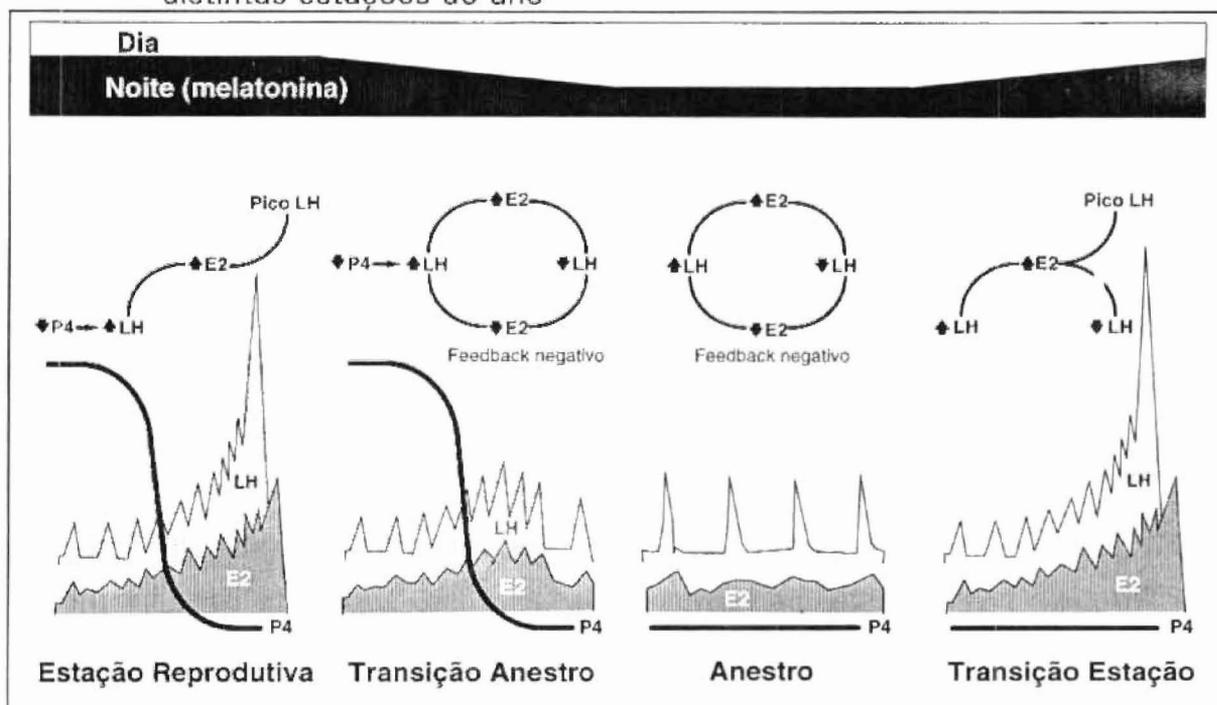
Figura 8: Esquema do mecanismo endócrino determinante do anestro estacional dos ovinos



Na Figura 9 estão mostradas as interações hormonais em cada época do ano em função do número diário de horas de luz. Durante a estação reprodutiva (alta melatonina) o estradiol controla a amplitude dos pulsos de LH mas tem pouco efeito na frequência dos pulsos. Num ambiente de baixa melatonina, durante o anestro (dias longos), o estradiol é um potente supressor da frequência de pulsos de LH, uma ação exercida a nível de hipotálamo. Tomadas de amostras de sangue porta-hipofisiário demonstraram que durante a estação

reprodutiva, o estradiol não tem efeito na frequência dos pulsos de GnRH, situação esta que se inverte durante o anestro causando uma profunda supressão nos pulsos de GnRH (56).

Figura 9: Relação entre o fotoperíodo e a circulação hormonal das ovelhas nas distintas estações do ano



A regulação da secreção de FSH não é influenciada pelo anestro sendo controlada pelos níveis de estradiol e inibina (30). Na maioria das raças de ovinos as concentrações de FSH são suficientes para promover desenvolvimento folicular de folículos dominantes (2,57-59). Estes folículos podem ser induzidos à ovular em resposta a injeções repetidas (pulsátil) de GnRH (60) ou LH (61,62), ou ainda, por uma injeção de hCG (63). Raças com estacionalidade menos marcada como a Merino e suas cruzas podem ter ovulação induzida por aumento endógeno da frequência de pulsos de LH desencadeada pela exposição a carneiros (64).

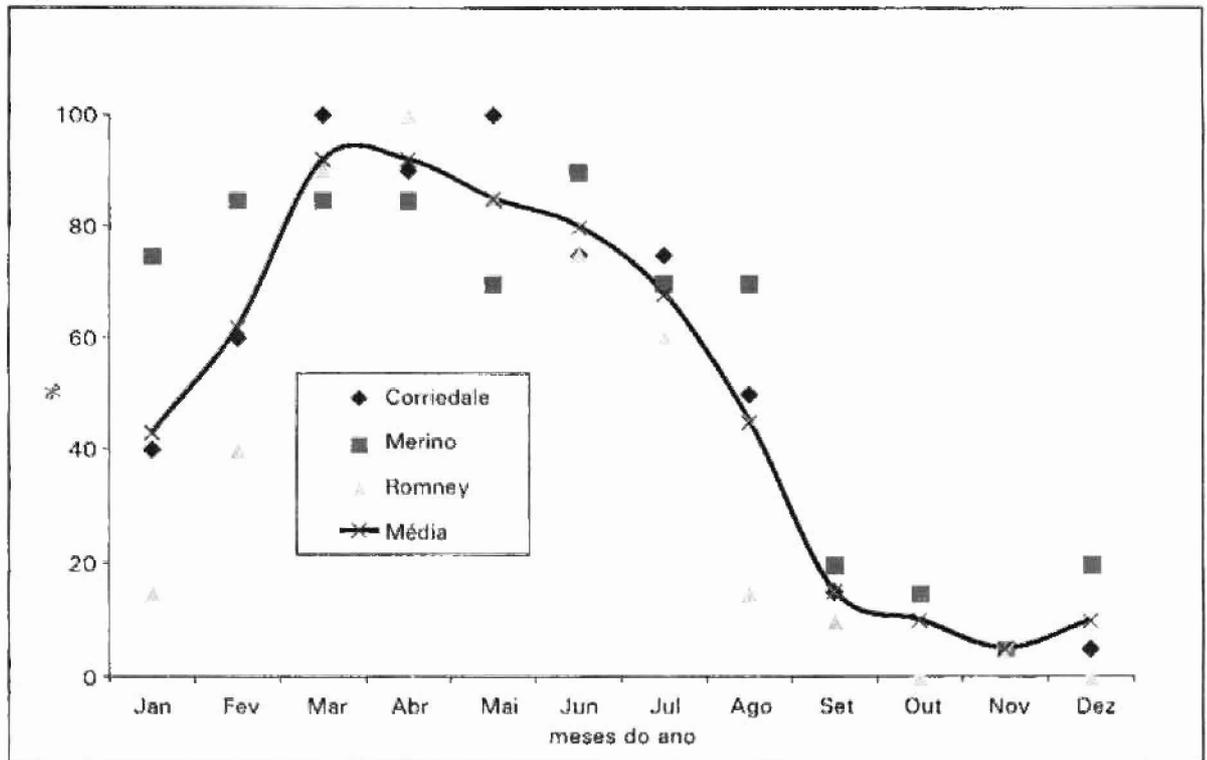


3. MÉTODOS DE SINCRONIZAÇÃO DE CIOS EM OVINOS

A sincronização de cios em ovinos é uma biotécnica reprodutiva que permite a concentração das partições em épocas desejáveis dentro dos sistemas de produção (65). Estas técnicas são importantes e até indispensáveis quando são empregados sistemas intensivos de reprodução, tais como partições em blocos ou três partos a cada dois anos.

Antes de descrever as principais metodologias disponíveis deve ser considerada a estacionalidade reprodutiva dos ovinos, uma vez que dependendo da época do ano será peculiar à técnica a ser empregada. Nas condições de criação do Rio Grande do Sul a incidência mensal de cio na presença de machos vasectomizados foi descrita em 1960 para as raças Corriedale, Merino e Romney Marsh (66). A Figura 10 apresenta esta variação entre as raças e caracteriza claramente que a estação reprodutiva preferencial das ovelhas na região está definida entre os meses de fevereiro a julho.

Figura 10: Incidência mensal de cios em ovelhas no Rio Grande do Sul



Basicamente existem dois conjuntos de métodos de manipulação do ciclo estral em ovinos, um natural que emprega o chamado efeito macho, e, outro que inclui métodos artificiais que empregam progestágenos e as prostaglandinas.

3.1. Efeito macho

Durante a estação reprodutiva ou próximo ao seu início numa determinada raça é possível empregar apenas o método natural que é o chamado efeito macho ou efeito carneiro. O mecanismo fisiológico e seu emprego na produção já foi exaustivamente estudado (67).

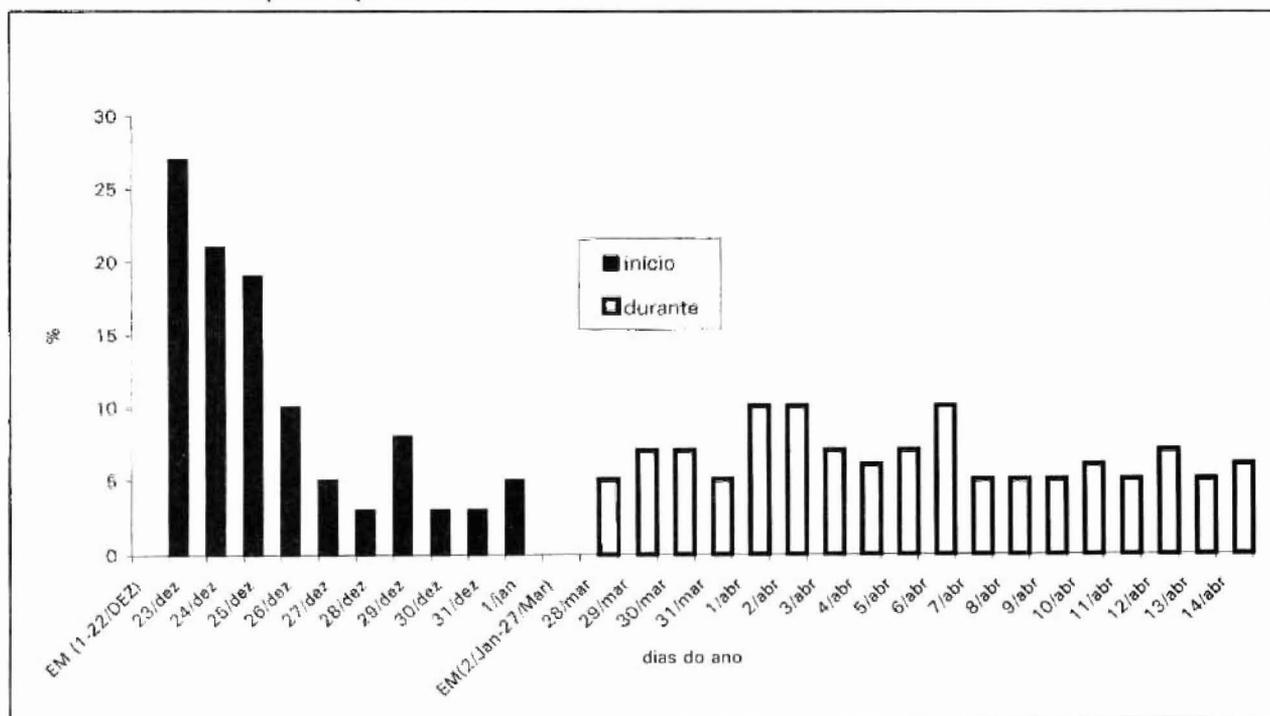
As ovelhas apresentam um padrão semelhante de incidência de estros se estão sempre em contato com os carneiros ou se mantidas isoladas desses. Após a separação de ovelhas em anestro por cerca de 15 dias, quando os machos são novamente introduzidos no rebanho, as fêmeas ovulam após um período de 24 a 60 horas.

