

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PROTOCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO EM VACAS DA RAÇA GIR QUANTO AO
NÚMERO DE ESTRUTURAS TOTAIS, EMBRIÕES VIÁVEIS E DEGENERADOS

FABRÍCIO RASI DE ALMEIDA PRADO

BOTUCATU-SP

Agosto – 2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PROTOCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO EM VACAS DA RAÇA GIR QUANTO AO
NÚMERO DE ESTRUTURAS TOTAIS, EMBRIÕES VIÁVEIS E DEGENERADOS

FABRÍCIO RASI DE ALMEIDA PRADO

Dissertação apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária para
obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo

BOTUCATU-SP
Agosto - 2006

Dedicatória

Dedico este momento tão importante aos meus pais João e Nilva que o tempo todo apoiaram minhas decisões.

A este também dedico a minha esposa Melissa que apoiou muito minhas decisões durante este percurso.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo pelos ensinamentos, orientação, atenção, paciência e estímulo no desenvolvimento deste projeto.

A UNESP-Campus de Botucatu por ter me recebido e permitido que eu realizasse o programa de Pós-Graduação.

Ao Prof. Dr. João Ademir de Oliveira pela ajuda no desenvolvimento das análises estatísticas deste projeto de pesquisa.

A APIL Agropecuária LTDA por ter fornecido os animais, instalações e toda verba para aquisição do material utilizado no experimento.

Agradeço também a todos que de forma direta e indireta colaboraram com a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

Hoje você sabe mais do que ontem.
Amanhã saberá mais do que hoje.
Sem dúvida cada dia em que vivemos nessa imensa escola da vida nos dá um
cabedal maior de saber e experiência.
Aprendemos com o que fazemos a fazer melhor; aprendemos com os nossos
próprios erros, a imitá-lo ou a evitar fazer o que ele fez.
Tudo na vida, a vida toda, nos ensina a sermos melhores, dia após dia. São as
lições da vida!
Hoje podemos ser melhores, amanhã seremos mais...
Depende de nós o brilho que queremos acrescentar a nossa vida, a cada dia...

Minuto de Sabedoria

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc – Adenosina monofosfato cíclico

BST – Somatotrofina bovina recombinante

CIDR – Dispositivo intravaginal de liberação controlada de droga

CL – Corpo Lúteo

DPBS - Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

E₂ - Benzoato de estradiol

eCG – Gonadotrofina coriônica eqüina

FSH – Hormônio folículo estimulante

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas

IA – Inseminação artificial

LH – Hormônio luteinizante

P₄ - Progesterona

PGF₂α – Prostaglandina F₂α

PO – Puro de Origem

PRL – Prolactina

TE – Transferência de embriões

UI – Unidade Internacional

RESUMO

Foram avaliadas 57 vacas da raça Gir PO, não lactantes, com escore corporal de 3,5 a 4,0 numa escala de zero a cinco pontos. As doadoras foram distribuídas em três grupos de forma aleatória, onde A (n=19), B (n=19) e C (n=19). As doadoras do grupo A foram superovuladas com 300 UI de FSH, o grupo B com 400 UI de FSH e o grupo C com 500 UI de FSH. Foi utilizado CIDR e administrado, via intramuscular, 2,5 mg de benzoato de estradiol. Cinco dias mais tarde, inicia-se o tratamento superestimulatório com diferentes concentrações de FSH. Com a última aplicação de FSH, administrou-se $\text{PGF}_2\alpha$, via intramuscular e doze horas após a aplicação da $\text{PGF}_2\alpha$ foi retirado o CIDR. As vacas superovuladas receberam uma dose de 50 μg de GnRH, via intramuscular, doze horas após a retirada do CIDR. As doadoras foram inseminadas doze horas após a aplicação de GnRH com duas doses de sêmen, em intervalos de doze horas entre as mesmas. As doses de sêmen utilizadas foram do mesmo touro e da mesma partida. Para análise estatística do potencial de desenvolvimento dos protocolos de superovulação, as proporções de embriões viáveis entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Qui-quadrado (χ^2), adotando os níveis de significância de 5% e 1%. A melhor resposta superovulatória foi utilizando o protocolo com concentração de 400 UI de FSH.

