

Ana Claudia Zanotto Barcelos

**MODIFICAÇÕES NO PROTOCOLO SUPERESTIMULATÓRIO P36 NAS
RAÇAS BONSMARA E NELORE: ATRASO NA INDUÇÃO DA OVULAÇÃO
E SUBSTITUIÇÃO DAS DUAS ÚLTIMAS DOSES DE FSH POR eCG**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Moraes Barros

**Botucatu
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dedico este trabalho

**Aos meus pais, Silvia de Fátima Sanches Zanotto
Barcelos e Laudelino Novaes Barcelos, pelo carinho,
incentivo e introdução na Medicina Veterinária.**

**Ao meu irmão Dari, pela convivência e
companheirismo ao longo destes anos.**

**Ao meu noivo Lucas Maciel Gouvêa, pela
cumplicidade e apoio em todos os momentos.**

Ao Prof. Dr. Ciro Moraes Barros, por me orientar ao longo deste período, compartilhando toda sua experiência e conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Aos amigos e companheiros de pós-graduação: Alfredo Souza, Bruno Giorno, Evandro Sartorelli, Marcelo Nogueira, Marcelo Pegorer, Paulo Fernandes, Rafael Satrapa, Renato Simões, Ronaldo Ereno, Vinícius Pinheiro e Taís Nabhan e aos que aqui não foram mencionados pela troca de experiência e momentos agradáveis.

A todos os colegas de graduação pelo convívio inesquecível e pelos momentos que ficarão guardados com muito carinho.

Aos docentes, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Farmacologia pelo aprendizado, compreensão e respeito durante esses anos.

Ao Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira, pela participação fundamental na realização do experimento 1.

Aos Médicos Veterinários Lucas Maciel Gouvêa e Melissa Meneghel pelo auxílio no experimento 2.

A Dra. Luzia A. Trinca pela análise estatística dos resultados.

Aos funcionários da Pós-graduação do Instituto de Biociências de Botucatu pelo auxílio e orientação.

Aos proprietários e funcionários da Fazenda Nova América (Tarumã-SP; experimento 1) e da Fazenda Santa Maria (Três Lagoas-MS; experimento 2), pela cessão dos animais e da infra-estrutura utilizada nos experimentos.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio financeiro.

"O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto."

(Thomas Huxley)

"Nós somos o que fazemos repetidamente, a excelência não é um feito, e sim, um hábito."

(Aristóteles)

"Nenhuma mente que se abre para uma nova ideia votará a ter o tamanho original."

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	9
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3. MATERIAL E MÉTODO.....	30
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
5. RESULTADOS.....	36
6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÃO.....	47
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

BE = Benzoato de estradiol

CIDR-B[®] = Dispositivo intravaginal de liberação controlada de droga, para a espécie bovina

CL = Corpo lúteo

DIB[®] = Dispositivo intravaginal bovino

E2 = Estradiol 17 β

eCG = Gonadotrofina coriônica eqüina

EPM = Erro padrão da média

FD = Folículo dominante

FSH = Hormônio folículo estimulante

GnRH = Hormônio liberador de gonadotrofinas

IA = Inseminação artificial

IATF = Inseminação artificial com tempo fixo

IM = Via intramuscular

LH = Hormônio luteinizante

mcg = Microgramas

mg = Miligramas

MHz = Mega hertz

ml = Mililitros

mm = Milímetros

PBS = Tampão fosfato salina

P4= Progesterona

PGF2 α = Prostaglandina F2 α

PMSG = Gonadotrofina sérica da égua prenhe ou Gonadotrofina coriônica eqüina

PRID[®] = Dispositivo intravaginal liberador de progesterona

TE = Transferência de embrião

TETF = Transferência de embriões em tempo fixo

UI = Unidade internacional

US = Ultra-som ou ultra-sonografia

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Tratamento superestimulatório utilizado nas vacas Bonsmara do Grupo P36/LH48. **pg 31**

Figura 2: Tratamento superestimulatório utilizado nas vacas Bonsmara do Grupo P36/LH48/eCG. **pg 32**

Figura 3: Número de folículos (Média \pm EPM) maiores que 6 mm presentes nos ovários das doadoras Bonsmara no momento da administração de LH (D9) nos grupos P36/LH48, P36/LH60 e P36/LH48/eCG. **pg 37**

Figura 4: Taxa de ovulação 24 e 36 h após a administração de LH nos grupos P36/LH48, P36/LH60 e P36/LH48/eCG. Letras diferentes, indicam diferença significativa ($p=0,0060$) e as letras “ab” tendência ($p=0,062$). **pg 37**

Figura 5: Número de folículos (Média + EPM) presentes no ovário das doadoras Nelore no momento da administração de LH (D9) nos grupos P36/LH48 e P36/LH48/eCG. ^{a,b}Diferença significativa ($p=0,0046$). **pg 39**

Figura 6. Taxa de ovulação 24, 36 e 48 h após a administração de LH nos grupos P36/LH48 e P36/LH48/eCG ($p>0,05$). **pg 39**

Tabela 1. Número de folículos maiores que 6 mm presentes no D9 do protocolo superestimulatório, taxa de ovulação 24 e 36 h após a administração de LH, número de corpos lúteos e relação CL/folículos (número de CL no dia da colheita multiplicado por 100 e dividido pelo número de folículos maiores que 6 mm presentes no D9), em vacas Bonsmara tratadas com os protocolos P36/LH48, P36/LH60 e P36/LH48/eCG (n=12 por grupo).
Média ± EPM **pg 36**

Tabela 2. Número total de estruturas colhidas, embriões viáveis, estruturas fertilizadas (Média±EPM), taxa de viabilidade (porcentagem) e total de embriões viáveis, obtidos em vacas Bonsmara dos grupos P36/LH48, P36/LH60 e P36/LH48/eCG (n=12 vacas por grupo). **pg 38**

Tabela 3. Número de embriões classificados como excelente, bom, regular e pobre de acordo com suas características morfológicas, obtidas em vacas Bonsmara dos grupos P36/LH48, P36/LH60 e P36/LH48/eCG (n=12 vacas por grupo, porcentagem entre parênteses). **pg 38**

Tabela 4. Número de folículos maiores que 6 mm presentes no D9 do protocolo superestimulatório, taxa de ovulação 24, 36 e 48 h após a administração de LH, número de corpos lúteos e relação CL/folículos (número de CL no dia da colheita multiplicado por 100 e dividido pelo número de folículos maiores que 6 mm presentes no D9), em vacas Nelore tratadas com os protocolos P36/LH48 (n=20) e P36/LH48/eCG (n=20). Média ± EPM. **pg 40**

Tabela 5. Número total de estruturas colhidas, embriões viáveis, estruturas fertilizadas (Média±EPM), taxa de viabilidade (porcentagem) e total de embriões viáveis, obtidas em vacas Nelore dos grupos P36/LH48 e P36/LH48/eCG (n=20 vacas por grupo). **pg 40**

Tabela 6. Número de embriões classificados como excelente, bom, regular e pobre de acordo com suas características morfológicas, obtidos em vacas Nelore dos grupos P36/LH48 e P36/LH48/eCG (n=20 vacas por grupo, porcentagem entre parênteses). **pg 41**

RESUMO

O presente trabalho foi desenvolvido para testar a eficiência do protocolo superestimulatório P36 em vacas da raça Bonsmara ($\frac{5}{8}$ Africâner e $\frac{3}{8}$ Hereford e Shorton) e Nelore. No experimento 1, doze vacas da raça Bonsmara foram divididas aleatoriamente em três grupos (P36/LH48, P36/LH60 e P36/LH48/eCG), sendo que cada fêmea recebeu os três protocolos (cross-over). Em todos os tratamentos os animais receberam um dispositivo intravaginal contendo progesterona (CIDR-B[®], 1,9 g progesterona) e benzoato de estradiol (BE, Estrogin[®], 3,0 mg, via IM) no Dia 0. Os animais foram superestimulados com FSH (Folltropin-V[®], via IM), administrado 2 vezes ao dia, em concentrações decrescentes do D5 ao D8, exceto o grupo P36/LH48/eCG em que as duas últimas aplicações de FSH foram substituídas por uma aplicação de gonadotrofina coriônica equina (eCG, Novormon[®], 200 UI, via IM, Dia 8). No Dia 7, todos os animais receberam uma dose luteolítica de PGF2 α e o CIDR-B foi retirado 36 h após a administração da PGF2 α . No Dia 9, a ovulação foi induzida às 7:00 h (P36/LH48 e P36/LH48/eCG) ou às 19:00 h (P36/LH60) por meio da administração de LH (Lutropin-V[®], 12,5mg, via IM). Os animais foram inseminados 12 e 24 h após a administração de LH, sem observação do estro. As colheitas dos embriões foram realizadas nos dias 16 e 17. Os dados foram analisados por meio da ANOVA (Proc Mixed do SAS). Quando detectada diferença entre tratamentos, realizou-se o teste de Tukey. Os resultados para os animais dos grupos P36/LH48, P36/LH60 e P36/LH48/eCG foram, respectivamente: número de folículos maiores que 6 mm presentes nos ovários no momento da administração de LH (10,7 \pm 1,8, 13,6 \pm 1,6 e 13,1 \pm 1,9; p>0,05), taxa de ovulação observada até 36 h após administração de LH (30,6 \pm 6,2, 66,7 \pm 7,8 e 50,8 \pm 7,0; p<0,01), número de estruturas colhidas (7,2 \pm 1,9, 11,4 \pm 3,5 e 9,8 \pm 2,0; p>0,05) e embriões viáveis (4,6 \pm 1,5, 8,4 \pm 2,4 e 6,6 \pm 1,3; p>0,05). Além disso, a qualidade dos embriões não diferiu entre os grupos. No experimento 2, vacas Nelore (n=20) foram divididas ao acaso em dois grupos: P36/LH48 e P36/LH48/eCG. Cada fêmea recebeu os dois tratamentos de forma alternada (cross-over). Os tratamentos foram similares aos descritos para os grupos da raça Bonsmara, exceto que os animais do Grupo P36/LH48/eCG receberam duas doses de 200 UI de eCG no D8. A análise estatística foi semelhante a realizada no experimento 1. Os resultados para os animais dos grupos P36/LH48 e P36/LH48/eCG foram, respectivamente: número de folículos com diâmetro maior que 6 mm presentes no momento da administração de LH (15,3 \pm 2,1 e 21,1 \pm 2,8; p<0,01), taxa de ovulação observada até 48 h após administração de LH (77,7 \pm 5,6 e 83,9 \pm 2,6; p>0,05), número de estruturas totais colhidas (6,7 \pm 1,2 e 10,0 \pm 1,5; p<0,03), e embriões viáveis (5,1 \pm 1,1 e 7,3 \pm 1,2; p>0,05). Além disso, a qualidade dos embriões não diferiu (p>0,05) entre os grupos P36/LH48 e P36/LH48/eCG. Conclui-se que na raça Bonsmara o atraso de 12 h na administração de LH apesar de ter promovido aumento significativo na taxa de ovulação, determinada 36 h após a aplicação de LH (Grupo P36/LH60 vs P36/LH48), não aumentou significativamente o número total de estruturas e embriões viáveis. Além disso, a substituição das duas últimas doses de FSH por 200 UI de eCG não aumentou significativamente a taxa de ovulação e produção de embriões em vacas tratadas com o protocolo P36/LH48. Entretanto, na raça Nelore, a substituição das duas últimas doses de FSH por 400 UI de eCG (Grupo

P36/LH48/eCG) aumentou o número de folículos maiores que 6 mm presentes nos ovários no dia da administração de LH e também o número de estruturas totais colhidas. Porém, não foi observado aumento significativo no número de embriões viáveis, apesar do aumento numérico destes nas vacas que receberam eCG quando comparadas as do grupo P36/LH48 (146 vs 102, respectivamente).