Esse procedimento é de muita utilidade quando se deseja antecipar a manifestação de cio de um rebanho em torno de um mês antes do início efetivo da estação reprodutiva, já que em momentos de anestro mais profundos (p. ex. meses de setembro e outubro no RS) o percentual de ovelhas que respondem com manifestação de cio é baixo. O mecanismo é desencadeado por estímulos visuais relacionados a presença física dos machos e pela ação dos chamados feromônios que através do olfato atingem o tálamo, hipotálamo e determinam a liberação de LH pela hipófise anterior. A modificação nos níveis de LH se traduzem pelo incremento no número de pulsos e concentração média de LH.

Pelo menos duas possibilidades podem ser constatadas na atuação do mecanismo do efeito macho. A primeira, diz respeito a indução do pico de LH e formação de um corpo lúteo com atividade normal e manifestação de cio cerca de 19 a 21 dias após a exposição aos carneiros; a segunda, mais freqüente, após o pico de LH há indução de um corpo lúteo hipofuncional

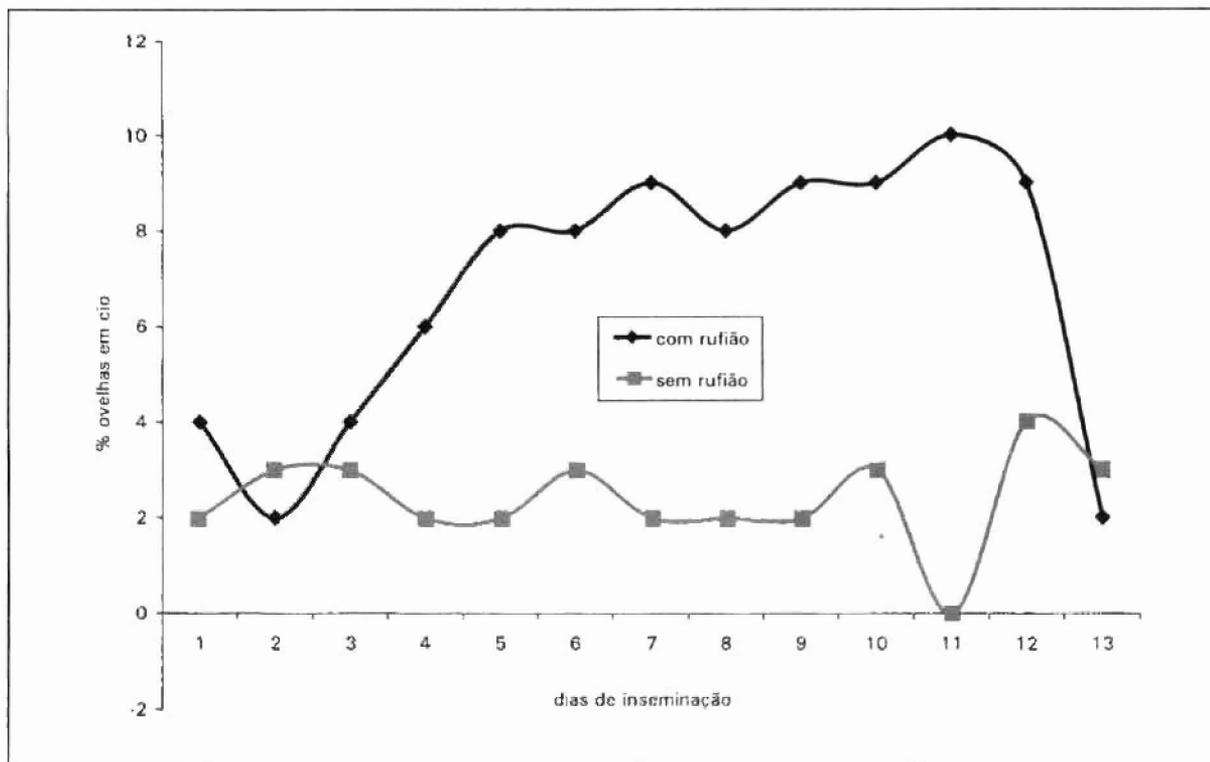
(de vida curta) que determina novo pico de LH em sete dias resultando na manifestação de cio 7-10 dias após a exposição aos machos. Os ciclos curtos podem ser evitados pela associação de um progestágeno previamente a exposição aos machos, dessa forma pode ser obtido o pico de LH no terceiro dia e manifestação seqüencial de cio com possibilidade de retorno dentro de 21 dias (67). Dois exemplos típicos do uso do efeito carneiro que ilustram claramente os aspectos fisiológicos mencionados podem ser visualizados nas Figuras 11 e 12. Na Figura 11 pode ser observado o efeito de antecipação e sincronização, quando os machos são colocados antes da temporada reprodutiva, já quando os machos são colocados quando as ovelhas estão ciclando não se verifica sincronia de cios.

Figura 11: Incidência de cio após o emprego do efeito carneiro no início e na estação reprodutiva



Na Figura 12 é apresentada a situação em que os rufiões expostos um mês antes do início das cobrições determinam uma maior frequência diária de cios durante o período efetivo de serviço. Nessa situação é aproveitado apenas o efeito de sincronização de cios sem alterar a época usual de acasalamento.

Figura 12: Incidência diária de cios em ovelhas Ideal submetidas ou não a exposição de rufiões 30 dias antes do início da inseminação artificial



3.2. Alternativas hormonais para sincronização de cios na estação reprodutiva

3.2.1. Progestágenos

O desenvolvimento da sincronização de cios com análogos sintéticos da progesterona datam dos anos 60,

o principal conjunto de resultados foi divulgado por Robinson (69), constituindo-se num exemplo de como deve funcionar o desenvolvimento de uma tecnologia, denominada a “técnica das esponjas”.

De uma maneira genérica os pessários são confeccionados com esponja de alta densidade (#33) com um cordão de 15 centímetros de comprimento, atado em cruz de forma a facilitar sua retirada. A dose convencional de progestágeno é de 50 mg de acetato de medroxi-progesterona (MAP) ou 40 mg de acetato de fluorogestona (FGA). Diversos ensaios tem demonstrado resultados semelhantes em termos de sincronização deaios entre os dois produtos, apenas tem sido descrita alguma vantagem quando a inseminação é procedida em tempo pré-fixado empregando FGA, o que indica provavelmente uma maior sincronia das ovulações decorrentes do uso desse gestágeno (70).

O procedimento para a sincronização com as esponjas é simples. Há que ser planificado o momento em que se deseja que ocorram as inseminações e proceder a colocação das esponjas entre 11 a 14 dias antes. O esquema abaixo ilustra o procedimento do método de sincronização com as esponjas.

Dia 0	Dia 11	Dias 12 -16	---	Dias 26 -35
↑	↑	↑↑↑↑↑		↑↑↑↑↑↑↑↑↑↑
Colocação dos pessários	Retirada	Inseminações ou cobrições naturais com 10% de carneiros		Re-inseminações ou segundo serviço

Na colocação dos pessários os cuidados que devem ser efetuados dizem respeito a higiene do material (espéculo) e a aplicação de um agente bacteriostático na esponja (nitrofurano), para reduzir o crescimento da fauna saprófita vaginal, que resulta num odor forte e produção de muco turvo abundante. Esse procedimento contribui para que o criador não fique preocupado e imagine alguma relação entre o aspecto e odor do muco com problemas de fertilidade após inseminação.

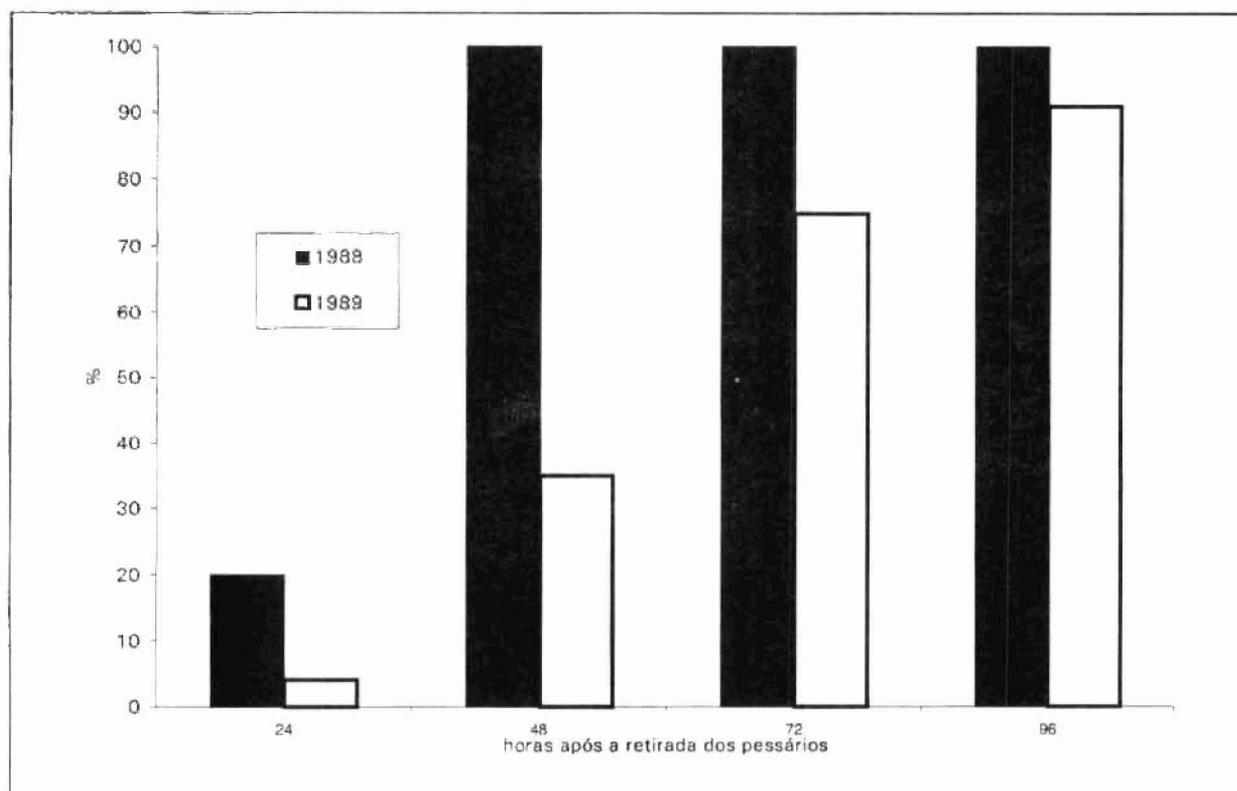
Cerca de 90% das ovelhas que recebem o gestágeno manifestam cio em até 4 dias após a retirada das esponjas e no caso de não terem sido fertilizadas no primeiro serviço, apresentam novo cio após 16-20 dias.

Essa técnica aplicada na estação reprodutiva, ou um pouco antes de seu início, apresenta um excelente nível de sincronização com uma boa taxa média de fertilidade do primeiro cio (60-65%), permitindo que 90% das ovelhas do rebanho fiquem prenhes em dois serviços que podem ser efetuados num período de 21 dias. Além disso, há que se considerar a possibilidade de que o inseminador não precisa dedicação exclusiva ao serviço entre os dias 5 e 15 após a retirada dos pessários, permitindo redução nas despesas com mão de obra e no tempo de manejo com os animais, o que diminuí os riscos de surtos de enfermidades infecciosas e facilita a alocação dos animais nos potreiros.

Há necessidade de considerar que o uso da sincronização de cios, na grande maioria dos casos deve

estar acoplado a IA, em algumas situações peculiares, em que se deseje sincronizaraios, usando a monta natural é necessário empregar 10% de carneiros, sem colocá-los no rebanho nas primeiras 30 horas. Esses aspectos são reiterados pela distribuição usual dosaios após a retirada dos pessários que pode ser observada na Figura 13.