Palavras Chave: Gir , Superovulação, Embriões

ABSTRACT

In this study were 57 non-lactating cows, dairy cows (Gir PO), with body condition score 3,5 the 4,0 in a scale of zero the five points. The donors later distributed in three random groups where A (n=19), B (n=19) and C (n=19). The donors of the group had been superovulation it with 300UI of FSH, group B with 400UI of FSH and group C with 500UI of FSH. CIDR had been used and applied to intramuscular, 2,5 mg of benzoate of estradiol. Five days later, in the beginning of a new wave to follicular, the superstimulation treatment with different concentrations of FSH is initiated. Together with the last application of the hormone, dose of PGF2 α was managed, it saw to intramuscular and 24 hours after the application of the PGF2 α the CIDR was removed. The superovulation animals had received a dose from 50 μ g of GnRH, saw to intramuscular, 12 hours after the withdrawal of the CIDR. The donors had been inseminated twelve hours after the application of GnRH with two doses of semen, in intervals of 12 hours between the same ones. The used doses of semen had been of the same bull and the same departure. For analysis statistics of the potential of development of the superovulation protocols, the ratios of viable embryos between the treatments had been compared by the Qui-square test (χ^2), adopting the levels of significance of 5% and 1%. The best results it was using the protocol with concentration 400 UI of FSH.

Key Word: Gir, Superovulation, Embryo

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	V
Resumo.....	VI
Abstract.....	VII
1- Introdução.....	09
2 - Revisão da Literatura.....	12
3 – Material e Método.....	35
4 – Resultados e Discussão.....	38
5 – Conclusões.....	42
6 – Referências.....	43

1. INTRODUÇÃO

Os índices reprodutivos e produtivos da pecuária brasileira estão muito abaixo do desejável. Os aumentos na produção de leite nas últimas décadas foram, em parte, muito mais devido à expansão das áreas exploradas e aumento efetivo do rebanho do que pelo aumento real da produtividade. Quanto mais maximizada for a produção, utilizando biotecnologias como inseminação artificial, sincronização estral, transferência de embriões e fecundação *in vitro*, tanto maior será a exigência de uma ótima eficiência reprodutiva (Neves et al., 2002).

A raça Gir, devido a sua rusticidade e resistência ao estresse climático, teve seu desenvolvimento e multiplicação favorecidos nas condições bioclimáticas brasileiras, sendo utilizada para a produção de leite e carne (Ledic, 1994), bem como serviu de base para cruzamentos visando a produção de genótipos leiteiros, por exemplo, o Girolando (Menezes, 1999).

O Brasil possui um mercado interno muito grande, onde 85 milhões de brasileiros tem o hábito de consumir carne bovina, sendo a média anual brasileira de 36,8 Kg *per capita* (FNP Consultoria, 2001). Neste contexto, um aumento de 10% no consumo exigirá um abate de mais de 3 milhões cabeça/ano; por outro lado, o mercado externo apresenta hoje uma oportunidade histórica não só pelas epidemias, mas também pelo esgotamento de recursos naturais dos concorrentes internacionais que chegaram ao ponto de exploração, cujo aumento de produtividade exigirá três vezes mais investimento que o Brasil. Este mercado no entanto, é altamente exigente quanto a qualidade e procedência dos produtos, e enfrenta difícil concorrência motivada principalmente por princípios políticos.

Apesar de ter o maior rebanho comercial de gado bovino do mundo e vasta extensão de pastagens, o Brasil ainda, não apresenta índices zootécnicos satisfatórios.

Na cadeia produtiva, para a produção de animais mais precoces e com melhor qualidade de carcaça, é essencial o melhoramento genético, o manejo e a alimentação dos rebanhos.