ABSTRACT

The present study was developed in order to test the efficiency of superstimulatory protocol coined P36 in Bonsmara (5/8 Africaner; 3/8 Hereford and Shorthorn) and Nelore cows. In experiment 1, twelve cows were allocated randomly to three Groups: P36/LH48, P36/LH60 and P36/LH48/eCG, and each cow received all treatments (cross-over design). In all treatments the animals received a progesterone intravaginal device (CIDR-B[®], 1.9 g progesterone) plus estradiol benzoate (EB, Estrogin[®], 3.0 mg i.m.) on day 0. The animals were superstimulated with FSH (Folltropin-V[®], i.m.), administered twice daily in decreasing doses from Day 5 to 8; except Group P36/LH48/eCG, where the last two doses of FSH were switched by one dose of equine chorionic gonadotrophin (eCG, Novormon[®], 200 IU, i.m., Day 8). All cows were treated with PGF2 α on Day 7 at 7:00 h, and CIDR-B was removed 36 h after PGF2 α administration. On Day 9, ovulation was induced by LH administration (Lutropin-V[®], 12.5mg i.m.) at 7:00 h (P36/LH48 and P36/LH48/eCG) or at 19:00 h (P36/LH60). The animals were inseminated at 12 and 24 h after LH administration, without estrus detection. Embryos were recovered on Days 16 and 17. Data were analyzed by ANOVA (Proc Mixed, SAS) followed by Tukey test. Results for animals from groups P36/LH48, P36/LH60 and P36/LH48/eCG were, respectively: number of follicle with diameter larger than 6 mm at the time of LH administration (10.7 ± 1.8 , 13.6 ± 1.6 e 13.1 ± 1.9 ; $p>0.05$), ovulation rate observed up to 36 h after LH administration (30.6 ± 6.2 , 66.7 ± 7.8 e 50.8 ± 7.0 ; $p<0.01$), total number of structures recovered (7.2 ± 1.9 , 11.4 ± 3.5 and 9.8 ± 2.0 ; $p>0.05$) and viable embryos (4.6 ± 1.5 , 8.4 ± 2.4 and 6.6 ± 1.3 ; $p>0.05$). Additionally, embryo quality was similar among groups. In experiment 2, Nelore cows ($n=20$) were randomly allocated to two Groups: P36/LH48 and P36/LH48/eCG. Each female received both treatments in a cross-over design. The treatments were similar to those described for Bonsmara cows, except that the animals from Group P36/LH48/eCG received two doses of eCG (200 UI each) on D8. The statistical analysis was the same described above for experiment 1. Results for animals from groups P36/LH48 and P36/LH48/eCG were, respectively: number of follicle with diameter larger than 6 mm at the time of LH administration (15.3 ± 2.1 and 21.1 ± 2.8 ; $p<0.01$), ovulation rate observed up to 48 h after LH administration (77.7 ± 5.6 and 83.9 ± 2.6 ; $p>0.05$), total number of structures recovered (6.7 ± 1.2 and 10.0 ± 1.5 ; $p<0.03$) and viable embryos (5.1 ± 1.1 and 7.3 ± 1.2 ; $p>0.05$). Additionally, embryo quality was similar among groups P36/LH48 and P36/LH48/eCG. It is concluded that in Bonsmara breed, delaying LH administration for 12 did not significantly increase the total number of structures and viable embryo, in spite of the increase in ovulation rate 36 h after LH administration (Group P36/LH60 versus P36/LH48). Additionally, switching the last two doses of FSH by one dose of eCG did not significantly increase ovulation rate and embryo production from cows treated with protocol P36/LH48. However, in Nelore cows, replacement of the two last doses of FSH by two doses of eCG (Group P36/LH48/eCG) increased the number of follicles larger than 6 mm, at the time o LH administration, and the total number of structures recovered. Nevertheless, the number of viable embryos did not increase significantly, in spite of the perceptible increase on viable embryo production in cows the received eCG as compared to those from Group P36/LH48 (146 vs 102, respectively).

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO

Devido à facilidade de adaptação ao ambiente tropical, os zebuínos (sub-espécie *Bos taurus indicus*, Meirelles et al., 1999) sobressaem em muitos países do hemisfério sul, contrastando com o hemisfério norte onde prevalecem às raças européias (*Bos taurus taurus*). No Brasil predomina o gado Nelore (mais de 90 milhões de cabeças; ACNB, 2006), criado principalmente em regime extensivo. Na África do Sul destaca-se a raça Bonsmara (5/8 Afrikanner e 3/8 de sangue Hereford e Shorhorn), selecionada para a criação extensiva (Bonsma, 1980). O fato desta raça possuir facilidade de adaptação ao ambiente tropical e bom desempenho produtivo, motivou a sua introdução no Brasil.

Além da inseminação artificial, a indução de ovulação múltipla (superovulação) para a produção e transferência de embriões (TE) é uma das biotecnologias mais importantes para acelerar o melhoramento genético de nosso gado zebuíno. Entretanto, a variabilidade de resposta das doadoras de embriões ao tratamento superestimulatório com gonadotrofinas, continua a ser um dos maiores problemas nos programas comerciais de TE (Adams, 1994; Armstrong, 1993; Boland & Roche, 1993; Barros & Nogueira, 2001), apesar das diversas pesquisas realizadas nesta área (Callesen et al. 1987; Del Campo et al., 1990; Hytell et al., 1991; Stock et al., 1996; Nogueira et al., 2002).

Vários tipos de gonadotrofinas foram propostos para induzir superovulação (Gordon, 1996; Barros & Nogueira, 2001, Baruselli et al., 2006). Entre os agentes superovulatórios testados destacam-se a gonadotrofina coriônica eqüina (eCG ou PMSG) administrada isoladamente (Rowson et al., 1972; Elsdén et al., 1976; Boland et al., 1978) ou associada ao soro anti-PMSG (Dieleman et al., 1987;

Alfurajji et al., 1993; Gonzalez et al., 1994) e o hormônio folículo estimulante (FSH) proveniente de extrato de pituitárias de suínos, ovinos e eqüinos (Donaldson, 1989) ou ainda, FSH recombinante bovino (Looney & Bondioli, 1988; Bellows et al., 1991; Wilson et al., 1993).

A meia-vida do FSH na vaca foi estimada em 5 h ou menos, por isso deve ser aplicada duas vezes ao dia, durante 4 dias, para induzir superovulação (Monniaux, D., 1983). A gonadotrofina coriônica eqüina é uma glicoproteína complexa que contém atividade dos dois hormônios, FSH e LH (Murphy & Martinuk, 1991). Sua meia-vida é de 40 h na vaca e persiste por até 10 dias na circulação das fêmeas bovinas; assim é administrada normalmente em dose única para promover superestimulação (Dieleman et al., 1993). Esta meia-vida longa da eCG pode provocar uma estimulação contínua dos ovários, folículos anovulatórios, perfis endócrinos anormais e redução da qualidade embrionária (Saumande et al., 1978; Mikel-Jenson et al., 1982 e Moor et al., 1984). Entretanto, estes problemas podem ser amenizados pela administração intravenosa de anticorpos contra eCG no momento da primeira inseminação, 12 a 18 h após o início do estro (Gonzalez et al., 1994). Mais recentemente Martins et al. (2006a) relataram que a utilização de dose única de eCG (2000 UI) na raça Nelore, após a sincronização do início da onda folicular com progesterona e benzoato de estradiol, originou número semelhante de embriões viáveis comparado ao grupo que recebeu 8 aplicações de FSH em doses decrescentes.

No gado zebuino, a detecção do estro é particularmente difícil devido a curta duração do comportamento estral e elevada incidência de estro noturno (Pinheiro et al., 1998). Para superar este problema vários tratamentos hormonais foram desenvolvidos para controlar o desenvolvimento folicular e o momento da

ovulação, a fim de permitir a inseminação artificial em tempo fixo (Bó et al., 2003; Barros et al., 2004; Baruselli et al., 2004). De forma similar, o desenvolvimento folicular e a ovulação tem sido manipulados farmacologicamente para melhorar programas de superestimulação e transferência de embriões bovinos (Barros & Nogueira, 2001; Nogueira et al., 2002; Baruselli et al., 2006, Nogueira et al., 2007).

Dentre os tratamentos superovulatórios utilizados em raças zebuínas, Barros e Nogueira (2001) desenvolveram um protocolo, denominado protocolo P36, no qual a fonte de progesterona (CIDR-B[®] ou DIB[®]) é mantida por até 36 horas após a aplicação de Prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) e a ovulação é induzida com hormônio luteinizante (LH) exógeno, administrado 12 horas mais tarde (P36/LH48). Graças à administração exógena de LH é possível controlar o momento da ovulação, que ocorre entre 24 e 36 horas após a injeção de LH (Nogueira & Barros, 2003; Nogueira et al., 2006). Conseqüentemente, a inseminação artificial é realizada em tempo fixo (IATF) 12 e 24 horas após a aplicação de LH, dispensando a detecção do cio das doadoras.

Entretanto, a utilização do protocolo P36 em algumas raças européias originou taxas de embriões viáveis inferiores aos protocolos convencionais, motivando alterações neste protocolo. Na raça Holandesa (Martins et al., 2005; Baruselli et al., 2006) e Angus (Chesta et al., 2007), o protocolo P36 se mostrou mais eficaz quando a administração de LH era atrasada por 12 horas, ou seja, o agente indutor da ovulação era administrado 60 horas após a aplicação de PGF_{2α} (P36/LH60).

Além de ter sido utilizado como agente superestimulatório, atualmente o eCG está sendo associado a protocolos hormonais para IATF de vacas em

anestro pós-parto ou transferência de embriões em tempo fixo (TETF) para receptora de embriões bovinos. Nestes protocolos a aplicação de eCG visa estimular o crescimento final do folículo dominante (atividade LH do eCG) e facilitar a sincronização da ovulação, no caso da IATF (Baruselli et al., 2004), ou promover dupla ovulação e/ou aumentar o diâmetro do CL, a fim de melhorar as taxas de concepção das receptoras de embriões (Bó et al., 2006).

Objetiva-se com o presente trabalho testar a hipótese de que a substituição das duas últimas doses de FSH pela administração de eCG, acelera o crescimento folicular e aumenta o número de folículos capazes de responder a administração exógena de LH, promovendo aumento nas taxas de ovulação e de embriões viáveis, nas raças Bonsmara e Nelore. Além disso, será testado em uma raça “taurina adaptada” (Bonsmara) se o atraso na administração de LH, no protocolo P36, é capaz de aumentar a taxa de ovulação e, conseqüentemente, de embriões viáveis.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Dinâmica Folicular

O processo contínuo de crescimento e regressão dos folículos, que leva ao desenvolvimento do folículo pré-ovulatório, é conhecido como dinâmica folicular, enquanto que o padrão de crescimento e atresia de um grupo de folículos ovarianos é denominado onda de crescimento folicular (Lucy et al., 1992).

Durante um ciclo estral ocorrem duas (Pierson & Ginther, 1988, Knopft et al., 1989, Ginther et al., 1989) ou três (Ireland & Roche, 1987, Savio et al., 1988, Sirois & Fortune, 1988) ondas de crescimento folicular e ocasionalmente uma ou quatro (Savio et al., 1988, Sirois & Fortune, 1988, Murphy et al., 1990, Figueiredo et al., 1997), sendo apenas a última onda ovulatória.