Figura 13: Manifestação de cio em ovelhas Corriedale após sincronização com MAP

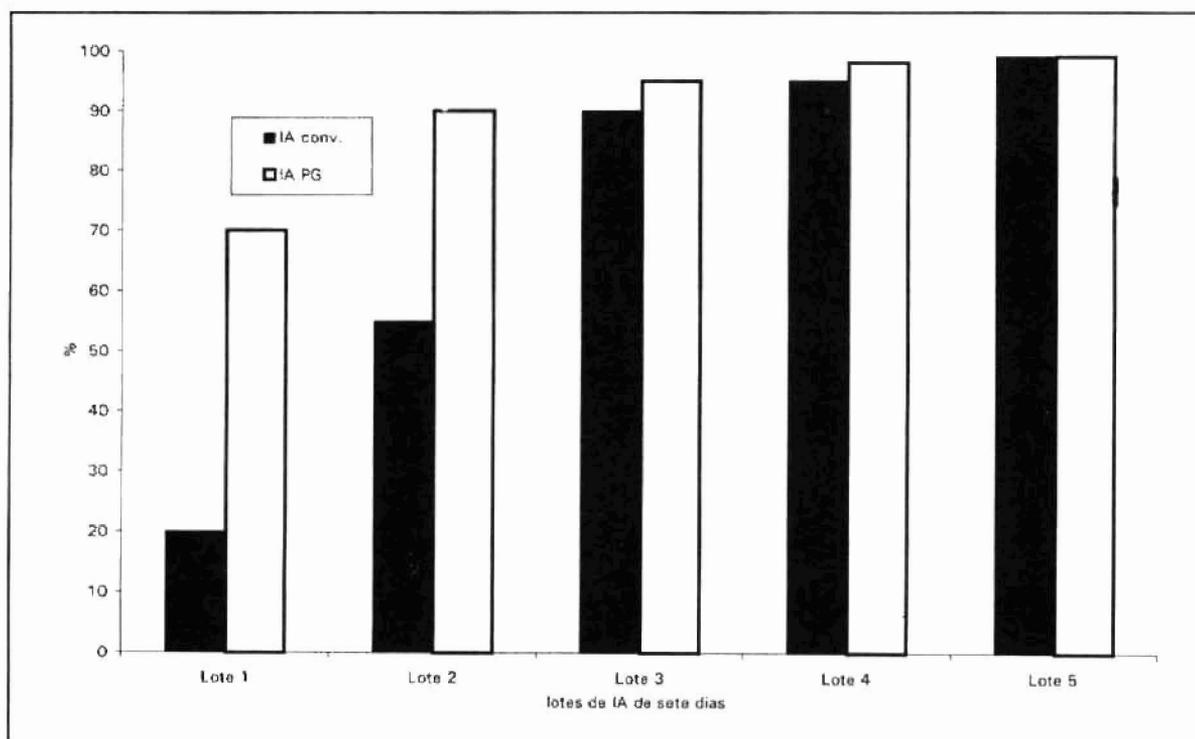


3.2.2. Prostaglandinas

Um fator limitante para o uso das prostaglandinas é que as ovelhas estejam ciclando e apresentem um corpo lúteo funcional nos seus ovários, ou seja, estejam entre os dias 5 a 14 do ciclo (71), reitera-se neste contexto, que é uma tecnologia que apenas pode ser empregada

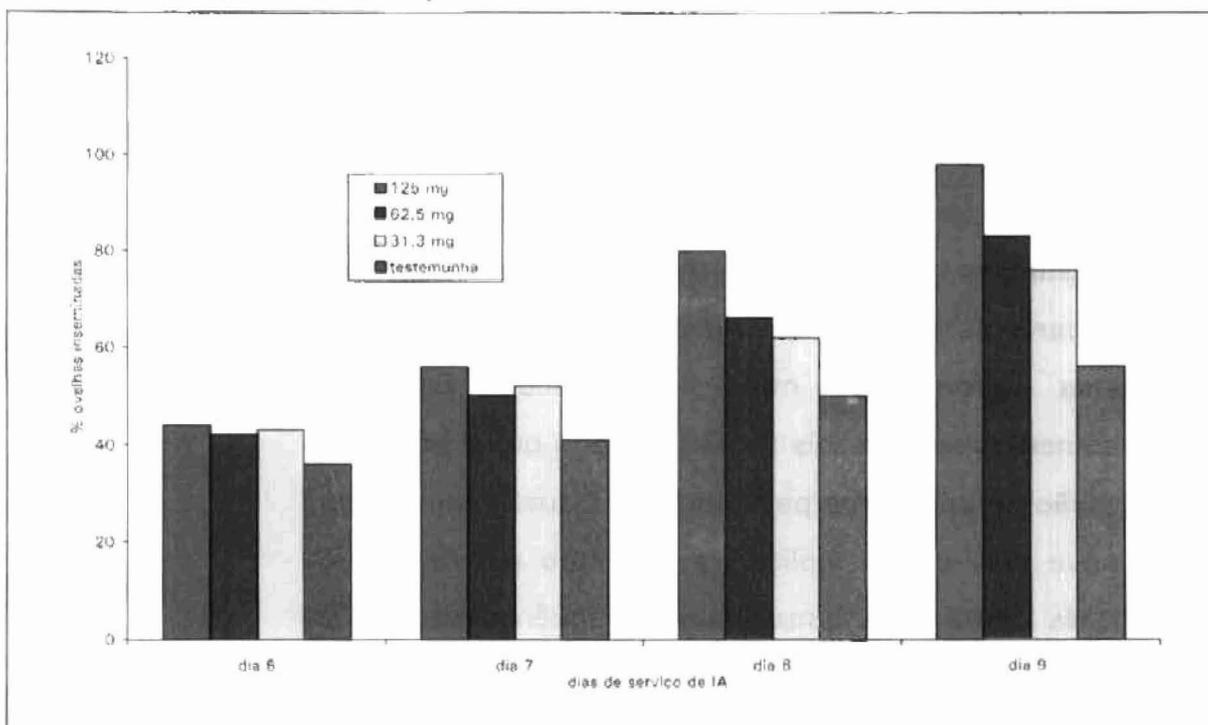
durante a estação reprodutiva. Além disso, o uso das prostaglandinas ou fica na dependência de um minucioso controle do dia do cio ou de duas aplicações seqüenciais. Um aspecto que sempre deve ser considerado no uso de sincronização de cios é o objetivo dos produtores e qual a duração prevista para sua temporada de reprodução. Caso não haja interesse em maiores concentrações nos partos essa metodologia não deve ser utilizada, pois estará sendo de pouca utilidade já que se o rebanho estiver ciclando em 42 dias é possível oferecer duas oportunidades de IA para cada ovelha (Figura 14). Nesta figura é ilustrada a vantagem da sincronização através do número de ovelhas servidas nas duas primeiras semanas.

Figura 14: Frequência acumulada de ovelhas em cio após cio natural e cio induzido por prostaglandina



A efetividade do uso de uma dose 30% inferior a recomendada para os ovinos já foi demonstrada numa única aplicação no quinto dia do ciclo (72). A revelia da dose empregada o que se descreverá a seguir é um sistema eficiente para sincronização de cios com prostaglandina, administrando uma única injeção de uma terça parte da dose na submucosa vulvar, buscando um sistema alternativo mais econômico. Em três experimentos seqüenciais foi evidenciado que é possível a utilização de uma terça parte da dose usual, num sistema de nove dias com a aplicação no sexto dia de serviço (73). Na Figura 15 é apresentada a freqüência de ovelhas em cio submetidas a injeção de cloprostenol em diferentes dosagens no dia 6 após o início do serviço de IA. Evidentemente que todas as ovelhas detectadas em cio nos primeiros seis dias de serviço são inseminadas normalmente, o que permite que com o sistema proposto sejam inseminadas cerca de 70% das ovelhas concentradas em 9 dias, aspecto esse que traz as vantagens acima mencionadas.

Figura 15: Freqüência acumulada de ovelhas inseminadas após injeção de PG no sexto dia de serviço



3.3. Alternativas hormonais para sincronização/indução de cios fora da estação reprodutiva

3.3.1. Progestágenos e gonadotrofina sérica equina

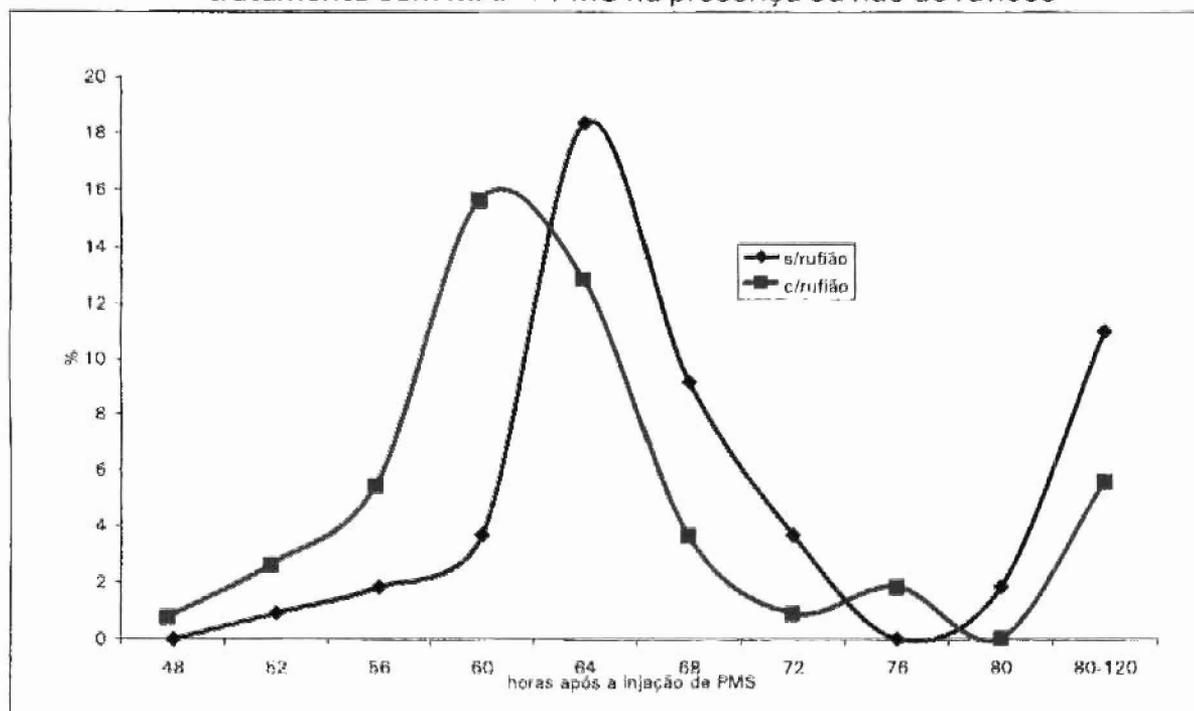
O esquema abaixo ilustra como deve ser procedida a sincronização de cios com MAP + eCG e como pode ser efetuado um sistema de indução/sincronização de cios fora da estação reprodutiva. Outros aspectos que devem ser salientados são: a taxa de ovulação que se apresenta aumentada, levando a um percentual de partos gemelares na ordem de 20 a 60%; e, que na grande maioria dos casos, quando o sistema é empregado durante os períodos de anestro mais profundo, não se deve esperar

que as ovelhas que não tenham ficado prenhes no primeiro serviço, retornem ao cio.

Dia 0	Dia 11	Dias 12 -16
↑	↑	↑↑↑↑↑
Colocação dos pessários	Retirada e injeção de 500 UI de eCG	Inseminações

Conforme já salientado em tópico anterior, durante o anestro estacional para a sincronização/indução de cios é necessário que o gestágeno seja acompanhado de eCG (gonadotrofina coriônica eqüina), também chamado de PMS. Esse procedimento (MAP+eCG) permite cobrições ou inseminações no período de anestro, onde entre 80-90% das ovelhas ovulam entre 48 e 80 h após a retirada dos pessários, com concentração das ovulações entre 60 e 64 h. O momento das ovulações foi estudado nas condições de Rio Grande do Sul associado ou não ao efeito macho (introduzido no momento da retirada dos pessários), indicando uma antecipação no momento médio das ovulações, sendo em torno de 65 horas na presença de rufiões e de 74 horas na ausência desses (74). As distribuições amplas justificam os baixos índices de fertilidade quando se usa inseminações com sêmen congelado (Figura 16).