O manejo reprodutivo é sem dúvida um dos segmentos mais importantes na produção animal. Este, repercute, diretamente, nos índices de produtividade dos rebanhos, sendo um dos principais enfoques na bovinocultura. Ao observarmos a

ineficiência na maioria dos sistemas de produção deve-se dar atenção diferenciada a identificação do estro e índice de prenhez, principalmente das vacas primíparas, visto que isto representa um ponto de estrangulamento no sistema produtivo.

Vários protocolos para a sincronização do ciclo estral em vacas de corte e leite, tem sido estudados, mas ainda há a necessidade de se pesquisar o que proporciona melhores resultados em taxa de prenhez e viabilidade econômica.

A utilização de fármacos na reprodução, mais, especificamente, os hormônios, sofreu significativos progressos na última década, de modo que, atualmente, eles são intensamente pesquisados e diversos outros já são empregados com grande sucesso. Utilizando-se fármacos é possível incrementar os índices reprodutivos dos rebanhos de corte e de leite, utilizando-se a hormonioterapia, tanto para o tratamento individual, caso das afecções ovarianas, quanto ao tratamento de rebanhos, como por exemplo, programas de inseminação artificial, ou mesmo de superestimulação ovariana em animais de elevado valor genético, e que evidentemente deve ser otimizado no seu aproveitamento (Kozicki et al., 2005).

A principal meta do programa de transferência de embriões é a superovulação, obtendo-se o número alto e satisfatório de embriões viáveis por doadora, pelo aumento do número de oócitos liberados após administração de hormônios exógenos e posterior transferência dos embriões obtidos para o trato reprodutivo de receptoras para completarem a gestação (Rumpf et al., 2000).

O importante papel econômico e social dos rebanhos zebuínos na pecuária brasileira é do interesse nacional e internacional na aquisição e multiplicação de animais de elevado valor genético, o mercado de embriões ampliou-se bastante nos anos noventa. A produção de embriões bovinos *in vivo*, pela superovulação de doadoras e posterior lavagem uterina, é consagrada, mundialmente, como forma eficiente de multiplicação rápida dos melhores indivíduos de um rebanho (Fonseca et al., 2001).

Segundo Cupps (1991), a função ovariana nos bovinos tem início ainda no período fetal e estendendo-se após a puberdade, até idades que podem atingir 15 anos. Durante o desenvolvimento fetal sob a influência dos hormônios maternos os ovários do feto apresentam crescimento e atresia folicular. Do nascimento à puberdade, na ausência de função do hipotálamo e da hipófise, as gônadas femininas permanecem em repouso. Após a puberdade quando o sistema nervoso

central e a hipófise iniciam a liberação do GnRH e das gonadotrofinas (FSH e LH), respectivamente, os ovários passam a funcionar realizando um conjunto de atividades, as quais denominamos de ciclo ovariano. Nas diferentes fases do ciclo estral existem nos ovários um número de folículos entre 200 e 400 que encontram-se em fase de crescimento, destes 25 a 50 são folículos terciários, dos quais 1 será selecionado como folículo dominante, adquirindo características para realizar a maturação e a ovulação.

O acompanhamento diário das estruturas ovarianas por ultra-sonografia tem mostrado que os bovinos apresentam ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral. Vacas e novilhas podem ter duas ou três ondas por ciclo, com um folículo tornando-se dominante em cada uma delas. Por isso, uma população de pequenos, médios e grandes folículos é encontrada em cada ovário, durante todos os dias do ciclo estral (Borges et al., 2001).

A importância básica da transferência de embriões para a produção animal consiste na possibilidade de uma fêmea produzir um número de descendentes muito superior ao que seria possível obter fisiologicamente durante sua vida reprodutiva (Reichenbach et al., 2002).

O controle farmacológico do ciclo estral e da ovulação de vacas zebuínas (*Bos taurus indicus*) depende, primeiramente, do entendimento do comportamento fisiológico reprodutivo da vaca, o qual está ligado, diretamente, com o seu estado nutricional. Neste mesmo sentido as interações e funções de hormônios aplicados para este fim, requerem compreensão e análise do seu funcionamento fisiológico.