O desenvolvimento folicular na espécie bovina envolve o recrutamento de um grupo de folículos para iniciar o crescimento (fase de recrutamento). Dentre estes, um folículo é selecionado, não sofre atresia e potencialmente pode ovular (fase de seleção). O folículo selecionado passa a exercer dominância sobre os demais folículos, suprimindo o crescimento dos mesmos e inibindo o recrutamento de um novo grupo de folículos (fase de dominância; Hodgen, 1982; Ireland & Roche, 1987; Ginther et al., 1989 e 1996; Sirois & Fortune, 1990).

O aumento nas concentrações sanguíneas de FSH, observado um a dois dias antes de cada onda folicular, é fundamental para o recrutamento folicular no início das ondas foliculares durante o ciclo estral (Adams et al., 1992; Ginther, 1999). Quando o maior folículo da nova onda folicular atinge 4-5 mm de diâmetro os níveis de FSH começam a declinar e aproximadamente três dias mais tarde ocorre o “desvio” ou “divergência” folicular, momento no qual o folículo

selecionado passa a ter uma taxa de crescimento maior que os outros folículos recrutados na mesma onda (Ginther et al., 2001b). Após o início do desvio as concentrações de FSH continuam a diminuir. A partir deste momento, somente o folículo dominante contribui para o declínio de FSH, mesmo dependendo deste hormônio para continuar seu crescimento. De acordo com Ginther et al. (2001b), no início da divergência folicular ocorrem alterações no desenvolvimento do maior folículo que o tornam responsivo a baixas concentrações de FSH, as quais são inadequadas para o desenvolvimento dos outros folículos. Acredita-se que um aumento de estradiol plasmático ocasionado pelo futuro dominante, no momento em que se espera a ocorrência do desvio, esteja envolvido na supressão dos níveis de FSH abaixo do nível requerido pelos folículos menores (futuros subordinados; Ginther et al., 2000). A inibina, produzida pelo folículo dominante, também é responsável pela supressão sistêmica do FSH durante a fase de crescimento que antecede a divergência folicular nos bovinos. Deste modo, tanto a inibina quanto o estradiol contribuem para o contínuo declínio nas concentrações de FSH após o desvio.

Do ponto de vista ultra-sonográfico, pode-se definir a seleção pelo momento do “desvio” folicular. Os mecanismos de seleção são controversos, mas provavelmente o folículo selecionado apresenta mais precocemente a capacidade de responder ao estímulo promovido pelo LH (Driancourt, 2001; Sartori et al., 2001). Em resposta ao LH o folículo selecionado continua a crescer e sua capacidade de produzir estradiol e inibina aumenta. Desta forma, o folículo selecionado exerce “dominância” sobre os demais folículos, ou seja, inibe o crescimento dos outros folículos ovarianos. A taxa de crescimento do folículo

dominante é maior quanto maior for a freqüência de pulsos de LH, sendo esta controlada diretamente pelo GnRH (Karsh et al., 1997).

Na presença de altas concentrações plasmáticas de progesterona, há decréscimo na freqüência de pulsos de LH (Roberson et al., 1989). Conseqüentemente, o folículo dominante falha em ovular, perde a dominância e sofre atresia (Ginther et al., 1989, Lucy et al., 1992; Stock & Fortune, 1993). Portanto, é somente por ocasião da luteólise, quando as condições hormonais são favoráveis (progesterona < 1,0 ng/ml), que o folículo dominante poderá ovular.

Controle da dinâmica folicular para a superestimulação

Aproximadamente 20 a 30 folículos emergem em cada onda folicular, e boa parte deles tem o potencial de atingir o estágio pré-ovulatório, fato que pode ser demonstrado pela possibilidade de se estimular o crescimento e a ovulação de vários folículos através da administração de gonadotrofinas (Adams, 1994).

Vários tratamentos para induzir ovulação múltipla (superovulação) foram propostos (Gordon, 1996; Barros & Nogueira, 2001, Baruselli et al., 2006). Entre os agentes superovulatórios testados destacam-se a gonadotrofina coriônica eqüina (eCG ou PMSG) administrada isoladamente (Rowson et al., 1972; Elsdon et al., 1976; Boland et al., 1978) ou associada a soro anti-PMSG (Dieleman et al., 1987; Alfuraiji et al., 1993; Gonzalez et al., 1994) e o hormônio folículo estimulante (FSH) proveniente de extrato de pituitárias de suínos, ovinos e eqüinos (Donaldson, 1989) ou ainda, FSH recombinante bovino (Looney & Bondioli, 1988; Bellows et al., 1991; Wilson et al., 1993).

Apesar de algumas publicações discordantes (Rajamahendran & Calder, 1993; Wilson et al., 1990), existem evidências na literatura de que a presença de um folículo dominante é prejudicial para a indução da ovulação (Adams et al., 1993; Bungartz & Niemann, 1994; Guibault et al., 1991; Huhtinen et al., 1992; Lussier et al., 1995). Foi sugerido que a presença de um folículo dominante no início do tratamento superovulatório suprime o crescimento de folículos menores não dominantes, reduzindo as taxas de ovulação e recuperação de embriões, quando comparado a tratamentos com gonadotrofinas iniciados na ausência de um folículo dominante. Entretanto, Stock et al. (1996), não demonstraram prejuízo no recrutamento de novos folículos em resposta ao tratamento com FSH exógeno na presença de um folículo dominante, mas sim, uma redução na taxa de ovulação. Estes autores sugeriram que a presença de um folículo dominante no início do tratamento superovulatório pode afetar a resposta superovulatória somente se o folículo ovular prematuramente e formar um corpo lúteo. Esse corpo lúteo recém formado seria refratário à ação luteolítica da prostaglandina administrada no protocolo de superovulação e estaria determinando níveis elevados de progesterona suficientes para inibir a ocorrência dos picos endógenos pré-ovulatórios de estradiol e de LH. Assim, nos animais com a formação atípica de um corpo lúteo proveniente da ovulação de um folículo dominante presente no início de um tratamento superovulatório, ocorreriam falhas tanto na manifestação comportamental do cio como no pico endógeno pré-ovulatório de LH, levando a uma diminuição na taxa de ovulação e, conseqüentemente, na produção de embriões viáveis (Stock et al., 1996).

Considerando que após a manifestação de cio ocorre ovulação e início de uma nova onda folicular, vários autores propuseram que o tratamento para induzir

superovulação fosse realizado no início do ciclo estral (Goulding et al., 1990; Fricke et al., 1994; Roberts et al., 1994; Stock et al., 1996). A desvantagem deste sistema é que o tratamento com gonadotrofinas deve ser realizado por um período mais prolongado (6 dias) de forma a permitir que o corpo lúteo recém formado tenha idade suficiente para responder a administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Outra possibilidade é a aspiração do folículo dominante ou de todos os folículos acima de 5 mm de diâmetro antes de iniciar a superestimulação com gonadotrofinas (Bergfelt et al., 1994; Bodensteiner et al., 1996; Hill & Kuehner, 1996). Entretanto, este procedimento requer a utilização de equipamentos de custo elevado.

A forma mais prática de se evitar a presença de um folículo dominante no início do tratamento superestimulatório, foi desenvolvida a partir de uma série de trabalhos publicados por R. J. Mapletoft e G. A. Bó (revisado por Bó et al., 1995, 2003). Nestes trabalhos ficou caracterizado que o uso de dispositivos intravaginais à base de progesterona (CIDR-B[®] ou DIB[®]) e a aplicação concomitante de estrógenos (estradiol 17- β ou benzoato de estradiol) promove a atresia folicular e, conseqüentemente, origina uma nova onda folicular, cerca de 4 a 5 dias após o início dos tratamentos. A fim de evitar a presença de um folículo dominante o tratamento superestimulatório com FSH começa justamente no início da nova onda folicular, ou seja, 4 ou 5 dias após a colocação do dispositivo intravaginal e administração de estrógeno. Dois dias após a primeira aplicação de FSH, é administrada uma dose luteolítica de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e 12 horas mais tarde o dispositivo intravaginal é removido. As doadoras são inseminadas artificialmente 12 e 24 horas após a detecção do cio. Seis a sete dias mais tarde os embriões são colhidos, classificados e inovulados ou congelados. Este protocolo apresenta

duas vantagens: pode ser iniciado em qualquer dia do ciclo estral e dispensa a observação do cio base. Porém, ainda requer a detecção do estro para a inseminação artificial das doadoras.

Inseminação artificial em tempo fixo nas doadoras superestimuladas

Foi sugerido que folículos que não ovulam, após superestimulação com FSH, não se desenvolveram normalmente ou não possuem quantidade suficiente de receptores de LH para responderem ao pico pré-ovulatório de LH (Xu et al., 1995; D'Occhio et al., 1997; Liu et al., 1998). Portanto, estratégias que atrasam o pico pré-ovulatório de LH tem sido utilizadas na tentativa de aumentar o número de embriões (D'Occhio et al., 1997; Van de Leemput et al., 2001) ou ainda para viabilizar a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) após a superovulação (Barros & Nogueira, 2001 e 2005; Baruselli et al., 2006).

Baseando-se em experimentos realizados por pesquisadores holandeses (Vos et al., 1994; Vos et al., 1995; Van de Leemput et al. 2001) e australianos (D'Occhio et al., 1997), Barros & Nogueira (2001) testaram a eficácia de protocolos, nos quais o momento esperado da ovulação era atrasado por 6 a 12 horas e a ovulação era induzida pela administração de LH ou GnRH (Barros & Nogueira, 2001; Nogueira et al., 2002). Estes protocolos não aumentaram significativamente o número de embriões viáveis, entretanto forneceram duas informações importantes: os tratamentos hormonais foram eficazes em controlar o momento da ovulação de forma a permitir a IA com tempo fixo (IATF) e a manutenção de níveis plasmáticos médios (ao redor de 1,5 a 2,5 ng/mL) de progesterona após a última aplicação de FSH poderia ser prejudicial ao

desenvolvimento embrionário, se mantida durante tempo prolongado (Barros & Nogueira, 2001; Melo et al., 2004).

A partir dos dados acima foi desenvolvido um protocolo denominado P36 (Barros & Nogueira, 2001), no qual a fonte de progesterona (CIDR-B[®] ou DIB[®]) é mantida por até 36 horas após a aplicação de PGF2 α e a ovulação é induzida com LH exógeno, administrado 12 horas mais tarde. Graças à administração exógena de LH é possível controlar o momento da ovulação, que ocorre entre 24 e 36 horas após a injeção de LH (Nogueira & Barros, 2003). Conseqüentemente, a inseminação artificial é realizada em tempo fixo (IATF) 12 e 24 horas após a aplicação de LH, dispensando a detecção do cio das doadoras.

Já foi demonstrado que a redução da dose de 25 para 12,5 mg de LH em vacas Nelore não altera significativamente o número de embriões viáveis ou a taxa de viabilidade (Nogueira et al., 2002; Nogueira & Barros 2003). Além disso, podem ser utilizadas diversas fontes exógenas de progesterona (CIDR, DIB ou Cronipress) sem que ocorram alterações na produção de embriões (Barros & Nogueira, 2005; Baruselli et al., 2006, Nogueira & Barros, 2006).

Modificações no Protocolo P36

Uma variação do protocolo P36, onde o dispositivo intravaginal é retirado 24 h após a PGF2 α (protocolo P24) e o LH continua a ser administrado 48 h após a PGF2 α , também pode ser utilizada em fêmeas Nelore, com resultados comparáveis aos obtidos com o P36 (Zanenga et al., 2003, Baruselli et al. 2006).