Figura 16: Momento de ovulação em ovelhas Corriedale submetidas a tratamento com MAP + PMS na presença ou não de rufiões



3.4. Comparação de despesas e resultados esperados

Com freqüência o ovinocultor reavalia seu sistema de trabalho e se questiona sobre o método que vem empregando para o acasalamento de suas ovelhas. Esta definição, aparentemente simples, requer algumas reflexões e depende: do número de ovelhas no rebanho e do(s) objetivo(s) do produtor.

O método pode ser escolhido por ter uma e/ou uma combinação das seguintes características:

- ser o mais simples;
- ser o mais econômico;
- ser o que permita maior aproveitamento de um dado reprodutor;
- ser o mais rápido.

O método mais simples, evidentemente consiste na utilização da monta natural, onde os carneiros são adquiridos e utilizados na reprodução durante dois ou três anos seguidos. Esta prática que envolve baixa utilização das tecnologias disponíveis, normalmente não inclui uma avaliação prévia da fertilidade dos carneiros, nem um maior controle dos acasalamentos que se processam por períodos de 6 a 9 semanas com cerca de 3% de carneiros. Este método pode ser melhorado com a execução de exames andrológicos nos carneiros, monta controlada e emprego de coletes marcadores para controle do acasalamento, parição e descarte das ovelhas inférteis. De um modo geral a monta natural é bastante eficaz e seu emprego normalmente não inclui resultados negativos. No entanto, cabe ressaltar que a monta natural, nem sempre é o método mais econômico ou adequado ao objetivo do produtor.

Numa tentativa de averiguar as despesas comparativas para a implementação das distintas alternativas para a reprodução das ovelhas num dado momento; foram ensaiados alguns cálculos apresentados na Tabela 1. Nesta tabela são apresentadas as despesas com 100 ovelhas nas quatro alternativas para o acasalamento de ovelhas: Monta Natural (MN), inseminação artificial convencional (IACONV), inseminação artificial após sincronização com esponjas vaginais de progestagênio durante 11-14 dias (IAMAP), sincronização com 30% da dose convencional de

prostaglandina na submucosa vulvar (IAPG). Todos os métodos consideram tempo suficiente para duas oportunidades para fertilizar cada ovelha.

Tabela 1: Relação de despesas para a reprodução de 100 ovelhas submetidas a distintos métodos de acasalamento

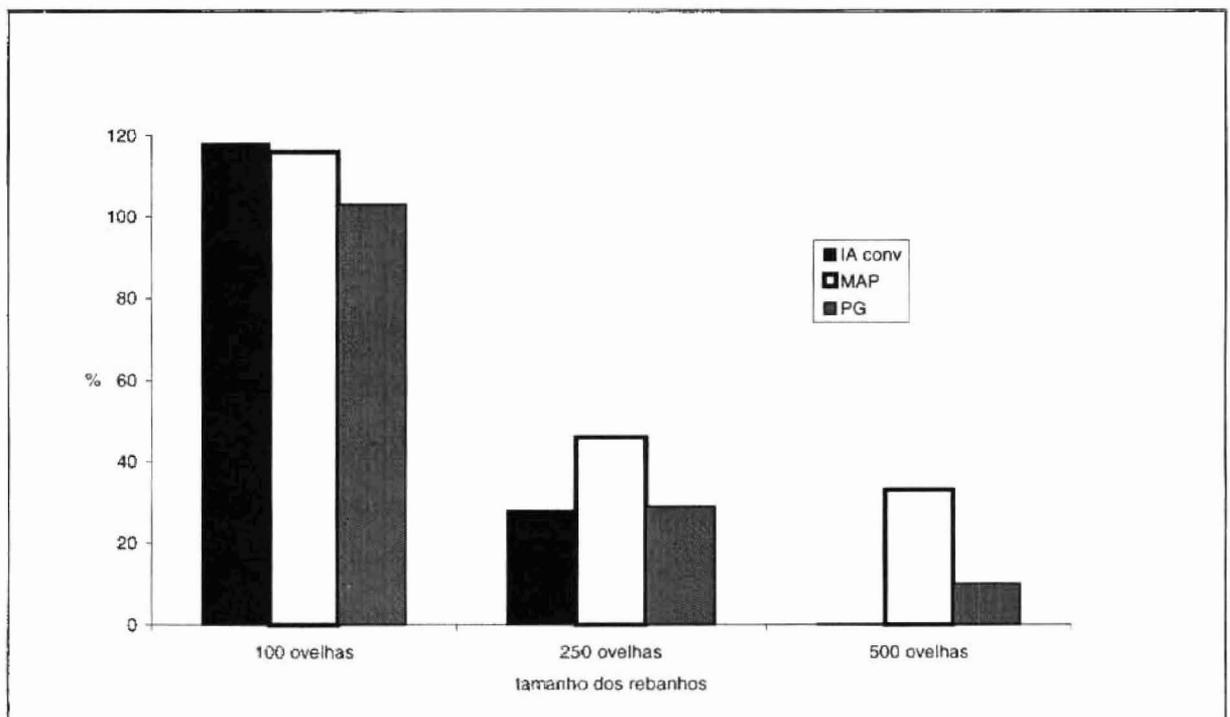
ITEM	MNATURAL	IA CONV.	IA MAP	IAPG33%
Mão de obra				
Campeiro	109,20	218,40	78,00	114,40
Inseminador	0,00	278,40	138,00	174,40
Veterinário	0,00	60,00	60,00	60,00
Material e animais				
Progestágeno	0,00	0,00	70,00	0,00
Prostaglandina	0,00	0,00	0,00	18,00
Material de inseminação	0,00	100,00	100,00	100,00
Carneiro	150,00	50,00	50,00	50,00
Total em R\$	259,20	706,80	496,00	516,80
Taxa de prenhez no período	92	91	88	88
Dias de serviço	42	42	15	22
Redução (%) do período de serviço		0	64	48

Valores utilizados para os cálculos

Salários		R\$
Inseminador	1 kg vivo de vaca/IA	0,60
	Equiv. 1 SMR ao dia	5,20
Campeiro	4 horas/dia por 42 dias	109,20
Auxiliar de inseminação	Equiv. 1 SMR ao dia	5,20
Insumos		
Prostaglandina	Dose total	1,00
	Um terço	0,30
Progestágeno		0,70
Material de inseminação		100 (20%, considerando vida útil de 5 anos)
Reprodutor		100 (50%, considerando vida útil de 2 anos)

A Figura 17 apresenta uma comparação relativa entre os custos da monta natural e das biotécnicas reprodutivas (inseminação artificial com ou sem sincronização de cios). Nesta figura pode ser constatado que a inseminação artificial leva a maiores custos em rebanhos com até 250 fêmeas, porém em rebanhos com 500 ovelhas a biotécnica torna-se o método mais econômico e incorpora a possibilidade de máximo aproveitamento de um dado carneiro, que tiver sido escolhido com critérios adequados para a obtenção de maiores ganhos genéticos na população.

Figura 17: Incremento nas despesas com a reprodução de ovinos empregando biotécnicas reprodutivas em comparação com a monta natural



Um aspecto que deve ser considerado também é que a utilização de qualquer biotécnica reprodutiva determina aumento nos custos com a reprodução em percentuais de 10% a 120%.

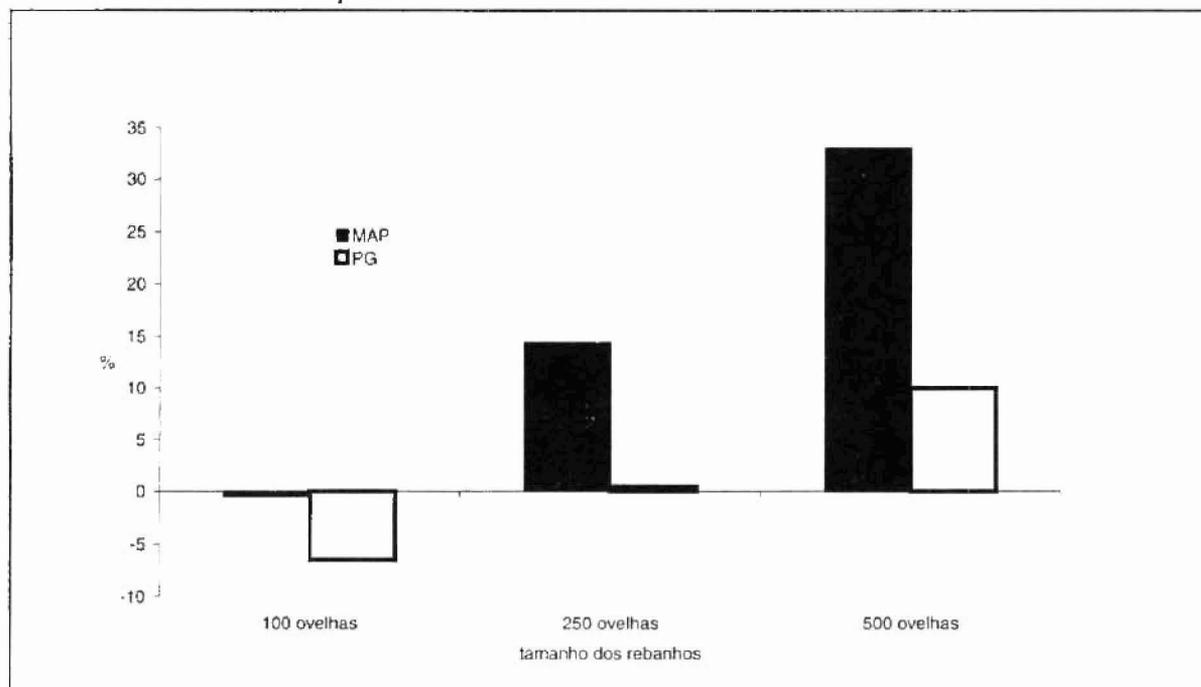
Focalizando o objetivo pelo qual o ovinocultor cria seus animais, mais especificamente quando este possui carneiros de alto valor zootécnico e deseja o maior número possível de filhos de um mesmo animal; a inseminação artificial seria o método de eleição. Isto porque, além de atender a este desejo do produtor, incorpora um adequado controle dos acasalamentos, que proporciona maiores facilidades para controlar a parição, cuidar dos recém-nascidos e descartar ovelhas sub-férteis ou inférteis. A simples utilização da inseminação artificial não leva a redução no período de parição, já que de um modo geral, os serviços convencionais, são executados durante 42 dias (Tabela 1), apenas incorpora as vantagens adicionais de redução da disseminação de doenças venéreas, melhor controle do rebanho e possibilidade do melhoramento genético pelo uso de reprodutores supostamente superiores.

O estresse dos animais devido ao intenso manejo dos rebanhos na inseminação convencional, sob certas condições de clima, disponibilidade alimentar, infraestrutura física para manejo e deficiência de pessoal devidamente qualificado, pode determinar sérios comprometimentos na eficácia desta biotécnica, levando a baixos índices de prenhez, em decorrência de surtos de

enfermidades infecciosas (por exemplo, manqueira e queratíte) ou em função da qualidade do serviço executado.

Na Figura 18 é apresentada uma comparação dos custos da utilização das biotécnicas reprodutivas, ou seja, entre as que incluem sincronização deaios e a convencional. Nas técnicas que utilizam o gestágeno (MAP- esponjas vaginais durante 11-14 dias) ou injeções de prostaglandina (PG - dose reduzida via submucosa vulvar) encontram-se as alternativas mais rápidas para as práticas reprodutivas. Estas, em comparação com a inseminação artificial convencional reduzem os riscos com enfermidades e perda de peso dos animais pelo manejo intensivo e apresentam uma interessante variação nos custos, em função do número de ovelhas a serem acasaladas.