Para o melhoramento zootécnico, a técnica de transferência de embriões é um importante instrumento porque acelera e confere maior precisão no processo de seleção animal (Reichenbach et al., 2002).

O objetivo deste estudo foi avaliar o número de óvulos, embriões totais, degenerados e viáveis com o intuito de conhecer qual o melhor programa de superovulação para vacas da raça Gir, após aplicação de distintos protocolos hormonais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Segundo a revista ABCZ (2002), o gado indiano é um livro aberto na história das civilizações humanas, as virtudes determinadas pelos Vedas, o carro-chefe de uma raça zebuína que teve um papel fundamental na introdução e formação da zebuicultura no Brasil: a raça Gir. Explicar o surgimento da raça Gir sugere, ao que tudo indica, a explicação do surgimento da espécie zebuína. A filogenia do Gir é uma incógnita, e sua morfologia um arquivo para novas descobertas na zebuicultura. O Gir não foi o primeiro zebuino a chegar no Brasil, mas foi o primeiro do gênero *Bos Indicus* que trouxe fortuna para seus criadores. A raça Gir entrou, oficialmente, no Brasil, via importação direta da Índia, no ano de 1911. A raça concentrou-se, inicialmente, no Triângulo Mineiro, região que já era tradicional na criação de gado zebu, com foco nas raças Guzará e Nelore.

A seleção genética em bovinos proporcionou animais com alta produção de leite e carne, no entanto, em condições naturais, os animais conseguem produzir, no máximo, uma cria por ano. A multiplicação mais efetiva de animais geneticamente superiores implica na necessidade de promover múltiplas ovulações como ferramenta importante para aumentar a produção de embriões. Quanto maior o número de embriões viáveis produzidos, maior será o número de crias geradas por ano (Amaral et al., 2004).

Segundo Reis et al. (2005) a utilização da ultra-sonografia na reprodução de grandes animais possibilitou o entendimento do desenvolvimento folicular, o que permite verificar as particularidades da fisiologia reprodutiva e assim, propor protocolos adequados para a melhoria da eficiência reprodutiva dos bovinos. Este conhecimento, pelo entendimento do comportamento das ondas de crescimento folicular (dinâmica folicular), favorece a execução de programas de superovulação e sincronização do cio e da ovulação.

Nos bovinos, o desenvolvimento folicular apresenta a particularidade de, na maioria dos animais, consistir de duas ou de três ondas de crescimento, sendo cada onda formada por um grupo de folículos com diâmetro maior ou igual a 4mm. Ressalta-se que a emergência da terceira onda folicular está associada com uma fase luteínica mais prolongada. O aproveitamento mais racional desses folículos que se tornariam atrésicos pode ser obtido por meio da superovulação. A superovulação

pode ser definida, como método de estimular diversos folículos terciários a se desenvolverem até o estágio de pré-ovulação, com subsequente ovulação (Reichenbach et al., 2002).

O desenvolvimento folicular tem sido estudado, principalmente, em fêmeas de genótipos taurinos. Porém, são escassos os estudos deste processo em animais zebuínos, especialmente da raça Gir. Os animais desta raça têm apresentado resultados insatisfatórios nos protocolos clássicos utilizados para superovulação em programas de transferência de embriões. Neste contexto, torna-se importante analisar não só este processo na fêmea adulta, mas acompanhá-lo em animais jovens, pois com maior entendimento da fisiologia ovariana poder-se-á manipulá-la mais eficientemente (Silva et al., 2005).

O crescimento dos folículos ovarianos em bovinos ocorre em um padrão denominado ondas de crescimento folicular (Guinther, et al., 1989; Adams et al., 1992; Bo et al., 1994), onde em um ciclo estral há normalmente a emergência de duas ou três ondas de crescimento folicular (Binelli, 2000).