Os protocolos superestimulatórios associados a IATF apresentam bons resultados para doadoras zebuínas (*Bos indicus*, Nogueira et al., 2002), entretanto, quando doadoras taurinas (*Bos taurus*) são submetidas aos mesmos

tratamentos, o número de estruturas colhidas tem sido insatisfatório (Baruselli et al., 2006). Estes resultados podem ser atribuídos às particularidades fisiológicas que diferenciam vacas *Bos indicus* de *Bos taurus*. Dentre elas, o diâmetro folicular, sendo que fêmeas *Bos taurus* atingem a fase de desvio folicular com diâmetro superior ao de fêmeas *Bos indicus* (6,1 mm; Sartorelli et al., 2005 para *Bos indicus* e 8,5 mm; Ginther et al., 1996 para *Bos taurus*). Deste modo, supõe-se que os folículos de fêmeas taurinas, para atingirem capacidade ovulatória, necessitam alcançar diâmetros superiores aos de fêmeas zebuínas. De fato Sartori et al. (2001) verificaram que fêmeas *Bos taurus* ovulam à administração de LH somente quando os folículos atingem diâmetro acima de 10 mm ao passo que Gimenes et al. (2005) observaram que fêmeas *Bos indicus* já adquirem elevada capacidade ovulatória com diâmetros ao redor de 8,5 mm. Desta forma, protocolos nos quais a administração do indutor da ovulação (LH) é atrasada por 12 horas (P36/LH60), talvez por disponibilizar maior tempo para que os folículos atinjam diâmetros condizentes com a capacidade ovulatória, são mais efetivos em fêmeas taurinas (Martins et al., 2005) do que o protocolo P36/LH48.

Estudos realizados em fêmea das raças Holandesa (Martins et al., 2005) ou Angus (Chesta et al., 2007), onde o tratamento com LH 60 horas após a PGF2 α (protocolo P36/LH60) resultou, nestas raças, em um aumento da resposta superovulatória e maior número de embriões viáveis quando comparado aos protocolos que utilizavam o LH 48 horas (P36/LH48) após a PGF2 α .

Por outro lado, Martins et al., 2006b observaram que a administração de LH 12 horas mais tarde (P36/LH60) em doadoras da raça Nelore aumentou ($p < 0,01$) o número de embriões degenerados e diminuiu ($p < 0,005$) o número de embriões transferíveis e congeláveis. De acordo com estes autores, a diminuição

da qualidade embrionária promovida pelo atraso da indução das ovulações pode ser explicada pelo aumento ($p < 0,05$) do intervalo entre a primeira e a última ovulação e pela tendência ($p = 0,08$) de aumento na dispersão das ovulações quando se atrasou a administração de LH em fêmeas Nelore.

Uso de eCG

A gonadotrofina coriônica eqüina é uma glicoproteína complexa que contém atividade FSH e LH (Murphy, B.D., 1991).

Atualmente a eCG está sendo largamente utilizada em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e de transferência de embriões em tempo fixo (TETF) em receptoras com o objetivo de promover crescimento final do folículo dominante (atividade LH do eCG) e facilitar a sincronização da ovulação, no caso da IATF (Baruselli et al., 2004), ou promover dupla ovulação e/ou aumentar o diâmetro do CL, a fim de melhorar as taxas de concepção nas receptoras de embriões (Bó et al., 2006).

A eCG também pode ser administrada isoladamente para induzir superovulação (Rowson et al., 1972; Elsdén et al., 1976; Boland et al., 1978). Esta gonadotrofina possui uma meia-vida longa (40 h) e persiste por até 10 dias na circulação das fêmeas bovinas; assim é administrada normalmente em uma única aplicação para promover superestimulação (Dieleman et al., 1993). Enquanto que a meia-vida do FSH na vaca foi estimada em 5 h ou menos, por isso deve ser administrada duas vezes ao dia, durante 4 dias, para induzir superovulação (Monniaux et al., 1983). Esta meia-vida longa da eCG pode provocar uma estimulação contínua dos ovários, folículos anovulatórios, perfis endócrinos

anormais e redução da qualidade embrionária (Saumande et al., 1978; Mikel-Jenson et al., 1982 e Moor et al., 1984).

Mais recentemente, Martins et al., (2006a) relataram que a utilização de dose única de eCG (2000 UI) para promover superestimulação em vacas Nelore, após a sincronização do início da onda folicular com progesterona e benzoato de estradiol, originou número semelhante de embriões viáveis e congeláveis quando comparado ao grupo que recebeu 8 aplicações de FSH em doses decrescentes.

Foi demonstrado que após o tratamento superestimulatório com FSH, ocorre aumento nas concentrações de estradiol e progesterona plasmáticas devido ao maior número de folículos e atividade esteroidogênica em vacas superovuladas (Alcivar et al., 1992, Armstrong et al., 1983 e Donaldson et al., 1985). O aumento nos níveis destes esteróides estaria relacionado à inibição tanto da frequência (progesterona) quanto da amplitude (estradiol) dos pulsos de LH (Goodman & Karsch., 1980, Price et al., 1988, Roberson et al., 1989 e Stumpf et al., 1999). Essa diminuição dos pulsos de LH durante o tratamento superovulatório, inicia-se logo após a primeira aplicação de FSH e se acentua ao redor das últimas aplicações e do período pré-ovulatório (Price et al., 1999). Além do decréscimo da pulsatilidade de LH em vacas superestimuladas, ocorre também diminuição do tempo necessário para que os folículos ovarianos atinjam o estágio pré-ovulatório, o que poderia prejudicar a completa pré-maturação dos folículos, até o momento do pico pré-ovulatório de LH (Dieleman & Bevers, 1993, Roberge et al, 1995).

Devido ao fato da administração exógena de FSH (geralmente extrato de pituitária suína contendo FSH e baixas concentrações de LH) não ser capaz de suprir a deficiência endógena de pulsos de LH, Price et al. (1999) propuseram

repor o padrão fisiológico dos pulsos de LH mediante administrações freqüentes de GnRH e conseguiram aumentar o número de folículos pré-ovulatórios provenientes de tratamento superestimulatório. Resultados semelhantes foram obtidos por Melo et al. (2004) após aplicações freqüentes de GnRH em vacas Nelore submetidas a tratamento superovulatório.

3. MATERIAL E MÉTODO

Experimento 1

O experimento foi realizado na Fazenda Nova América (município de Tarumã-SP) com vacas da raça Bonsmara (n=12). Os animais foram mantidos a pasto (Tifton) e suplementados com silagem de milho, bagaço de cana e sal mineral.

As vacas foram distribuídas ao acaso em três grupos: P36/LH48, P36/LH60 e P36/LH48/eCG. Posteriormente os animais foram trocados de grupo de maneira que todas as doadoras fossem submetidas aos três tratamentos (cross-over). Cada período em que a doadora recebeu um tratamento obteve a denominação de rodada.

Grupo P36/LH48: em dia aleatório do ciclo estral, denominado dia zero (D0) as 12 vacas foram avaliadas com o ultra-som para verificar a condição ovariana (população de folículos, presença de corpo lúteo (CL) e ocorrência de cisto folicular) e receberam um dispositivo intravaginal contendo progesterona (CIDR-B[®], 1,9 g, InterAg, Hamilton, Nova Zelândia) e administração de benzoato de estradiol (BE, 3 mg, via IM, Estrogin[®]; Farmavet, São Paulo, Brasil). Cinco dias mais tarde (D5) foi iniciado o tratamento superestimulatório (pFSH, Folltropin-V[®], via IM, NIH-FSH-P1, Bioniche Animal Health, Ontário, Canadá), 2 vezes ao dia, durante 4 dias consecutivos, em concentrações decrescentes de 96 mg, 72 mg, 48 mg e 24 mg, totalizando 240 mg por animal.

No D7 às 7:00 h, foi administrada uma dose luteolítica de um análogo da PGF2 α (d-cloprostenol, Veteglan[®], 150 mcg, via IM, Sorono, Itália). Trinta e seis horas após a aplicação de PGF2 α (D8 às 19:00 h) o dispositivo intravaginal

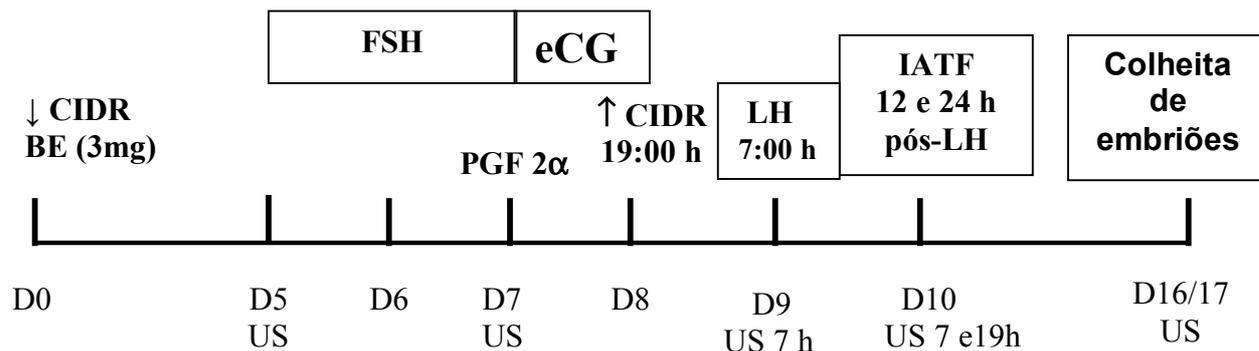


Figura 2: Tratamento superestimulatório utilizado nas vacas Bonsmara do Grupo P36/LH48/eCG. US = ultra-sonografia; IATF = inseminação artificial em tempo fixo.

O exame ultra-sonográfico dos ovários (Aloka SSD 500, transdutor transretal linear de 7,5 MHz, Aloka Co. Ltd. Tokyo, Japão) foi realizado nos dias indicados acima, para acompanhar a eficácia do tratamento superestimulatório e a taxa de ovulação após administração do LH.

A colheita de embriões foi realizada pelo método não cirúrgico (D16 e D17), através de lavagem uterina com tampão fosfato-salina (PBS). Os embriões foram avaliados e classificados como viáveis, degenerados ou não fertilizados (Lindner & Wright, 1983). Os embriões viáveis foram classificados de acordo com a qualidade em grau 1 (GI, excelente), grau 2 (GII, bom), grau 3 (GIII, regular) e grau 4 (GIV, pobre; IETS).

Experimento 2

O experimento 2 foi realizado na Fazenda Santa Maria (município de Três Lagoas-MS) com doadoras da raça Nelore (n=20). Os animais foram mantidos a pasto (*Brachiaria brizantha*) e suplementados com sal mineral.

As vacas foram distribuídas ao acaso em dois grupos: P36/LH48 e P36/LH48/eCG. Posteriormente os animais foram trocados de grupo de maneira que todas as doadoras passaram pelos dois tratamentos. Cada período em que a doadora foi submetida a um tratamento recebeu a denominação de rodada.

Grupo P36/LH48: em dia aleatório do ciclo estral, denominado dia zero (D0) as 20 vacas foram avaliadas com o ultra-som para verificar a condição ovariana (população de folículos, presença de corpo lúteo e ocorrência de cisto folicular) e receberam um dispositivo intravaginal contendo progesterona (DIB[®], 1,0 g, Syntex S.A., Argentina) e administração de benzoato de estradiol (BE, 2,5 mg, via IM, Estrogin[®]; Farmavet, São Paulo, Brasil). Cinco dias mais tarde (D5) foi iniciado o tratamento superestimulatório (pFSH, Folltropin-V[®], via IM, NIH-FSH-P1, Bioniche Animal Health, Ontário, Canadá), 2 vezes ao dia, durante 4 dias consecutivos, em concentrações decrescentes de 53,2 mg, 39,9 mg, 26,6 mg e 13,3 mg, totalizando 133 mg por animal.