Figura 18: Relação das despesas do uso de sincronização deaios com relação a inseminação artificial convencional



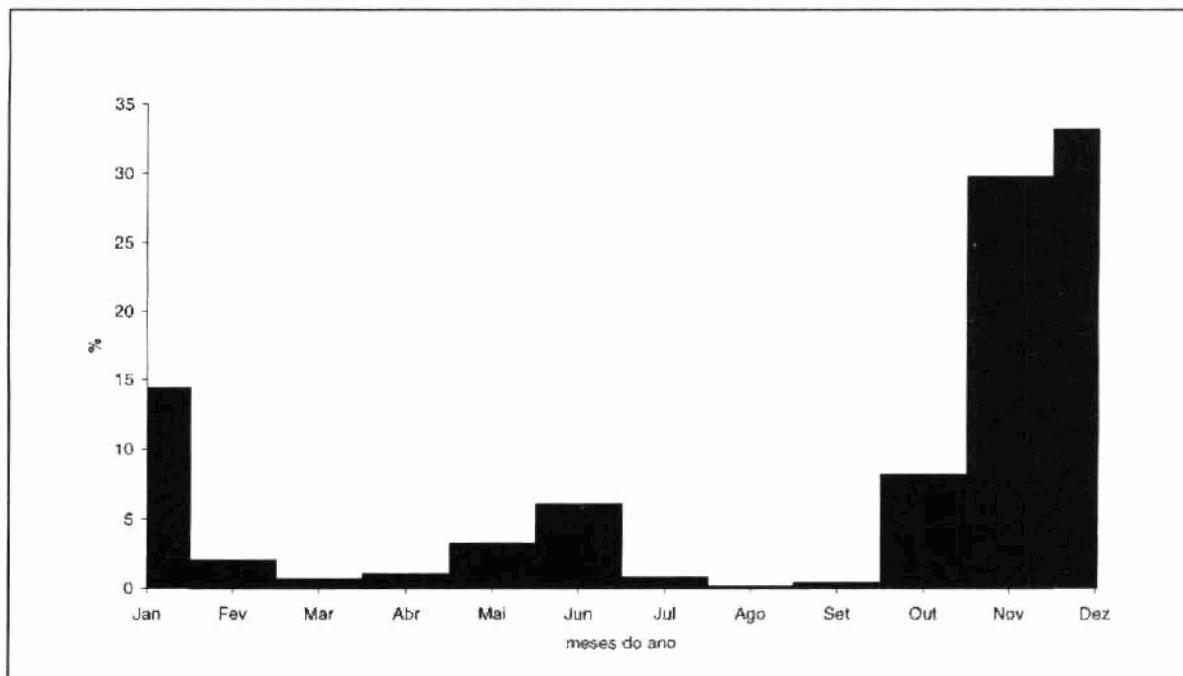
O criador que já usa inseminação artificial e tem um rebanho pequeno (em torno de 100 ovelhas), consegue reduzir os custos em 0,5% sincronizando com pessários de gestáneos e em torno de 10% empregando dose reduzida de prostaglandina. Para rebanhos com 250 e 500 fêmeas as despesas são maiores, considerando a quantidade de produtos necessária para a sincronização. No entanto, para rebanhos grandes, a utilização da inseminação artificial sincronizada, particularmente com PG, pode reduzir sobremaneira os custos.

4. MÉTODOS DE SINCRONIZAÇÃO DE CIOS EM BOVINOS

A eficiência dos sistemas de produção de bovinos de corte é dependente da taxa de terneiros nascidos e desmamados. A aplicação dos resultados de um estudo sobre custos de produção (75), indicou que o número máximo de dias entre o parto e a concepção para que uma vaca seja economicamente viável numa propriedade é de 100 dias, o que significa uma taxa de fertilidade média de 90%. Para que seja possível a obtenção desses índices é imprescindível que seja utilizada uma estação de monta não superior a 60 dias. Em períodos longos de acasalamento, as últimas vacas a serem fertilizadas tem poucas chances de serem fecundadas novamente no pós-parto, daí a utilidade de sistemas de sincronização. Nas novilhas além da concentração dos partos quando há maior disponibilidade de forragens é possível que se proporcione um pouco mais de tempo para recuperação pós-parto para estes animais, o que pode ser decisivo no desempenho reprodutivo futuro, ou seja, um maior percentual de repetição de cria nessa categoria.

Em contraste com as ovelhas, as vacas podem apresentar cio em qualquer época do ano, no entanto, os produtores normalmente concentram as temporadas de reprodução nos meses de final de primavera/verão e no outono (76). A Figura 19 apresenta a distribuição do início das inseminações no Rio Grande do Sul do final dos anos 70 ao início dos anos 90.

Figura 19: Distribuição das inseminações artificiais em bovinos no Rio Grande do Sul



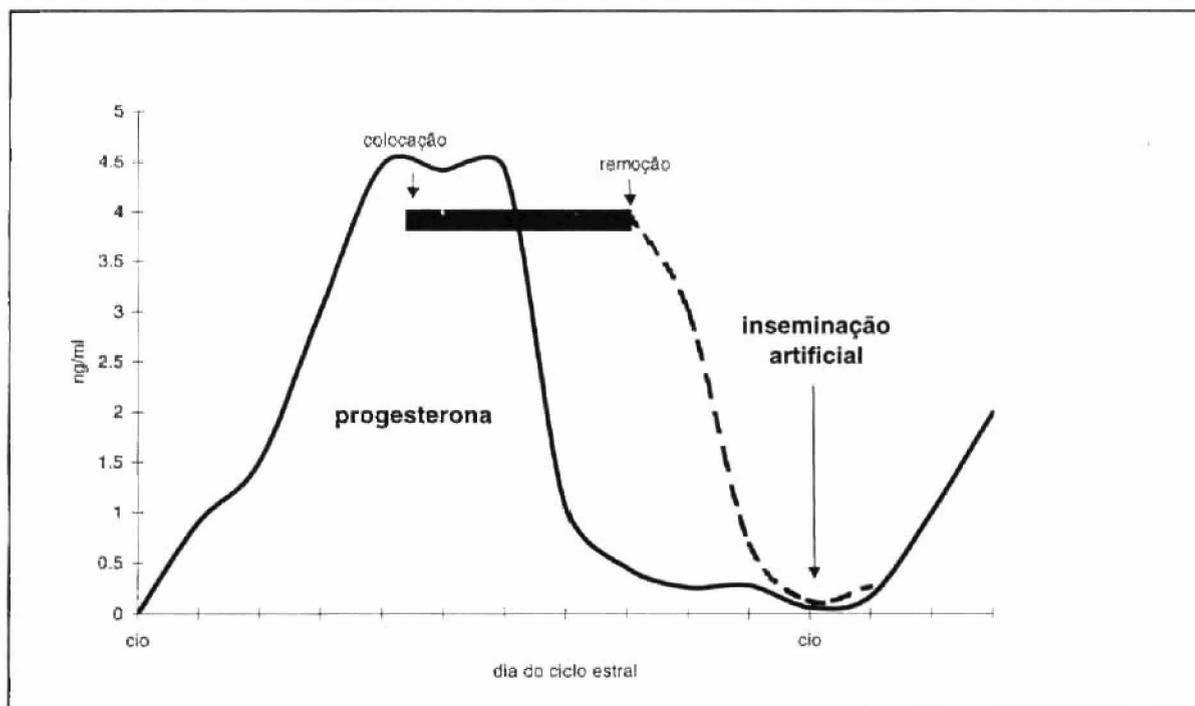
Da mesma forma que nos ovinos os dois grandes grupos de produtos para sincronização de cios são: os progestágenos e as prostaglandinas.

4.1. Controle do ciclo estral com progesterona e progestágenos

A utilização de progestágenos na sincronização de cios em bovinos data dos anos 50, inicialmente sendo administradas por um período de 11 a 14 dias a semelhança dos sistemas desenvolvidos para os ovinos. Posteriormente, em decorrência de baixos índices de fertilidade após sincronização o período de administração passou para 7-9 dias, com a melhoria da fertilidade (77). A Figura 20 apresenta um esquema de como funcionam

os progestágenos na sincronização de cios, prolongando a "ação" da progesterona do corpo lúteo.

Figura 20: Tratamento com progesterona em uma vaca ciclando



Os métodos de administração até agora empregados para promover a liberação lenta são:

- injeção em óleo;
- administração no alimento;
- implantes subcutâneos;
- esponjas intra-vaginais;
- através do sistema PRID (progesterone releasing internal device), espiral de plástico injetado;
- através do sistema CIDR (controlled internal drug release device), aparato de plástico injetado em forma de Y.

O sistema que usa a administração no alimento do progestágeno MGA (acetato de melengestrol) durante 14 dias, proporciona 85% deaios em novilhas na primeira semana após o tratamento, sendo que cerca de 80% ficam gestantes no primeiro mês. O funcionamento dos produtos comerciais estão sumarizados na Tabela 2 (77).

Tabela 2: Sistemas para a sincronização deaios em bovinos empregando progestágenos

Método	Luteolítico	Duração	Aparecimento de cio	Fertilidade
PRID	10 mg estradiol (cápsula)	10-12 dias	2-3 dias	Normal
Norgestomet (Sinchromate, Crestar)	5 mg de estradiol no início	9-10 dias	2-3 dias	Normal
CIDR	10 mg de estradiol (cápsula)	10-12 dias	2-3 dias	Normal

4.2. Esponjas intra-vaginais (Sincrobovi)

No sul do Brasil os atuais sistemas extensivos de produção não suportam aumento de insumos, sob pena, de mesmo com incremento de produtividade inviabilizá-los economicamente.

Na busca de alternativas econômicas para a indução de ovulação e deaios em bovinos de corte foi investigada a possibilidade do uso da medroxi-progesterona e da gonadotrofina sérica eqüina 45 dias

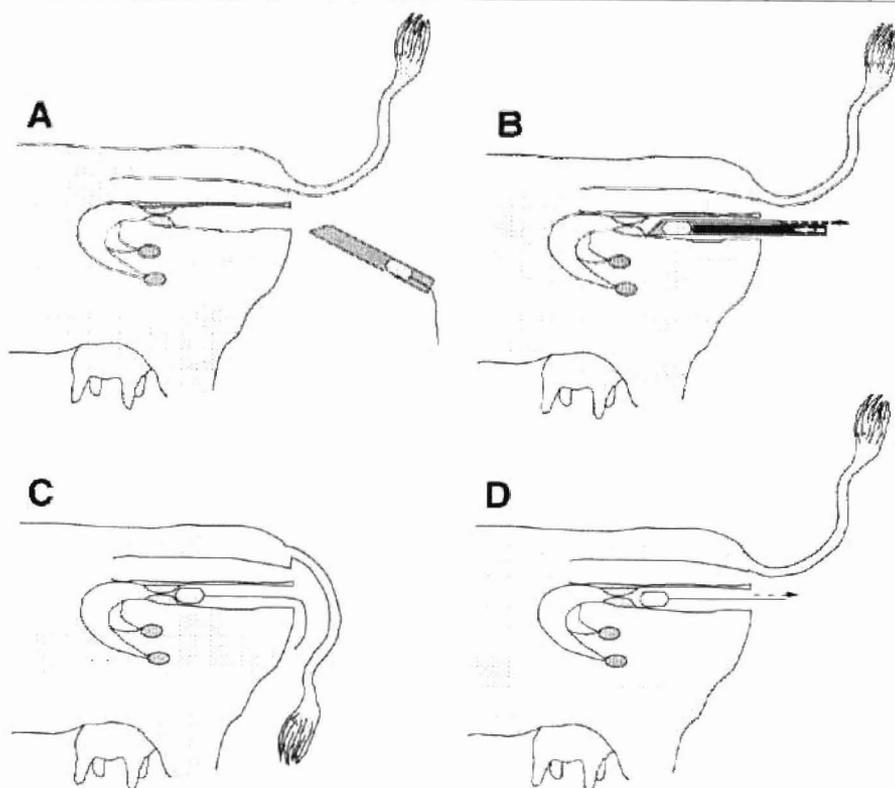
após o parto em vacas de corte paridas na primavera em diferentes condições corporais. Os resultados indicaram que não havia restabelecimento da atividade ovariana, porém que os pessários impregnados com o gestágeno funcionaram adequadamente, indicando a necessidade da efetivação de uma série de ensaios para adequar uma metodologia para uso na região, inicialmente para indução e sincronização deaios em novilhas e posteriormente para a redução do intervalo entre partos em bovinos de corte e de leite.

Após alguns ensaios relativos a densidade, tamanho e forma da esponja que deveria ser empregada para a confecção dos pessários, chegou-se ao pessário "ideal" para vacas: um cilindro de esponja de densidade alta com 4 cm de diâmetro e 10 cm de comprimento, tendo em uma das extremidades um fio de algodão com 35 cm de comprimento, atado em cruz para facilitar sua retirada após 9 dias da colocação.