Durante o ciclo estral uma onda de folículos emerge entre os dias 1 e 3 após o estro. São geralmente, em torno de 10 a 50 folículos neste grupo com o tamanho de 2 a 3 mm cada. Nos dias subsequentes, parte desses folículos crescem para 4 a 6 mm, sendo que 2 a 5 folículos maiores do grupo continuarão a crescer enquanto que os outros regredem. Neste grupo de folículos pelo menos um continua a crescer e torna-se dominante, este momento é denominado divergência, após isso essa onda na maioria das vezes inicia sua atresia (Bo et al., 1994).

Durante a primeira onda de crescimento folicular a divergência ocorre entre os dias 2 e 4 da fase de crescimento, onde o desenvolvimento do folículo dominante é dividido em 3 fases: fase de crescimento, estática e de regressão (Guinther et al., 1996).

Na primeira onda de crescimento folicular a fase de crescimento vai desde a emergência até em torno do oitavo dia após o estro, a fase estática ocorre entre o oitavo e décimo dia e a fase de regressão ocorre após o décimo dia, para fêmeas que apresentam duas ondas de crescimento folicular, sendo que na existência de três ondas de crescimento têm-se do sexto ao sétimo dia estática e sétimo a oitavo para regressão (Silcox et al., 1993).

Em torno do oitavo dia do ciclo estral (ou sexto, pela variação no número de ondas) ocorre emergência da segunda onda de crescimento folicular e o processo se

reinicia. O folículo dominante dessa segunda onda de crescimento folicular regride (se houver três ondas) ou se torna folículo ovulatório se ocorrer apenas duas ondas (Bo et al., 1995).

O desenvolvimento do ciclo estral e conseqüente crescimento folicular são regulados por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos principalmente os hormônios hipotalâmicos, as gonadotrofinas e os esteróides secretados pelos ovários. A regulação da secreção destes hormônios durante o ciclo estral requer um delicado balanceamento entre complexas interações hormonais, podendo ser denominados de mecanismos de “Feedback”. O folículo dominante que escapa da atresia secreta quantidades crescentes de E_2 (estradiol), este induz mudanças de comportamento que estão associadas ao estro e induz o pico de LH (hormônio luteinizante). O folículo ovulado sofre mudanças estruturais e funcionais e dá origem a uma estrutura denominada de corpo lúteo (CL) (Binelli, 2000), esta estrutura é responsável pela secreção de progesterona (P_4), hormônio essencial para ciclicidade normal da vaca (Bo et al., 2000). Durante a fase de secreção de P_4 ocorrem aumentos periódicos de secreção do hormônio FSH (hormônio folículo estimulante), o qual estimula a emergência das ondas foliculares. Neste raciocínio, vacas com 2 ondas de crescimento folicular tem dois aumentos de FSH e vacas com três ondas tem três aumentos (Bo et al., 2000). Em torno do quarto dia após a ovulação, quando o folículo dominante tem, aproximadamente, 10 mm de diâmetro, ocorre a transição da dependência de FSH para LH (divergência), sendo este estágio o ponto crítico para continuar o crescimento do folículo dominante (Guinther et al.; 1996). Nas observações de Jolly et al. (1994) o LH estimulou o AMPc (AMP cíclico) nas células da granulosa somente em folículos com mais de 9mm de diâmetro, provando assim que folículos com mais de 9mm de diâmetro adquirem receptores para LH e portanto capacidade ovulatória.

O desenvolvimento folicular ovariano é um processo dinâmico caracterizado pela emergência de ondas sucessivas, sendo que cada onda de crescimento folicular consiste em um grupo de folículos recrutados de um “pool” de folículos antrais gonodotropina dependentes. Os bovinos podem apresentar uma, duas ou três ondas de crescimento folicular por ciclo estral, dependendo da duração da fase luteal, sendo cada onda precedida de aumento da concentração plasmática de FSH. A seleção do folículo dominante coincide com o declínio da onda estimulatória de FSH, e a presença de receptores para LH nas células da granulosa de folículos

dominantes, após a divergência folicular, sugere efetiva participação deste hormônio na fase final do desenvolvimento e maturação folicular (Figueiredo et al., 2000).