No D7 às 7:00 h foi administrada uma dose luteolítica de um análogo da PGF2 α (d-cloprostenol, Veteglan[®], 150 mcg, via IM, Sorono, Itália). Trinta e seis horas após a aplicação de PGF2 α (D8 às 19:00 h) o dispositivo intravaginal contendo progesterona foi removido. A indução da ovulação foi realizada através da administração de LH (Lutropin[®], 12,5 mg, via IM, Bioniche Animal Health, Ontário, Canadá) no D9 às 7:00 h.

Os animais foram inseminados artificialmente em tempo fixo (IATF), sem a observação de cio, 12 e 24 horas após a aplicação de LH (similar a figura 1). Foi utilizada a mesma partida de um único touro para cada vaca/rodada.

Os animais do grupo P36/LH48/eCG receberam tratamento semelhante aos do grupo P36/LH48, exceto que as duas últimas aplicações do FSH foram substituídas por duas aplicações (uma às 7:00 e outra às 19:00 h) de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG, 200 UI, via IM, Novormon[®], D8), totalizando 400 UI de eCG (similar a figura 2).

O exame ultra-sonográfico dos ovários (Aloka SSD 900, transdutor transretal linear de 7,5 MHz, Aloka Co. Ltd. Tokyo, Japão) foi realizado nos dias indicados nas Figuras 1 e 2, para acompanhar a eficácia do tratamento superestimulatório, taxa de ovulação após administração do LH e taxa de prenhez após inovulação dos embriões.

As colheitas dos embriões foram como descrito no experimento 1.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O número de folículos, estruturas totais colhidas, embriões viáveis, estruturas fertilizadas e qualidade embrionária foram transformados em raiz quadrada e os dados de porcentagem (taxa de ovulação e taxa de prenhez) transformados em arco seno. Todos os resultados foram submetidos à Análise de Variância, cujo modelo incluiu efeito de rodada, tratamento, interação entre rodada e tratamento e efeito de doadora, sendo que este último foi considerado como efeito aleatório. Quando detectado diferença entre tratamentos, realizou-se o teste de Tukey para compará-los dois a dois. Para os cálculos utilizou-se o Mixed Procedure do SAS. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$ e tendência valores de $p < 0,1$.

5. RESULTADOS

Experimento 1

O número de folículos maiores que 6 mm presentes nos ovários das doadoras no momento da administração de LH (D9) foi semelhante nos animais tratados com os grupos P36/LH48, P36/LH60 e P36/LH48/eCG (Figura 3 e Tabela 1). Entretanto a taxa de ovulação obtida 36 h após a administração de LH, foi superior nos animais do grupo P36/LH60 quando comparados aos do grupo P36/LH48 (Figura 4 e Tabela 1).

Tabela 1. Número de folículos maiores que 6 mm presentes no D9 do protocolo superestimulatório, taxa de ovulação 24 e 36 h após a administração de LH, número de corpos lúteos e relação CL/folículos (número de CL no dia da colheita multiplicado por 100 e dividido pelo número de folículos maiores que 6 mm presentes no D9), em vacas Bonsmara tratadas com os protocolos P36/LH48, P36/LH60 e P36/LH48/eCG (n=12 por grupo). Média \pm EPM

	Número folículos	Taxa de Ovulação (%)		Número de CL	Relação CL/fol.
		24h	36h		
P36/LH48	10,7 \pm 1,8	2,6 \pm 1,5	30,6 \pm 6,2 ^a	12,0 \pm 1,4	76,5 \pm 5,0
P36/LH60	13,6 \pm 1,6	7,2 \pm 3,9	66,7 \pm 7,8 ^b	13,4 \pm 1,7	80,1 \pm 5,8
P36/LH48/eCG	13,1 \pm 1,9	6,1 \pm 3,9	50,8 \pm 7,0 ^{ab}	13,8 \pm 1,5	87,3 \pm 5,2

^{a,b} Diferença significativa entre linhas (^{a,b}; p = 0,0060).

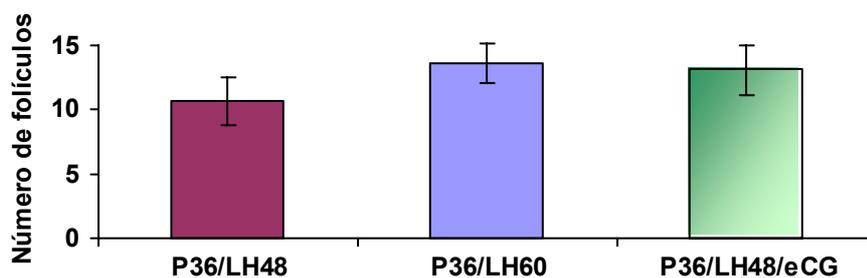


Figura 3: Número de folículos (Média \pm EPM) maiores que 6 mm presentes nos ovários das doadoras Bonsmara no momento da administração de LH (D9) nos grupos P36/LH48, P36/LH60 e P36/LH48/eCG.

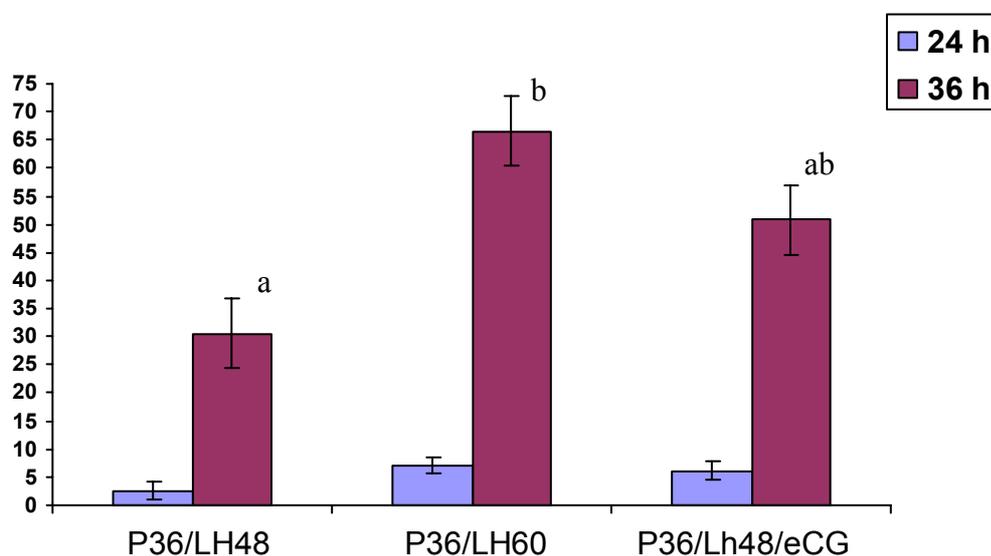


Figura 4. Taxa de ovulação 24 e 36 h após a administração de LH nos grupos P36/LH48, P36/LH60 e P36/LH48/eCG. Letras diferentes, indicam diferença significativa ($p=0,0060$) e as letras “ab” tendência ($p=0,062$).

Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos quanto ao número total de estruturas colhidas, embriões viáveis, estruturas fertilizadas e taxa de viabilidade (Tabela 2). Além disso, a qualidade dos embriões não foi alterada de forma significativa nos diversos tratamentos (Tabela 3).

Tabela 2. Número total de estruturas colhidas, embriões viáveis, estruturas fertilizadas (Média±EPM), taxa de viabilidade (porcentagem) e total de embriões viáveis, obtidos em vacas Bonsmara dos grupos P36/LH48, P36/LH60 e P36/LH48/eCG (n=12 vacas por grupo).

Características	Grupo Experimental		
	P36/LH48	P36/LH60	P36/LH48/eCG
Estruturas colhidas	7,2 ± 1,9	11,4 ± 3,5	9,8 ± 2,0
Embriões viáveis	4,6 ± 1,5	8,4 ± 2,4	6,6 ± 1,3
Estruturas fertilizadas	5,2 ± 1,6	10,3 ± 3,0	7,7 ± 1,7
Taxa de viabilidade (%)	64,0	73,7	67,5
Total embriões viáveis	55	101	79

Não houve diferença significativa entre os grupos (p>0,05 ANOVA).

Tabela 3. Número de embriões classificados como excelente, bom, regular e pobre de acordo com suas características morfológicas, obtidas em vacas Bonsmara dos grupos P36/LH48, P36/LH60 e P36/LH48/eCG (n=12 vacas por grupo, porcentagem entre parênteses).

Qualidade	P36/LH48	P36/LH60	P36/LH48/eCG
Excelente	30 (54,55)	54 (53,47)	34 (43,04)
Bom	11 (20)	24 (23,76)	24 (30,38)
Regular	3 (5,45)	8 (7,92)	16 (20,25)
Pobre	11 (20)	15 (14,85)	5 (6,33)

Não houve diferença significativa entre os grupos (p>0,05 ANOVA).

Experimento 2

O número de folículos maiores que 6mm presentes nos ovários das doadoras no momento da administração de LH (D9) foi significativamente superior nos animais tratados com eCG ($p < 0,01$, Figura 5). Entretanto, o número de CL, taxa de ovulação e relação do número de CL por folículos foi semelhante nos dois grupos experimentais (Tabela 4 e Figura 6).

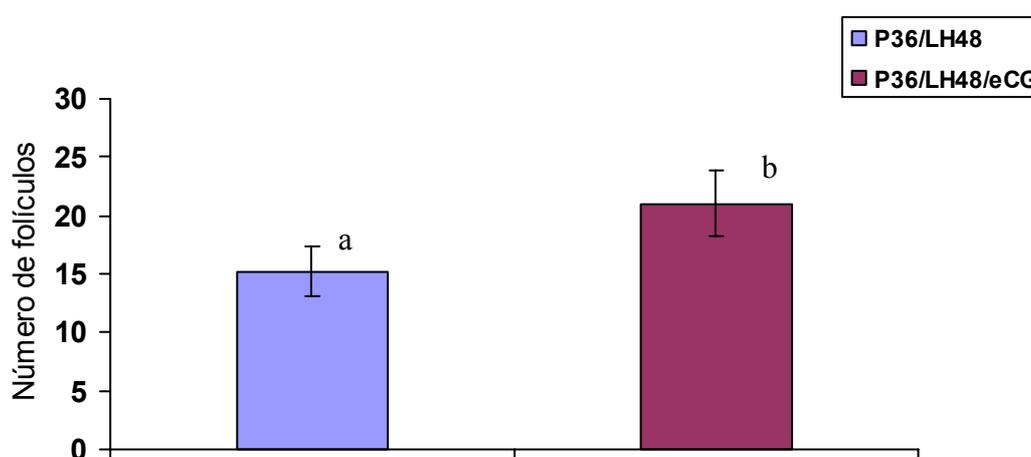


Figura 5: Número de folículos (Média + EPM) presentes no ovário das doadoras Nelore no momento da administração de LH (D9) nos grupos P36/LH48 e P36/LH48/eCG. ^{a,b}Diferença significativa ($p = 0,0046$).