A concentração empregada de acetato de medroxiprogesterona (250 mg) é a mesma utilizada por produtos artesanais semelhantes desenvolvidos na Argentina e no Uruguai, seguindo a recomendação dos primeiros estudos efetivados na Inglaterra. Os gestágenos para a sincronização deaios em bovinos podem ser utilizados sozinhos ou em associação com luteolíticos, tais como estradiol ou uma prostaglandina. Nosso interesse foi de desenvolver um produto econômico, assim apenas a possibilidade de associação com estradiol foi considerada.

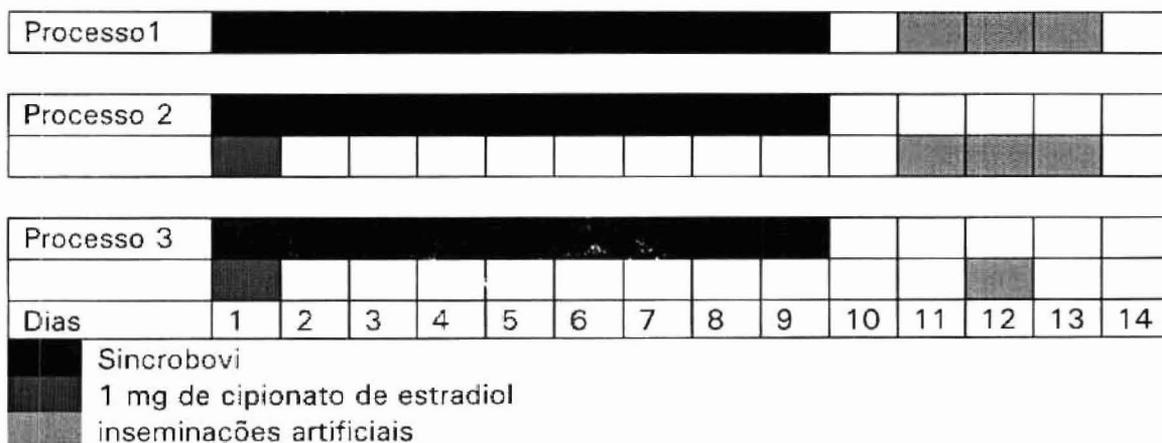
As esponjas devem permanecer de 7-9 dias na vagina das novilhas. A sua colocação é simples, com o auxílio de um espéculo, mandril e uma luva descartável. O Sincrobovi deve ser recoberto por uma fina camada de uma pomada contendo um nitrofurano para evitar a proliferação da fauna bacteriana vaginal. A Figura 21 ilustra a forma de aplicação e retirada das esponjas para a sincronização deaios nos bovinos.

Figura 21: Procedimentos de colocação e retirada do pessário



- A** = Colocação da esponja vaginal com auxílio de um espéculo, devem ser observados cuidados higiênicos com a desinfecção do material e aplicação de pomada antimicrobiana na esponja.
- B** = Aplicação da esponja usando um mandril para liberar o pessário.
- C** = Local correto da deposição do pessário.
- D** = Posição de tração para a retirada do pessário, verificar sempre se não ficaram pedaços da esponja vaginal.

No quadro abaixo estão ilustradas as três situações averiguadas para o uso do Sincrobovi. Ou seja, as esponjas podem ser utilizadas sozinhas ou em associação com a injeção de 1 mg benzoato de estradiol ou mesmo de cipionato de estradiol no momento da colocação dos pessários. O Processo 1, consiste apenas na colocação das esponjas durante nove dias e início das observações de cios 24 horas após a sua remoção, para a execução das inseminações artificiais de forma tradicional, ou seja, as vacas identificadas em cio pela manhã são inseminadas à tarde e as identificadas à tarde na manhã do dia seguinte. O Processo 2 tem em associação 1 mg de cipionato de estradiol na colocação do pessário. A associação com o estradiol é desejável pelo seu efeito luteolítico, proporcionando taxas de inseminação em torno de 90%. Estas altas taxas de inseminações ocorrem num curto intervalo de tempo (48 a 72 horas após a remoção dos pessários). Este fato permite que as inseminações sejam procedidas com tempo pré-fixado, 56 horas após a remoção dos pessários com bons resultados em termos de fertilidade, o que é apresentado como Processo 3.



Na Tabela 3 são apresentados os índices relativos a percentagem de perda das esponjas, taxa de inseminação e taxa de prenhez com e sem observação de cios nos animais que receberam o Sincrobovi.

TABELA 3: Indicadores de desempenho do Sincrobovi

Indicador	Amplitude
% de perda de pessários ao longo dos 9 dias	9 - 33
% de inseminações até 96 horas após a retirada dos pessários sem estradiol	~ 55
% de inseminações até 96 horas após a retirada dos pessários com estradiol	~ 90
% prenhez após IA com observação de cio	65 - 75
% prenhez após IA sem observação de cio	50 - 65

A utilização do processo na prática permite que quase a totalidade das vacas destinadas à inseminação artificial sejam inseminadas no mesmo dia (56 - 62 horas) após a remoção das esponjas e apenas controladas para um segundo serviço após 17 dias, durante um período de 14 dias. Este procedimento permite um período de serviço de 25 dias, oportunizando tempo para duas inseminações nas vacas sincronizadas. Apenas não devem ser inseminadas com tempo pré-fixado as vacas que perderam os pessários.

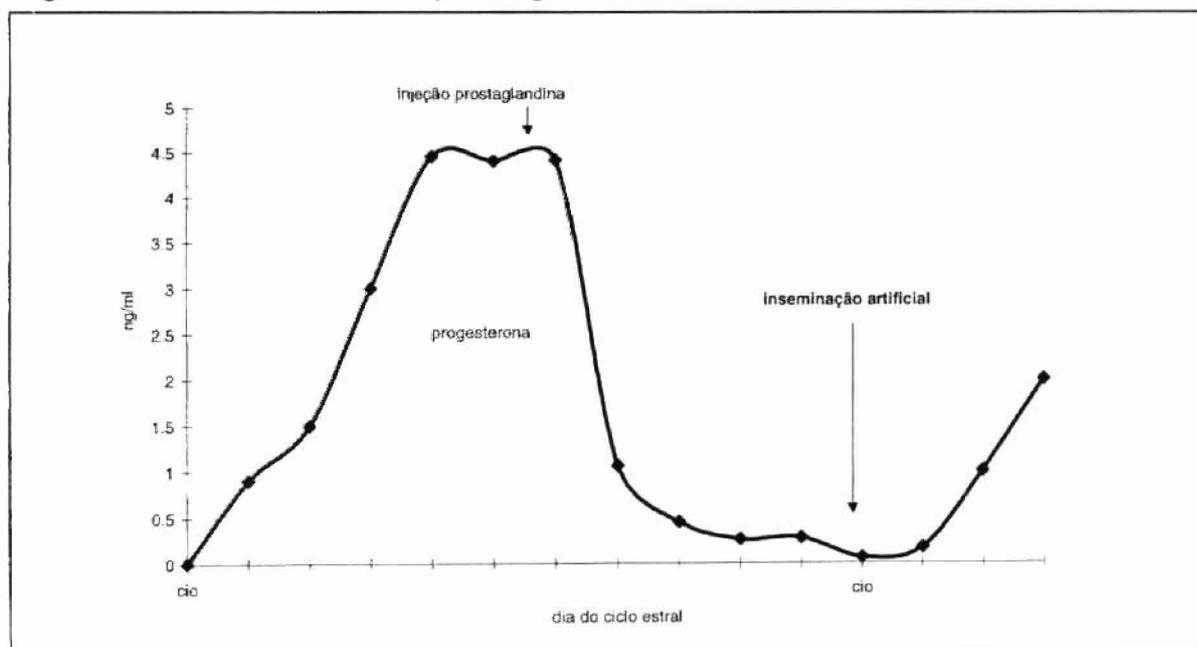
4.3. Controle do ciclo estral com prostaglandinas

Durante a década de 70 foi acumulado um grande volume de informações sobre as prostaglandinas e suas ações. As prostaglandinas foram inicialmente detectadas

no líquido seminal de carneiros, possivelmente secretadas pela próstata, daí a denominação de prostaglandinas. As prostaglandinas são sintetizadas em inúmeras células quando requisitadas, não são armazenadas e tem meia vida biológica muito curta.

Os análogos sintéticos (cloprostenol, tiaprost etc) são mais potentes que as prostaglandinas naturais e funcionam como agentes luteolíticos em vacas que estão ciclando normalmente, determinando a queda dos níveis de progesterona, desenvolvimento folicular terminal e pico de LH dentro de três dias, como pode ser visualizado na Figura 22. Um aspecto que deve ser considerado é que a atuação luteolítica das prostaglandinas determina aborto nos primeiros quatro meses de gestação, em decorrência desse fato, sempre é importante que o emprego desse produto na manipulação do ciclo estral seja efetuado sobre a supervisão de um veterinário.

Figura 22: Tratamento com prostaglandina em uma vaca ciclando



Existem inúmeras alternativas para uso das prostaglandinas. Na Tabela 4 são apresentadas algumas, sendo interessante salientar a importância da aplicação da PG exclusivamente no diestro. Um outro aspecto importante para ser focado é a facilidade e economicidade de cada sistema, relativos ao requerimento de experiência na avaliação ginecológica para a detecção de uma vaca ciclando e/ou com CL nos ovários para a tomada de decisão na injeção da PG para maximizar sua eficiência.

Tabela 4: Resumo das vias de injeção e sistemas de administração das prostaglandinas

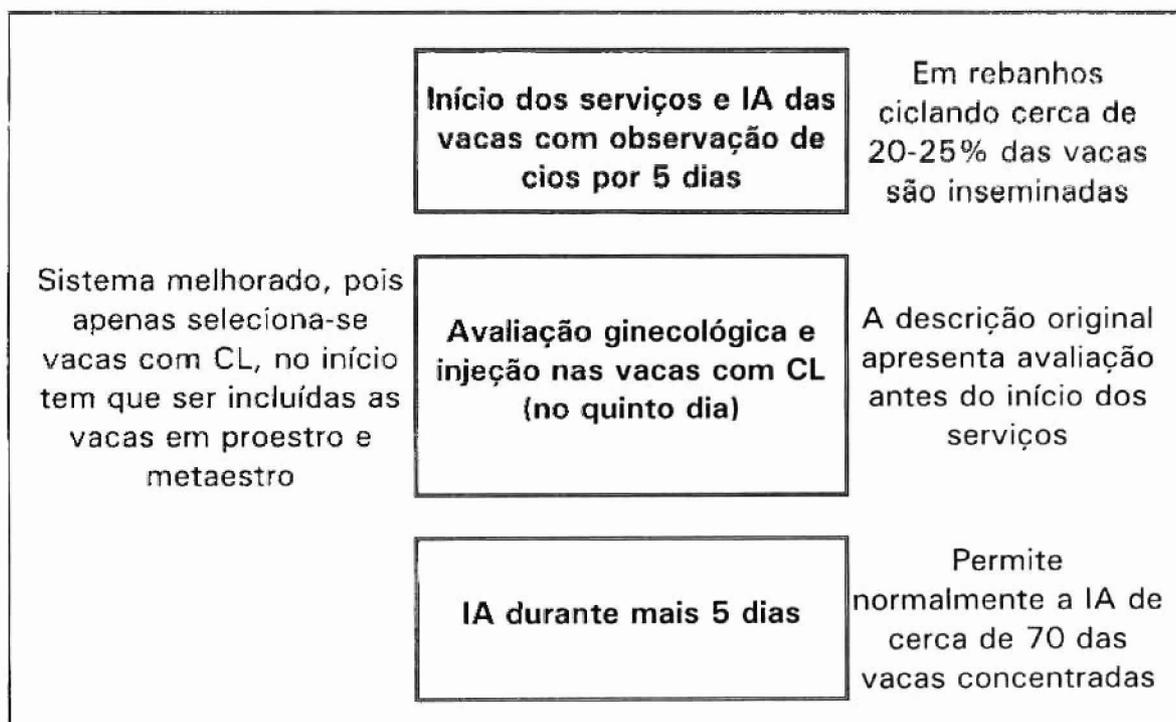
Sistema	Momento da IA
Duas injeções com intervalo de 11 dias	Após 72 - 96 horas
Injetar todas as vacas e inseminar; re-injetar as que não responderam em 11 dias	Após detecção de cio
Inseminar normalmente por 7 dias e injetar as remanescentes	Após detecção de cio
Avaliação ginecológica e injetar as com corpo lúteo	Após detecção de cio
Injetar vacas com progesterona plasmática superior a 1 ng/ml ou no leite superior a 5 ng/ml	Após detecção de cio
Avaliação por ultra-som e injetar as com corpo lúteo	Após detecção de cio

Roche, 1989 (77)

Como ilustração de metodologia será descrita em maiores detalhes a metodologia relatada por Suñé e colaboradores na região (78). Essa inclui conhecimentos apresentados acima, ou seja, um sistema de inseminação de 10 dias, com injeção de PG nas vacas que não manifestaram cio até o quinto dia de serviço e

inseminação por mais cinco dias, usando uma dose reduzida de PG na submucosa vulvar. Apesar de inúmeras discussões sobre a possibilidade da redução da dose ser efetivamente decorrente da via de aplicação, foi demonstrado e diversas vezes repetido no Brasil a utilidade desse sistema. Evidentemente é um sistema para acasalamento de novilhas de corte ciclando e não para ser usado no preparo de vacas doadoras e/ou receptoras em programas de transferência de embriões.