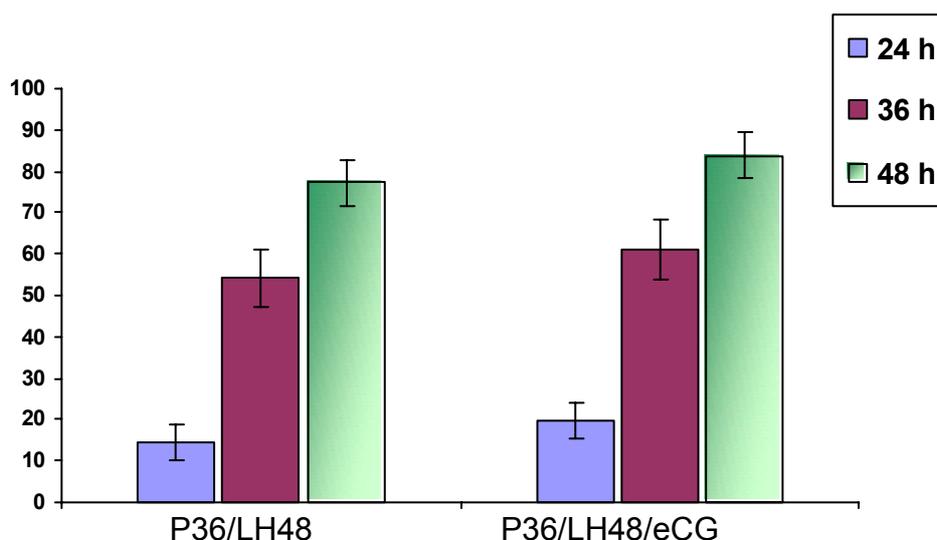


Figura 6. Taxa de ovulação 24, 36 e 48 h após a administração de LH nos grupos P36/LH48 e P36/LH48/eCG ($p > 0,05$).

Tabela 4. Número de folículos maiores que 6 mm presentes no D9 do protocolo superestimulatório, taxa de ovulação 24, 36 e 48 h após a administração de LH, número de corpos lúteos e relação CL/folículos (número de CL no dia da colheita multiplicado por 100 e dividido pelo número de folículos maiores que 6 mm presentes no D9), em vacas Nelore tratadas com os protocolos P36/LH48 (n=20) e P36/LH48/eCG (n=20). Média \pm EPM

	Número folículos	Taxa de Ovulação (%)			Número de CL	Relação CL/fol.
		24h	36h	48h		
P36/LH48	15,3 \pm 2,1	14,3 \pm 4,4	55,6 \pm 6,7	77,7 \pm 5,6	11,2 \pm 1,7	70,3 \pm 5,2
P36/LH48/eCG	21,1 \pm 2,8 **	19,7 \pm 4,7	61,1 \pm 5,0	83,9 \pm 2,6	14,9 \pm 2,0	69,8 \pm 3,9

** Diferença significativa entre linhas (p=0,0046).

O número total de estruturas colhidas aumentou significativamente nos animais tratados com o protocolo P36/LH48/eCG (p<0,03). Entretanto o número de embriões viáveis, estruturas fertilizadas e taxa de viabilidade foi semelhante entre os dois grupos (Tabela 5). Do mesmo modo, a qualidade dos embriões também foi similar entre os dois grupos experimentais (Tabela 6).

Tabela 5. Número total de estruturas colhidas, embriões viáveis, estruturas fertilizadas (Média \pm EPM), taxa de viabilidade (porcentagem) e total de embriões viáveis, obtidas em vacas Nelore dos grupos P36/LH48 e P36/LH48/eCG (n=20 vacas por grupo).

Características	Grupo Experimental	
	P36/LH48	P36/LH48/eCG
Estruturas colhidas	6,7 \pm 1,2	10,0 \pm 1,5 **
Embriões viáveis	5,1 \pm 1,1	7,3 \pm 1,2
Estruturas fertilizadas	6,1 \pm 1,2	8,4 \pm 1,3
Taxa de viabilidade (%)	76,7	73,0
Total de embriões viáveis	102	146

** Diferença significativa entre colunas (p=0,028).

Tabela 6. Número de embriões classificados como excelente, bom, regular e pobre de acordo com suas características morfológicas, obtidos em vacas Nelore dos grupos P36/LH48 e P36/LH48/eCG (n=20 vacas por grupo, porcentagem entre parênteses)

Qualidade	P36/LH48	P36/LH48/eCG
Excelente	43 (42,16)	71 (48,63)
Bom	38 (37,25)	38 (26,03)
Regular	21 (20,59)	32 (21,92)
Pobre	0 (0)	5 (3,42)

Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$ ANOVA).

6. DISCUSSÃO

Em doadoras da raça Bonsmara, apesar do número de folículos com diâmetro superior a 6 mm presentes no ovário no D9 ter sido semelhante, observou-se um aumento significativo ($p < 0,01$) na taxa de ovulação dos animais que receberam o agente indutor de ovulação (LH) 12 horas mais tarde (Grupo P36/LH60) do que os tratados com o protocolo P36/LH48, e tendência de aumento ($p = 0,062$) desta mesma taxa nas doadoras tratadas com o protocolo P36/LH48/eCG em relação às tratadas com o P36/LH48.

É importante destacar que a taxa de ovulação foi determinada até 36 h após a administração de LH. No entanto, ao se calcular a relação entre número de folículos pouco antes da aplicação de LH e o número de CLs visualizados no dia da colheita de embriões, verificou-se que a taxa final de ovulação foi satisfatória nos três tratamentos (superior a 76%, tabela 1). O fato dos animais do Grupo P36/LH60 apresentarem taxa de ovulação mais elevada do que os do P36/LH48, 36 h após a aplicação de LH, indica que houve melhor sincronização da ovulação nos animais que receberam LH exógeno 12 horas mais tarde. Em vacas da raça Nelore, submetidas ao protocolo P36/LH48, Nogueira et al. (2003) observaram que 80% das ovulações ocorreram entre 24 e 36 h após a administração de LH. Por outro lado, na raça Holandesa, Martins et al. (2005) observaram taxa de ovulação de $60,9 \pm 4,8\%$ em animais tratados com o protocolo P36/LH48.

Apesar de não ter havido aumento significativo no número total de estruturas colhidas e embriões viáveis nos animais tratados com o protocolo P36/LH60 quando comparados aos do grupo P36/LH48, os resultados indicam

que o atraso de 12 horas na administração de LH pode ser benéfico para a produção de embriões em doadoras Bonsmara (101 vs 55 embriões viáveis, respectivamente LH60 vs LH48). Estes resultados estão de acordo com os obtidos em fêmeas da raça Holandesa (Martins et al., 2005) ou Angus (Chesta et al., 2007), onde a aplicação de LH 60 horas após a PGF2 α promoveu aumento significativo no número de embriões viáveis, quando comparada a utilização de LH 48 horas após a PGF2 α .

Entretanto, em doadoras da raça Nelore, Martins et al., 2006b observaram que a administração de LH 12 horas mais tarde (P36/LH60), diminuiu o número de embriões viáveis e aumentou o número de embriões degenerados. De acordo com estes autores, a diminuição da qualidade embrionária promovida pelo atraso da indução das ovulações pode ser explicada pelo aumento ($p < 0,05$) do intervalo entre a primeira e a última ovulação e pela tendência ($p = 0,08$) de aumento na dispersão das ovulações quando se atrasou a administração de LH em fêmeas Nelore.

Dentre as possíveis explicações para estes resultados conflitantes entre raças européias e zebuínas estão as particularidades fisiológicas que diferenciam vacas *Bos indicus* de *Bos taurus*, mais especificamente o diâmetro folicular. As fêmeas *Bos taurus* atingem a fase de desvio folicular, fase em que o folículo dominante passa a adquirir receptores de LH (Xu et al., 1995), com diâmetro superior ao de fêmeas *Bos indicus* (6,1 mm; Sartorelli et al., 2005 para *Bos indicus* e 8,5 mm; Ginther et al., 1996 para *Bos taurus*). Deste modo, supõe-se que os folículos de fêmeas taurinas, para atingirem capacidade ovulatória, necessitam alcançar diâmetros superiores aos de fêmeas zebuínas. De fato, fêmeas *Bos taurus* (raça HPB) ovulam à administração de LH somente quando os

folículos atingem diâmetro acima de 10 mm (Sartori et al., 2001), enquanto que fêmeas *Bos indicus* (raça Nelore) adquirem capacidade ovulatória quando os folículos atingem diâmetros de 8,5 mm (Gimenes et al., 2005). Desta forma, protocolos nos quais a administração do indutor da ovulação (LH) é atrasada por 12 horas (P36/LH60), disponibilizando maior tempo para que os folículos atinjam diâmetros condizentes com a capacidade ovulatória, são mais efetivos em fêmeas taurinas (Martins et al., 2005) do que o protocolo P36/LH48.

O fato da adição de eCG no protocolo P36/LH48 ter melhorado numericamente a quantidade de estruturas colhidas e de embriões viáveis nas doadoras da raça Bonsmara, em relação às tratadas com o protocolo P36/LH48 motivou a realização de um novo experimento comparando estes dois tratamentos (P36/LH48 e P36/LH48/eCG) na raça Nelore.

Em vacas da raça Nelore (experimento 2), a adição de eCG ao protocolo P36 aumentou significativamente ($p < 0,01$) o número de folículos maiores que 6 mm presentes no ovário no momento da administração de LH e o número de estruturas totais colhidas ($p < 0,03$), corroborando a hipótese de que a substituição das duas últimas doses de FSH pela administração de eCG, acelera o crescimento folicular e aumenta o número de folículos capazes de responder a administração exógena de LH.

Foi demonstrado que após o tratamento superestimulatório com FSH, ocorre aumento nas concentrações de estradiol e progesterona plasmáticas devido ao maior número de folículos e atividade esteroidogênica em vacas superovuladas (Alcivar et al., 1992, Armstrong et al., 1983 e Donaldson et al., 1985). O aumento nos níveis destes esteróides estaria relacionado à inibição tanto da frequência (progesterona) quanto da amplitude (estradiol) dos pulsos de

LH (Goodman & Karsch., 1980, Price et al., 1988, Roberson et al., 1989 e Stumpf et al., 1999). Essa diminuição dos pulsos de LH durante o tratamento superovulatório, inicia-se logo após a primeira aplicação de FSH e se acentua ao redor das últimas aplicações e do período pré-ovulatório (Price et al., 1999). Além do decréscimo da pulsatilidade de LH em vacas superestimuladas, ocorre também diminuição do tempo necessário para que os folículos ovarianos atinjam o estágio pré-ovulatório, o que poderia prejudicar a completa pré-maturação dos folículos, até o momento do pico pré-ovulatório de LH (Dieleman & Bevers, 1993, Roberge et al, 1995).

Devido ao fato da administração exógena de FSH (geralmente extrato de pituitária suína contendo FSH e baixas concentrações de LH) não ser capaz de suprir a deficiência endógena de pulsos de LH, Price et al. (1999) propuseram repor o padrão fisiológico dos pulsos de LH mediante administrações freqüentes de GnRH e conseguiram aumentar o número de folículos pré-ovulatórios provenientes de tratamento superestimulatório. Resultados semelhantes foram obtidos por Melo et al. (2004) após aplicações freqüentes de GnRH em vacas Nelore submetidas a tratamento superovulatório.

No presente experimento o aumento no número total de estruturas colhidas ($p < 0.01$), implica que houve aumento no número de folículos responsivos à administração exógena de LH. Este resultado pode ser atribuído a atividade LH da gonadotrofina coriônica eqüina, responsável pelo crescimento final (após a fase de divergência; Ginther et al., 2001a) e maturação dos folículos pré-ovulatórios (Hyttel et al., 1997; Dieleman et al., 2002). Entretanto, o uso de eCG não promoveu aumento na qualidade do embriões ou nas taxas de prenhez,

indicando que o efeito principal desta gonadotrofina está mais relacionado ao crescimento do que a maturação folicular.

Os dados do presente trabalho, em concordância com outros (Gradela et al., 1996; Nogueira et al., 2002), mostrou uma variação expressiva na resposta individual das doadoras em relação ao tratamento superestimulatório. Algumas das vacas produziram grande quantidade de embriões viáveis em qualquer um dos tratamentos experimentais a que foram submetidas (5 vacas Nelore originaram, em média, 11,3 e 4 vacas Bonsmara originaram 12,3 embriões viáveis por colheita), enquanto outras produziram um baixo número de embriões viáveis independentemente do protocolo utilizado (5 vacas Nelore originaram, em média, 1,3 e 4 vacas Bonsmara 2,3 embriões viáveis por colheita). Deste modo, o delineamento utilizado nestes dois experimentos, no qual cada animal passou por todos os tratamentos superovulatórios, foi essencial para atenuar o efeito da variação individual nos tratamentos.

Com relação às doses de eCG empregadas no presente trabalho, inicialmente (experimento 1) foi utilizada uma dose baixa (200 UI) para evitar uma possível luteinização dos folículos e, conseqüentemente, falha nas ovulações. Levando-se em consideração os resultados do experimento 1 e a informação de que em protocolos para IATF de vacas em anestro pós-parto utiliza-se a dose de 400 UI para induzir crescimento folicular e sincronização da ovulação, no experimento 2, optou-se por administrar duas doses de 200 UI de eCG a fim de aumentar a dose total (400 UI) desta gonadotrofina e minimizar as chances de luteinização dos folículos. Entretanto, novos experimentos são necessário para determinar a melhor dose de eCG a ser utilizada no protocolo P36 para raças zebuínas e taurinas.

7. CONCLUSÃO

Na raça Bonsmara, o atraso de 12 h na administração de LH promoveu aumento significativo na taxa de ovulação, determinada 36 h após a aplicação de LH (Grupo P36/LH60 vs P36/LH48). Entretanto, não foi observado aumento significativo no número total de estruturas e embriões viáveis, apesar do aumento numérico de embriões viáveis nas vacas tratadas com o protocolo P36/LH60 quando comparadas as do grupo P36/LH48 (101 vs 55, respectivamente). Além disso, a substituição das duas últimas doses de FSH por 200 UI de eCG não aumentou significativamente a taxa de ovulação e produção de embriões em vacas tratadas com o protocolo P36/LH48.

Na raça Nelore, a substituição das duas últimas doses de FSH por 400 UI de eCG aumentou o número de folículos maiores que 6 mm presentes nos ovários no dia da administração de LH e também o número de estruturas totais colhidas. Entretanto, não foi observado aumento significativo no número de embriões viáveis, apesar do aumento numérico destes nas vacas que receberam 400 UI de eCG quando comparadas as do grupo P36/LH48 (146 vs 102, respectivamente).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, G.P., MATTERI, R.L., KASTELIC, J.P., KO, J.C.H., GINTHER, O.J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **J. Reprod. Fertil.**, v.94, p.177-88, 1992.
- ADAMS, G.P., KOT, K., SMITH, C.A., GINTHER, O.J. Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. **Anim. Reprod. Sci.**, v.30, p.259-71, 1993.
- ADAMS, G.P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation. **Theriogenology**, v.41, p.19-24, 1994.
- ALCIVAR, A.A., MAURER, R.R., ANDERSON, L.L. Endocrine changes in beef heifers superovulated with follicle stimulating hormone (FSH-P) or human menopausal gonadotrophin. **J. Anim. Sci.**, v.70, p.224-231, 1992.
- ALFURAJI, M.M., ATKINSON, T., BROADBENT, P.J., HUTCHINSON, J.S.M. Superovulation in cattle using PMSG followed by PMSG-monoclonal antibodies. **Anim. Reprod. Sci.**, v.33, p.99-109, 1993.
- ARMSTRONG, D.T., PFITZNER, A.P., WARNES, G.M., RALPH, M.M., SEAMARK, R.F. Endocrine responses of goats after induction of superovulation with PMSG and FSH. **J. Reprod. Fertil.**, v.67, p.395-401, 1983.
- ARMSTRONG DT. Recent advances in superovulation of cattle. **Theriogenology**, v.39, p.7-24, 1993.
- ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES DE NELORE DO BRASIL - ACNB, <http://www.nelore.org.br>. 2006.
- BARROS, C.M., NOGUEIRA, M.F.G., BELTRAN, M.P., ANDREUSSI, P.A.T. Administration of progesterone and GnRH to control the pre-ovulatory LH surge of Nelore cows that were superstimulated and inseminated at fixed time. **Theriogenology**, v.55, p.511, 2001.
- BARROS, C.M., NOGUEIRA, M.F.G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1483-1496, 2001.
- BARROS, C.M., ERENO, R.L. Recent advances in hormonal treatments used for fixed-time artificial insemination (FTAI) in beef cattle. **Acta Scientiae Veterinariae**, suppl.32, p.23-34, 2004.
- BARROS CM, NOGUEIRA MFG. Superovulation in zebu cattle: protocol P-36. **Embryo Transfer Newsletter**, v.23, p.5-9, 2005.

- BARUSELLI, P.S., REIS, E.L., MARQUES, M.O., NASSER, L.F., BÓ, G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Anim Reprod Sci.**, v.82-83, p.479-86, 2004.
- BARUSELLI PS, DE SÁ FILHO MF, MARTINS CM, NASSER LF, NOGUEIRA MFG, BARROS CM, BÓ GA. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v.65, p.77-88, 2006.
- BELLOWS, R.A., STAIGMILLER, R.B., WILSON, J.M., PHELPS, D.A., DARLING, A. Use of bovine FSH for superovulation and embryo production in beef heifers. **Theriogenology**, v.35, p.1069-82, 1991.
- BERGFELT, D.R., LIGHTFOOT, K.C., ADAMS, G.P. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. **Theriogenology**, v.42, p.895-907, 1994.
- BÓ, G.A., ADAMS, G.P., CACCIA, M., MARTINEZ, M., PIERSON, R.A., MAPLETOFT, R.J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v.39, p.193-204, 1995.
- BÓ, G.A., BARUSELLI, P.S., MARTINEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Anim. Reprod. Sc.**, v.78, p.307-326. 2003.
- BÓ, G.A., BARUSELLI, P.S., CHESTA, P.M., MARTINS, C.M. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. **Theriogenology**, v.65, p.89-101, 2006.
- BODENSTEINER, K.J., KOT, K., WILTBANK, M.C., GINTHER, O.J. Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v.45, p.1115-28, 1996.
- BOLAND, M.P., CROSBY, T.F., GORDON, I. Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG. **Theriogenology**, v.10, p.175, 1978.
- BOLAND MP, ROCHE JF. Embryo production: alternative methods. **Mol Reprod Dev**, v.36, p.266-270, 1993.
- BONSMA, J. C., **Estudios sobre Selección del Ganado**, Hemisferio Sur, Bs. Aires, 132p, 1980.
- BUNGARTZ, I., NIEMANN, H. Assessment of the presence of dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. **J. Reprod. Fertil.**, v.101, p.583-91, 1994.
- CALLESEN, H., GREVE, T., HYTTEL, P. Premature ovulations in superovulated cattle. **Theriogenology**, v.28, p.155-66, 1987.

- CHESTA P, TRIBULO L, TRIBULO H, BALLA E, BARUSELLI PS, BÓ, GA. Effect of time of ovulation induction by gonadotropin-releasing hormone or pituitary luteinizing hormone on ova/embryo production in superstimulated beef cows inseminated at a fixed time. **Reproduction, Fertility and Development**, p.307, 2007, (resumo).
- DEL CAMPO, M.R., BECERRA, F., GONZALEZ, M., MURPHY, B.D., MAPLETOFT, R.J. Superovulation with three different commercial pituitary extracts in the cow. **Theriogenology**, v.33, p.208, 1990.
- DIELEMAN, S.J., BEVERS, M.M., GIELEN, J.TH. Increase of the number of ovulations in PMSG/PG-treated cows by administration of monoclonal anti-PMSG shortly after the endogenous LH peak. **Theriogenology**, v.27, p.222, 1987.
- DIELEMAN, S.J., BEVERS, M.M., VOS, P.L.A.M., DE LOOS, F.A.M. PMSG/anti-PMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment. **Theriogenology**, v.39, p.25-41, 1993.
- DIELEMAN, S.J., HENDRIKSEN, P.J.M., VIUFF, D., THOMSEN, P.D., HYTTEL, P., KNIJN, H.M., WRENZYCKI, C., KRUIP, T.A.M., NIEMANN, H., GADELLA, B.M., BEVERS, M.M., VOS, P.L.A.M. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, v.57, p.5-20, 2002.
- D'OCCHIO, M.J., SUDHA, G., JILELLA, D., WHITE, T., MACLELLAN, L.J., WALSH, J., TRIGG, T.E., MILLER, D. Use of GnRH agonist to prevent the endogenous LH surge and injection of exogenous LH to induce ovulation in heifers superstimulated with FSH: a new model for superovulation. **Theriogenology**, v.47, p.601-13, 1997.
- DONALDSON, L.E., WARD, D.N., GLENN, S.D. Use of porcine follicle stimulating hormone after chromatographic purification in superovulation of cattle. **Theriogenology**, v.25, p.747-57, 1985.
- DONALDSON, L.E. Porcine, equine and ovine FSH in the superovulation of cattle. **Theriogenology**, v.31, p.183, 1989.
- DRIANCOURT, M.A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulations of reproduction. **Theriogenology**, v.55, p.1211-39, 2001.
- ELSDEN, R.P., HASLER, J.F., SEIDEL, G.E.Jr. Non-surgical recovery of bovine eggs. **Theriogenology**, v.6, p.523, 1976.
- FIGUEIREDO, R.A., BARROS, C.M., PINHEIRO, O.L, SOLER, J.M.P. Ovarian follicular dynamics in Nelore Breed (*Bos indicus*). **Theriogenology**, v.47, p.1489-505, 1997.

- FRICKE, P.M., KIRSCH, J.D., REYNOLDS, L.P., REDMER, D.A. Studies of FSH-P induced follicular growth in cows. **Theriogenology**, v.42, p.43-53, 1994.
- GIMENES, L.U., SÁ FILHO, M.F., MADURE, E.H., TRINCA, L.A., BARROS, C.M., BARUSELLI, P.S. Estudo ultrasonográfico da divergência folicular em novilhas *Bos indicus*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33(supl. 1), p.210, 2005 (resumo).
- GINTHER, O.J., KNOPF, L., KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. **J. Reprod. Fertil.**, v.87, p.223-30, 1989.
- GINTHER, O.J., WILTBANK, M.C., FRICKE, P.M., GIBBONS, J.R., KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.48, p.1187-94, 1996.
- GINTHER, O.J., BERGFELT, D.R., KULICK, L.J., KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentration. **Theriogenology**, v.52, p.1079-93, 1999.
- GINTHER, O.J., BERGFELT, D.R., KULICK, L.J., KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. **Biol. Reprod.**, v.63, p. 383-389, 2000.
- GINTHER, O.J., BERGFELT, D.R., BEG, M.A., KOT, K. Follicle selection in cattle : Role of luteinizing hormone. **Biol. Reprod.**, v.64, p.197-205, 2001a.
- GINTHER, O.J., BEG, M.A., BERGFELT, D.R., DONADEU, F. X. KOT, K. Follicle selection in monovular species. **Biol. Reprod.**, v.65, p.638-47, 2001b.
- GOODMAN, R.L., KARSCH, F.J. Pulsatile secretion of luteinizing hormone: differential suppression by ovarian steroids . **Endocrinology**, v.107, p.1286-90, 1980.
- GONZALEZ, A., WANG, H., CARRUTHERS, T.D., MURPHY, B.D., MAPLETOFT, R.J. Increased ovulation rates in PMSG-stimulated beef heifers treated with a monoclonal PMSG antibody. **Theriogenology**, v.33, p.519-529, 1994.
- GORDON, I. **Controlled reproduction in cattle & buffaloes**. Cambridge: CAB Internacional, 492p, 1996.
- GOULDING, D., WILLIAMS, D.H., DUFFY, P., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F. Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day 10 of the estrous cycle. **Theriogenology**, v.34, p.767-78, 1990.
- GRADELA, A., ESPER, C.R., ROSA, E., SILVA, A.A.M. Plasma concentrations of progesterone, 17 β -estradiol and androstenedione and superovulatory response of nelore cows (*Bos indicus*) treated with FSH. **Theriogenology**, v.45, p.843-50, 1996.