O quadro abaixo apresenta o fluxograma de uso do sistema de sincronização por 10 dias.



4.4. Comparação de despesas e resultados esperados

Entre as alternativas para a cobertura das novilhas estão sendo comparadas: a monta natural durante 90 dias, utilizando 3% de touros (**MNATURA**); a inseminação

artificial, utilizando os dados médios de um levantamento procedido em 150000 vacas inseminadas na região de influência da Cooperativa Regional Sudeste dos Produtores de Lãs Ltda., é caracterizada por 53 dias de serviço e taxa de não-retorno de 74% (**IARS**); inseminação artificial por 45 dias e repasse com touros por 30 dias, assumindo respectivamente taxas de não-retorno 70% e 80% (**IAPLUS**); inseminação artificial com sincronização sem observação de cios, efetuada por veterinários (79), utilizando três ciclos e uma taxa de não retorno de 46%/serviço (**PGSIS**); e, um sistema de sincronização empregando a quinta parte da dose de prostaglandina durante 10 dias (78) e um período de repasse de 25 dias (**PGMDOSE**).

Na Tabela 5 são apresentadas as despesas com mão de obra e insumos, bem como as prováveis taxas de prenhez em função de estudos já realizados e o custo por novilha prenha. A monta natural (MNATURA) como método de reprodução seria o de eleição em termos de eficácia, no entanto, não é o mais econômico por novilha gestante, quando se empregam touros de boa qualidade (preço médio 1500 reais). Adicionalmente, o sistema apresenta como desvantagem o período de serviço de 90 dias, um dos aspectos responsáveis pelas reduzidas taxas de repetição de cria de novilhas primíparas. A inseminação artificial sendo procedida conforme aqui caracterizada (**IARS**), foi a mais econômica, com eficácia similar à monta natural. Esta metodologia tem como

vantagens adicionais a possibilidade de uso de touros de maior valor genético, escolhidos em função de suas progênes quanto a características importantes ao sistema de produção. Neste contexto, a eleição de touros que proporcionem maior facilidade de parto é um aspecto importante a ser considerado para a primeira parição. Por outro lado, um período de serviço de 53 dias pode viabilizar maiores taxas de repetição de cria em condições adequadas de manejo sanitário e alimentar. O sistema misto, composto por monta natural e inseminação artificial (IAPLUS), apresenta também taxas de prenhez similares à monta natural, porém tem como aspectos a serem considerados a longa duração (75 dias), o custo e as dificuldades adicionais de manejo relativas a manutenção dos touros. Nesse sistema, aquelas novilhas prenhas pela monta natural, dificilmente terão condições de repetir cria na temporada seguinte e as probabilidades de partos difíceis podem ser maiores pela dificuldade de seleção por facilidade de parto dos touros empregados no repasse. O sistema de inseminação com sincronização (PGSIS) inclui maior utilização de tecnologia, através de insumos e mão de obra especializada. Este sistema é o mais caro incluído na comparação, porém viabiliza a inseminação artificial em situações onde a mão de obra do técnico em inseminação artificial não está disponível. Neste sistema, embora sua duração seja similar ao misto (IAPLUS), as partições ocorrem em blocos o que facilita a assistência aos partos. O último sistema comparado é o

PGMDOSE que emprega sincronização de cios e inseminações com observação de cios no primeiro ciclo em 10 dias e um repasse por inseminação artificial convencional. O custo por novilha gestante é similar ao que se obtém em monta natural, incorporando as vantagens de melhoramento zootécnico e a curta duração do período de serviço.

Tabela 5: Comparação de despesas e de eficácia de diferentes alternativas para a cobertura de novilhas de corte em módulos de 100 animais

Item	MNATURA	IARS	IAPLUS	PGSIS	PGMDOSE
Mão de obra					
Campeiro	47,00	28,00	75,00	51,00	26,00
Inseminador	0,00	192,00	175,00	0,00	154,00
Veterinário	0,00	0,00	0,00	192,00	120,00
Material					
C. Fixos	0,00	230,00	230,00	230,00	230,00
C. Variáveis	0,00	771,00	800,00	1.699,00	785,00
Touros	1.350,00	0,00	450,00	0,00	0,00
Despesa total	1.397,00	1.221,00	1.730,00	2.172,00	1.317,00
Dias serviço	90,00	53,00	75,00	75,00	35,00
% Prenhez	99,00	93,00	98,00	84,00	90,00
Despesa/nov. prenha	14,08	13,10	17,62	25,80	14,70

* valores em R\$

A inseminação artificial convencional e com sincronização com minidose em um período reduzido apresentam custos inferiores, podendo ser os métodos de eleição sempre que houver infra-estrutura e recursos humanos necessários para seu emprego. A inseminação artificial associada a monta natural (IAPLUS)

aparentemente não seria o sistema mais indicado pelos custos mais elevados entre 30-35%, pelo maior período de serviço e pela incorporação das desvantagens de manejo tanto da inseminação artificial quanto da monta natural na busca de uma pequena percentagem adicional de terneiros ($\pm 5\%$). O PGSIS seria o método de eleição apenas em casos peculiares em que ocorra interesse num serviço de melhor qualidade técnica e que não exista uma grande preocupação com os custos por terneiro nascido, mas sim que estes sejam filhos de touros provados.

5. REFERÊNCIAS CITADAS

1. Hirshfield, A.N. 1991 Development of follicles in the mammalian ovary. *Int.Rev.Cytol.* 124:43-101.
2. Cahill, L.P. & Mauleon, P. 1980 Influences of season, cycle and breed on follicular growth rates in sheep. *J.Reprod.Fert.* 58:321-328.
3. Cahill, L.P. 1981 Folliculogenesis in the sheep as influenced by breed, season and oestrous cycle. *J.Reprod.Fert.* Suppl. 30:135-142.
4. McNatty, K.P.; Heath, D.A.; Hudson, N. & Clarke, I.J. 1990 Effect of long-term hypophysectomy on ovarian follicle populations and gonadotrophin-induced adenosine cyclic 3'-5'monophosphate output by follicle from Booroola ewes with or without the F gene. *J.Reprod.Fert.* 90:515-522.
5. McNatty, K.P.; Smith, P.; Hudson, N.L.; Heath, D.A.; Lun, S. & O, W.S. 1992, Follicular development and steroidogenesis. In: *Local regulation of ovarian function*, ed. Sjoberg, N.O.; Hamberger, L.; Jansen, P.O.; Owman, C. & Coelingh, H.I.J. The Partenon Publishing Group, Carnforth, Lancs, UK: 21-28.
6. McNatty, K.P.; Kieboom, L.E.; McDiarmid, J.; Heath, D.A. & Lun, S. 1986 Adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and steroid production by small ovarian follicles from Booroola ewes with and without a fecundity gene. *J.Reprod.Fert.* 76:471-480.
7. Eckery, D.C.; Tisdall, D.J.; Heath, D.A. & McNatty, K.P. 1996 Morphology and function of the ovary during fetal and early life: A comparison between the sheep and brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Anim Reprod Sci* 42:551-561.
8. Turnbull, K.E.; Braden, A.W.H. & Mattner, P.E. 1977 The pattern of follicular growth and atresia in the ovine ovary. *Aust.J.Biol.Sci.* 30:229-241.
9. Gosden, R.G.; Baird, D.T.; Wade, J.C. & Webb, R. 1994 Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196°C. *Hum.Reprod.* 9:597-603.
10. Dufour, J.; Cahill, L.P. & Mauleon, P. 1979 Short- and long-term effects of hypophysectomy and unilateral ovariectomy on ovarian follicular populations in sheep. *J.Reprod.Fert.* 57:301-309.

11. McNeilly, A.S.; Jonassen, J.A. & Fraser, H.M. 1986 Suppression of follicular development after LHRH immunoneutralization in the ewe. *J.Reprod.Fert.* 76:481-490.
12. McNeilly, A.S. & Fraser, H.M. 1987 Effect of gonadotrophin-releasing hormone agonist-induced suppression of LH and FSH on follicle growth and corpus luteum function in the ewe. *J.Endocrinol.* 115:273-282.
13. Campbell, B.K.; Scaramuzzi, R.J. & Webb, R. 1995 Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J.Reprod.Fert.* suppl. 49:335-350.
14. Scaramuzzi, R.J.; Adams, N.R.; Baird, D.T.; Campbell, B.K.; Downing, J.A.; Findlay, J.K.; Martin, G.B.; McNatty, K.P.; McNeilly, A.S. & Tsonis, C.G. 1993 A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod.Fertil.Dev.* 5:459-478.
15. Henderson, K.M.; McNatty, K.P.; O'keeffe, L.E.; Lun, S.; Heath, D.A. & Prisk, M.D. 1987 Differences in gonadotrophin stimulated cyclic-AMP production by granulosa cells from Booroola x Merino ewes which were homozygous, heterozygous or non-carriers of a fecundity gene influencing their ovulation rate. *J.Reprod.Fert.* 81:395-402.
16. Driancourt, M.A. 1994 Lack of between-follicle interactions in the sheep ovary. *Reprod.Nutr.Develop.* 34:249-260.
17. Carson, R.S.; Findlay, J.K.; Burger, H.G. & Trounson, A.O. 1979 Gonadotropin receptors of the ovarian follicle during follicular growth and atresia. *Biol.Reprod.* 21:75-87.
18. Webb, R. & England, B.G. 1982 Identification of the ovulatory follicle in the ewe: Associated changes in follicular size, thecal and granulosa cell luteinizing hormone receptor, antral fluid steroids, and circulating hormones during the preovulatory period. *Endocrinology* 110:873-881.
19. Webb, R. & England, B.G. 1982 Relationship between LH receptor concentrations in thecal and granulosa cells and in-vivo and in-vitro steroid secretion by ovine follicles during the preovulatory period. *J.Reprod.Fert.* 66:169-180.