- GUIBAULT, L.A., GRASSO, F., LUSSIER, J.G., ROULLIER, P., MATTON, P. Decreased superovulatory response in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. **J. Reprod. Fertil.**, v.91, p.89, 1991.
- HILL, B.R., KUEHNER, L.F. Follicle aspiration prior to superovulation in cattle: a field study. **Theriogenology**, v.43, p.324, 1996.
- HODGEM, G.D. The dominant ovarian follicle. *Fertil. Steril.*, v.38, p.281-300, 1982.
- HUHTINEN, M., RAINIO, V., AALTO, J., BREDBACKA, P., MÄKI-TANILA, A. Increased ovarian response in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. **Theriogenology**, v.37, p.457-63, 1992.
- HYTTEL, P., CALLESEN, H., GREVE, T., SCHMIDT, M. Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. **Theriogenology**, v.35, p.91-108, 1991.
- HYTTEL, P., FAIR, T., CALLESEN, H., GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23-32, 1997.
- IRELAND, J.J., ROCHE J.F. Hypotheses regarding development of dominant follicle during a bovine estrus cycle. In ROCHE, J.F, O'CALLAGHAN, D. **Follicular growth and ovulation rate in farm animals**. Boston: Nijhoff, p. 1-18, 1987.
- KARSCH, F.J., BOWEN, J.M., CARATY, A., EVANS, N.P., MOENTER, S.M. Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. *Biol. Reprod.*, v.56, p.303-309, 1997.
- KNOPFT, L., KASTELIC, J.P., DEL CAMPO, M.R., GHINTER, O.J. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Anim.Endocrinol.* v.6, p. 111-9, 1989.
- LINDNER, G.M., WRIGHT, R.W. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenology**, v. 20, p.407-16, 1983.
- LIU J, SIROIS J. Follicle size-dependent induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle. **Biol Reprod**, v.58, 1527-32,1998.
- LOONEY, C.R., BONDIOLI, K.R. Bovine FSH produced by recombinant DNA technology. **Theriogenology**, v.29, p.235, 1988.
- LUCY, M.C., SAVIO, J.D., BADINGA, L., DE LA SOTA, R.L., THATCHER, W.W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **J. Anim. Sci.**, v.70, p. 3615-26, 1992.

- LUSSIER, J.P., LAMOTHE, P., PACHOLEK, X. Effects of follicular dominance and different gonadotrophin preparations on the superovulatory response in cows. **Theriogenology**, v.43, p.270, 1995.
- MARTINS, C.M., CASTRICINI, E.S.C., REIS, E.L., TORRES-JÚNIOR, J.R.S., GIMENES, L.U., SÁ FILHO, M.F. Produção embrionária de vacas holandesas a diferentes protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, 3(Suppl 1), p.286, 2005 (resumo).
- MARTINS, C.M., TORRES-JÚNIOR, J.R.S., GIMENES, L.U., SOUZA, A.H., BARUSELLI, P.S. Superovulação com eCG ou FSH em doadoras Nelore (*Bos indicus*) inseminadas em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, 34 (supl. 1), p. 527, 2006a (resumo).
- MARTINS, C.M., TORRES-JÚNIOR, J.R.S., SOUZA, A.H., BARUSELLI, P.S. Efeito do momento da aplicação do LH na resposta superovulatória e na produção embrionária em vacas Nelore (*Bos indicus*) inseminadas artificialmente em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, 34 (supl. 1), p. 529, 2006b (resumo).
- MEIRELLES FV, ROSA AJM, LÔBO BR. Is the American Zebu really *Bos indicus*? **Genetics and Molecular Biology**, v.22, p.543-47, 1999.
- MELO DS, FERREIRA MMG, MONTEIRO FM, NOGUEIRA MFG, TRINCA LA, BARROS CM. Manutenção de níveis sub-luteais de progesterona, após tratamento superestimulatório, pode diminuir a taxa de recuperação de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2004 (resumo).
- MIKEL-JENSON, A., GREVE, T., MADEJ, A., EDQVIST, L.E. Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG-PGF2? Treated cow. **Theriogenology**, v.18, p.33-34, 1982.
- MONNIAUX, D., CHUPIN, D., SAUMANDE, J. Superovulatory responses of cattle. **Theriogenology**, v.19, p. 55-82, 1983.
- MOOR, R.M., KRUIP TH, A.M., GREEN, D. Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation? , v.21, p.103-116, 1984.
- MURPHY, M.G., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F., Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. **J Reprod. Fertil.**, v.90, p. 523-33, 1990.
- MURPHY, B.D., MARTINUK, S.D. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrine Reviews**, v.12, p. 27-44, 1991.
- NOGUEIRA, M.F.G., BARROS, B.J.P., TEIXEIRA, A.B., TRINCA, L.A., D'OCCHIO, M.J., BARROS, C.M. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in superstimulated beef cows. **Theriogenology**, v.57, p.1625-1634, 2002.

- NOGUEIRA, M.F.G., BARROS, C.M. Caracterização do momento de ovulação em vacas Nelore superestimuladas com o protocolo P36. **Acta Scientiae Veterinariae**, 31 suplemento, p.508, 2003.
- NOGUEIRA, M.F.G., BARROS, C.M. Aspectos práticos e perspectivas futuras do modelo P-36 de superovulação em doadoras da raça Nelore. **Acta Scientiae Veterinariae**, 34(supl. 1), p.25-29, 2006.
- NOGUEIRA, M.F.G., FRAGNITO, P.S., TRINCA, L.A., BARROS, C.M. The effect of type of vaginal insert and dose of pLH on embryo production, following fixed-time AI in a progestin-based superestimulatory protocol in Nelore cattle. **Theriogenology**, v.67, p.655-660, 2007.
- PIERSON, R.A., GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, v.29, p.21-37, 1988.
- PINHEIRO, O.L., BARROS, C.M., FIGUEIREDO, R.A., VALLE, E.R., ENCARNÇÃO, R.O., PADOVANI, C.R. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F₂ α or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v.49, p.667-81, 1998.
- PRICE, C.A., WEBB, R. Steroid control of gonadotrophin secretion and ovarian function in heifers. **Endocrinology**, v.41, p.2222-31, 1988.
- PRICE, C.A., CARRIÈRE, P.D., GOSSELIN, N., KOHRAM, H., GUILBAULT, L.A. Effects of superovulation on endogenous LH secretion in cattle, and consequences for embryo production. **Theriogenology**, v.51, p.37-46, 1999.
- RAJAMAHENDRAN, R., CALDER, M.D. Superovulatory responses in dairy cows following ovulation of the dominant follicle of the first wave. **Theriogenology**, v.40, p.99-109, 1993.
- ROBERGE, S., RIEGER, D., RAWLINGS, N.C. Periovarian LH, FSH and steroid hormone profiles in superovulated and unstimulated Holstein heifers. **Theriogenology**, v.44, p.59-70, 1995.
- ROBERSON, M.S., WOLF, M.W., STUMPF, T.T., KITTOCK, R.J., KINDER, J.E. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. **Biol Reprod**, v.45, p.997-1003, 1989.
- ROBERTS, A.J., GRIZZLE, J.M., ECHTERNKAMP, S.E. Follicular development and superovulation response in cows administered multiple FSH injections early in the estrous cycle. **Theriogenology**, v.35, p.917-29, 1994.
- ROWSON, L.E.A., LAWSON, R.A.S., MOOR, R.M., BAKER, A.A. Egg transfer in the cow: synchronization requirements. **J. Reprod. Fertil.**, v.28, p.427-31, 1972.

- SARTORI, R., FRICKE, P.M., FERREIRA, J.C., GINTHER, O.J., WILTBANK, M.C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biol. Reprod.**, v.65, p.1403-1409, 2001.
- SARTOTELLI, E.S., CARVALHO, L.M., BERGFELD, D.R., GINTHER, O.J., BARROS,CM. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, p.2382-1394, 2005.
- SAUMANDE, J., CHUPIN, D., MARIANA, J.C., ORTAVANT, R., MAULEON, P. Factors affecting the variability of ovulation rates after PMSG stimulation. In: Control of Reproduction in the cow, Sreenan JM, ed. Martinus Nijhoff, p.195-224, 1978.
- SAVIO, J.D., KEENAN, L., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **J. Reprod. Fertil.**, v.83, p.663-71, 1988.
- SIROIS, J., FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biol. Reprod.**, v.39, p.308-17, 1988.
- SIROIS, J. & FORTUNE, J.E. Lengthening of the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. **Endocrinology**, v. 127, p. 916-25, 1990.
- STOCK, J., FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. **Endocrinology**, v. 132, p.1108-16, 1993.
- STOCK, A.E., ELLINGTON, J.E., FORTUNE, J.E. A dominant follicle does not affect follicular recruitment by superovulatory doses of FSH in cattle but can inhibit ovulation. **Theriogenology**, v.45, p.1091-102, 1996.
- STUMPF, T.T., DAY, ML., WOLF, M.F., CLUTTER, A.C., STOTTS J.A., WOLFE, P.L., KITTOK, R.J., KINDER, J.E. Effects of estradiol on secretion of luteinizing hormone during the luteal phase of the bovine estrous cycle . **Biol. Reprod.**, v.40, p.91-97, 1989.
- VAN DE LEEMPUT, E.E., VOS, P.L.A.M., HYTTEL, P., VAN DEN HURK, R., BEVERS, M.M., VAN DER WEIJDEN, G.C., DIELEMAN, S.J. Effects of brief postponement of the preovulatory LH surge on ovulation rates and embryo formation in eCG/prostaglandin-treated heifers. **Theriogenology**, v.55, p.573-592, 2001.
- VOS, P.L.A.M., BEVERS, M.M., WILLEMSE, A.H., DIELEMAN, S.J. Effects of suppression by a progesterone-releasing device and subsequent induction by GnRH of the preovulatory LH surge on follicular function in PMSG/PG-treated heifers. **J. Reprod. Fertil.**, v.101, p.43-9, 1994.

- VOS, P.L.A.M., BEVERS, M.M., WILLEMSE, A.H., DIELEMAN, S.J. Does postponement of preovulatory LH surge affect ovulation rate and embryo yield in superovulated holstein heifers ? **Theriogenology**, v.43, p.344, 1995.
- XU, Z., GARVERICK, H.A., SMITH, G.W., SMITH, M.F., HAMILTON, S.A., YOUNGQUIST, R.S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biol. Reprod.**, v.53, p.951-7, 1995.
- WILSON, J.M., JONES, A.L., MILLER, D.R. Influence of a dominant follicle on the superovulatory response. **Theriogenology**, v.33, p.349, 1990.
- WILSON, J.M., JONES, A.L., MOORE, K., LOONEY, C.R., BONDIOLI, K.R. Superovulation of cattle with a recombinant-DNA bovine follicle stimulating hormone. **Anim. Reprod. Sci.**, v.33, p.71-82, 1993.
- ZANENGA CA, PEDROSA MF, LIMA GF, MARQUES MO, SANTOS ICC, VALENTIM R, BARUSELLI PS. Comparação entre dois protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*). **Acta Scientiae Veterinariae**,v.31, p.626-27, 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)