20. Campbell, B.K.; McNeilly, A.S.; Mann, G.E. & Baird, D.T. 1991 The effect of stage of estrous cycle and follicular maturation on ovarian inhibin production in sheep. *Biol.Reprod.* 44:483-490.
21. Gray, C.J. 1988 Glycoprotein gonadotropins. Structure and synthesis. *Acta endocr. Suppl.* 288:20-27.
22. Clarke, I.J. 1996, The Hypothalamo-Pituitary Axis. In: *Scientific Essentials of Reproductive Medicine*, ed. Hillier, S.G.; Kitchner, H.C. & Neilson, J.P. W B Saunders Company Ltd, London: 120-132.
23. Haisenleder, D.J.; Dalkin, A.C. & Marshall, J.C. 1994, Regulation of gonadotrophin gene expression. In: *The Physiology of Reproduction*, ed. Knobil, E. & Neill, J.D. Raven Press Ltd., New York: 1793-1813.
24. Brooks, J. & McNeilly, A.S. 1996 Regulation of gonadotrophin-releasing hormone receptor expression in the ewe. *Anim Reprod Sci* 42:89-98.
25. Farnworth, P.G. 1995 Gonadotrophin secretion revisited - how many ways can FSH leave a gonadotroph. *J.Endocrinol.* 145:387-395.
26. McNeilly, A.S. 1988 The control of FSH secretion. *Acta endocr. Suppl.* 288:31-40.
27. Catt, K.J. 1996, Hormone Receptors. In: *Scientific Essentials of Reproductive Medicine*, ed. Hillier, S.G.; Kitchner, H.C. & Neilson, J.P. W B Saunders Company Ltd, London: 32-44.
28. Catt, K.J. 1996, Intracellular Signaling. In: *Scientific Essentials of Reproductive Medicine*, ed. Hillier, S.G.; Kitchner, H.C. & Neilson, J.P. W B Saunders Company Ltd, London: 45-59.
29. Baird, D.T.; Campbell, B.K.; Mann, G.E. & McNeilly, A.S. 1991 Inhibin and oestradiol in the control of the FSH secretion in the sheep. *J.Reprod.Fert. Suppl.* 43:125-138.
30. Martin, G.B.; Price, C.A.; Thiéry, J-C. & Webb, R. 1988 Interactions between inhibin, oestradiol and progesterone in the control of gonadotrophin secretion in the ewe. *J.Reprod.Fert.* 82:319-328.

31. Miller, C.D. & Miller, W.L. 1996 Transcriptional regression of the ovine follicle-stimulating hormone- β gene by 17 β -estradiol. *Endocrinology* 137:3437-3446.
32. Bister, J.L. & Paquay, R. 1983 Fluctuations in the plasma levels of the follicle-stimulating hormone during estrous cycle, anestrus, gestation and lactation in the ewe: Evidence for an endogenous rhythm of FSH release. *Theriogenology* 19:565-582.
33. Campbell, B.K.; Scaramuzzi, R.J.; Evans, G. & Downing, J.A. 1991 Increased ovulation rate in androstenedione-immune ewes is not due to elevated plasma concentrations of FSH. *J.Reprod.Fert.* 91:655-666.
34. Ginther, O.J.; Kot, K. & Wiltbank, M.C. 1995 Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology* 43:689-703.
35. Clarke, I.J. & Cummins, J.T. 1982 The temporal relationship between Gonadotrophin Releasing Hormone (GnRH) and Luteinizing Hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 111:1737-1739.
36. Goodman, R.L. 1994, Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. In: *The Physiology of Reproduction*, ed. Knobil, E. & Neill, J.D. Raven Press Ltd., New York: 659-709.
37. Robinson, J.E. 1995 Gamma-amino butyric acid and the control of GnRH secretion in sheep. *J.Reprod.Fert.* Suppl. 49:221-230.
38. Baird, D.T. & McNeilly, A.S. 1981 Gonadotrophic control of follicular development and function in the oestrous cycle of the ewe. *J.Reprod.Fert.* Suppl. 30:119-133.
39. Pant, H.C.; Hopkinson, C.R.N. & Fitzpatrick, R.J. 1977 Concentration of oestradiol, progesterone, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the jugular venous plasma of ewes during the oestrous cycle. *J.Endocrinol.* 73:247-255.
40. Campbell, B.K.; Mann, G.E.; McNeilly, A.S. & Baird, D.T. 1990 Pulsatile secretion of inhibin, oestradiol and androstenedione by the ovary of the sheep during the oestrous cycle. *J.Endocrinol.* 126:385-393.

41. Baird, D.T.; Swanston, I. & Scaramuzzi, R.J. 1976 Pulsatile release of LH and secretion of ovarian steroids in sheep during the luteal phase of the estrous cycle. *Endocrinology* 98:1490-1496.
42. Mann, G.E.; McNeilly, A.S. & Baird, D.T. 1992 Hormone production *in vivo* and *in vitro* from follicles at different stages of the oestrous cycle in the sheep. *J.Endocrinol.* 132:225-234.
43. Adams, G.P.; Matteri, R.L.; Kastelic, J.P.; Ko, J.C.H. & Ginther, O.J. 1992 Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J.Reprod.Fert.* 94:177-188.
44. Souza, C.J.H.; Campbell, B.K. & Baird, D.T. 1998 Follicular waves and concentrations of steroids and inhibin A in ovarian venous blood during the luteal phase of the oestrous cycle in ewes with an ovarian autotransplant. *J.Endocrinol.* 156:563-572.
45. Goodman, R.L.; Bittman, E.L.; Foster, D.L. & Karsch, F.J. 1981 The endocrine basis of the synergistic suppression of Luteinizing Hormone by estradiol and progesterone. *Endocrinology* 109:1414-1417.
46. Baird, D.T. 1978 Pulsatile secretion of LH and ovarian estradiol during the follicular phase of the sheep estrous cycle. *Biol.Reprod.* 18:359-364.
47. Baird, D.T.; Swanston, I.A. & McNeilly, A.S. 1981 Secretion of androgens and estrogens by the preovulatory follicle in the ewe. *Biol.Reprod.* 24:1013-1025.
48. Thiéry, J-C. & Martin, G.B. 1991 Neurophysiological control of the secretion of gonadotrophin-releasing hormone and luteinizing hormone in the sheep - a review. *Reprod.Fertil.Dev.* 3:137-173.
49. Baird, D.T.; Land, R.B.; Scaramuzzi, R.J. & Wheeler, A.G. 1976 Endocrine changes associated with luteal regression in the ewe; The secretion of ovarian oestradiol, progesterone and androstenedione and uterine prostaglandin F₂ α throughout the oestrous cycle. *J.Endocrinol.* 69:275-286.
50. Campbell, B.K.; Mann, G.E.; McNeilly, A.S. & Baird, D.T. 1990 The pattern of ovarian inhibin, estradiol, and androstenedione secretion during the estrous cycle of the ewe. *Endocrinology* 127:227-235.

51. Scaramuzzi, R.J. 1975 Inhibition of oestrous behaviour in ewes by passive immunization against oestradiol-17 β . *J.Reprod.Fert.* 42:145-148.
52. Fabre-Nys, C. & Martin, G.B. 1991 Roles of progesterone and oestradiol in determining the temporal sequence and quantitative expression of sexual receptivity and the preovulatory LH surge in the ewe. *J.Endocrinol.* 130:367-379.
53. Land, R.B.; Pelletier, J.; Thimonier, J. & Mauleon, P. 1973 A quantitative study of genetic differences in the incidence of oestrus, ovulation and plasma luteinizing hormone concentration in sheep. *J.Endocrinol.* 58:305-315.
54. Souza, C.J.H.; Moraes, J.C.F. & Chagas, L.M. 1994 Effect of the Booroola gene on time of ovulation and ovulatory dynamics. *Anim Reprod Sci* 37:7-13.
55. Karsch, F.J.; Bittman, E.L.; Foster, D.L.; Goodman, R.L.; Legan, S.J. & Robinson, J.E. 1984 Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Rec.Prog.Horm.Res.* 40:185-225.
56. Karsch, F.J.; Dahl, G.E.; Evans, N.P.; Manning, J.M.; Mayfield, K.P. & Moenter, S.M. 1993 Seasonal changes in gonadotropin releasing hormone secretion in the ewe - alteration in response to the negative feedback action of estradiol. *Biol.Reprod.* 49:1377-1383.
57. Smeaton, T.C. & Robertson, H.A. 1971 Studies on the growth and atresia of graafian follicles in the ovary of the sheep. *J.Reprod.Fert.* 25:243-252.
58. Webb, R. & Gauld, I.K. 1985, Genetics and physiology of follicle recruitment and maturation during seasonal anoestrus. In: *Endocrine causes of seasonal and lactational anestrus in farm animals*, ed. Ellendorff, F. & Elsaesser, F. Martinus Nijhoff Publishers, Dordercht: 19-28.
59. Souza, C.J.H.; Campbell, B.K. & Baird, D.T. 1996 Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during anoestrus. *J.Reprod.Fert.* 108:101-106.
60. McLeod, B.J.; Haresign, W. & Lamming, G.E. 1982 Response of seasonally anoestrous ewes to small-dose multiple injections of GnRH with and without progesterone pretreatment. *J.Reprod.Fert.* 65:223-230.

61. McNeilly, A.S.; O'Connell, M. & Baird, D.T. 1982 Induction of ovulation and normal luteal function by pulsed injections of luteinizing hormone in anestrus ewes. *Endocrinology* 110:1292-1299.
62. McNatty, K.P.; Hudson, N.; Gibb, M.; Ball, K.; Fannin, J.; Kieboom, L. & Thurley, D.C. 1984 Effects of long-term treatment with LH on induction of cyclic ovarian activity in seasonally anoestrous ewes. *J.Endocrinol.* 100:67-73.
63. Webb, R.; Baxter, G.; McBride, D.; Ritchie, M. & Springbett, A.J. 1992 Mechanism controlling ovulation rate in ewes in relation to seasonal anestrus. *J.Reprod.Fert.* 94:143-151.
64. Signoret, J.P. 1990. The influence of the ram effect on the breeding activity in Merino rams. In *Reproductive Physiology of Merino Sheep* Ed Oldham, C.M.; Martin, G.B. & Purvis, I.W., UWA, Perth, 59-70.
- 65 Evans, G. & Maxwell, W.M.C. 1987 Salamon's artificial insemination of sheep and goats. 1st ed., Sydney, Butterworths, 194 p.
- 66 Mies Filho, A. & Ramos, A. A. 1960 Estacionalidade reprodutiva em ovelhas no Rio Grande do Sul. *Bol. Insem. Artif.* 3:110-116.
- 67 Martin, G.B.; Oldham, C.M.; Cognie, Y. & Pearce, D.T. 1986 The physiological responses of anovulatory ewes to introduction of rams - A review. *Livest.Prod.Sci.* 15:219-247.
- 68 Mies Filho, A. 1975 Inseminação artificial. 6 ed., v.2. Porto Alegre, Sulina, 750 p.
- 69 Robinson, T.J. 1967 The control of the ovarian cycle in the sheep. 1st ed. Sydney, Sydney University Press, 258 p.
- 70 Cognie, Y. 1993 Progress in reproduction techniques in sheep. In: Congreso Mundial de Ovinos y Lanas, Ed. Mueller, J. & Spath, J.A., Buenos Aires, Argentina, Cap. III, 111-129.
- 71 Hoppe, K.F. & Slyter, A. L. 1989 Effects of prostaglandin dosage on synchronizing ovine estrus using a modified single injection regimen. *Theriogenology*, 31:1191-1200.
- 72 Douglas, R.H. & Ginther, O. J. 1973 Luteolysis following a single injection of prostaglandin F_{2α} in sheep. *J. Anim. Sci.*, 37:990-993.

- 73 Chagas L.M.; Souza, C.J.H.; Moura, A. & Moraes, J.C.F. 1994 Viabilidade do emprego de uma minidose de prostaglandina na sincronização de cios em ovinos. *Ciência Rural*, 24:355-358.
- 74 Souza, C.J.H.; Chagas, L.M.; Moura, A. & Moraes, J.C.F. 1995 Momento da ovulação em ovelhas Corriedale após cio natural e induzido com progestágeno e eCG. *Ciência Rural*, 25: 277-281.
- 75 Collares, R. S. 1994 Custo de produção de terneiros até o desmame. Embrapa, Mimeografado. Centro de Pesquisa de Pecuária dos Campos Sulbrasilieiros.
- 76 Moraes, J.C.F. 1994 Caracterização da inseminação artificial em vacas de corte no Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 18:142-152.
- 77 Gordon, I. 1996 Controlled reproduction in cattle and buffaloes. 1st ed. CAB International, Londres, 492 p.
- 78 Suñé, J.F.V.; Gonçalves, P.B.D.; Macedo, J.L.B. & Moraes, J.C.F. 1985 O uso de uma mini-dose de prostaglandina na sincronização de cios em bovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 9:141-145.
- 79 Pimentel, C.A. & Freire, C.R. 1991 Um método para sincronização de cios em bovinos e inseminação com tempo fixo. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 15:25-40.