Balieiro et al. (1999), demonstraram que as tendências anuais fenotípicas, genéticas e de ambiente para intervalo de partos foram negativas na raça Gir. Apesar da pequena magnitude, geneticamente conclui-se que o intervalo de partos diminuiu um a dois dias/ano. Reduções pequenas foram observadas não somente na raça Gir, como em mestiços, e mudanças genéticas negativas expressivas de -3,08 até 12,0 dias/ano foram observadas na Índia, em animais da raça Guzará, e de -21,4 dias/ano na raça Holandesa criada no Brasil, mas segundo Ramos et al. (2000), a rápida multiplicação de material genético melhorado na raça Gir é de grande importância para o aumento da produção de leite nos países tropicais.

Denomina-se superovulação ao aumento do número fisiológico de ovulações próprias da espécie, provocada mediante a administração de gonadotrofinas. No bovino, se considera que houve resposta ao tratamento quando se produzem mais de duas ovulações. A superovulação deve complementar-se com um regime ótimo de inseminação artificial, utilizando sêmen de ótima qualidade (Cabodevila & Torquati, 2001).

Dentre alguns hormônios implicados diretamente na superestimulação ovariana dos animais para obtenção de maior número de folículos desenvolvidos, podem ser mencionados o FSH, o hormônio coriônico gonadotrófico, a gonadotrofina da mulher na menopausa, dentre outros. Além dos mencionados pesquisa-se, atualmente, a utilização da somatotrofina bovina recombinante (BST), tida como uma substância que acarreta o aumento de receptores para o fator de crescimento semelhante à insulina, favorecendo o recrutamento folicular ovariano, além de propriedades de efeitos anabolizantes (Lucy, 2000).

2.1. Formas terapêuticas

De acordo com Kopera (1972) citado por Grunert & Gregory (1984), existem quatro formas terapêuticas de utilização de produtos com ação hormonal, terapia de substituição, de estimulação, de inibição e de efeitos farmacológicos, entretanto não é possível estabelecer claramente os limites de atuação entre as mesmas. A terapia de substituição é utilizada quando se tem por objetivo compensar distúrbios resultantes de uma produção insuficiente ou retardada de hormônios e também no caso de falhas na liberação hormonal. Como exemplos da sua indicação podem ser

citados, indução da ovulação em várias espécies animais, tratamento de cistos foliculares através do emprego de GnRH, aplicação de estrógenos em animais que apresentam cio silencioso e o uso de progestágenos na profilaxia de abortamentos. Bons resultados podem ser alcançados quando os animais apresentam uma insuficiente produção hormonal endógena, por outro lado, este tipo de terapia passa a ser considerada antieconômica quando se tornam necessárias várias aplicações por longos períodos. Quando o objetivo é estimular a função sexual deprimida ou em repouso pelo uso de hormônios exógenos a terapia indicada é a de estimulação. Exemplos de seu uso são o tratamento da aciclia em suínos com estrógenos, os quais propiciam uma indução do ciclo por meio de maior liberação de gonadotrofinas hipofisiárias. Neste tipo de terapia são detectadas as maiores falhas da hormonioterapia, uma vez que a indução do ciclo com somente um tratamento, em casos de afunção sexual, é praticamente impossível na maioria das espécies animais.

Segundo Grunert & Gregory (1984), a terapia de inibição hormonal é indicada quando a finalidade do tratamento é a depressão das funções fisiológicas. Dentre os exemplos, tem-se ausência do estro em bovinos jovens, sincronização do ciclo estral com progestágenos ou com prostaglandinas. Os melhores resultados da hormonioterapia são observados com este tipo de terapia, em função de que na maioria dos casos a produção hormonal é fisiológica, necessitando somente ser reduzida ou totalmente bloqueada.

A terapia de efeitos farmacológicos é utilizada quando procura-se desenvolver reações orgânicas que não correspondem ao ritmo fisiológico da espécie animal em questão. Exemplos desse tipo de situação são a indução do parto com glicocorticóides e a superovulação induzida por injeções de FSH, eCG e hCG. Bons resultados são obtidos no tratamento da retenção láctea com ocitocina, na depressão da produção leiteira com estrógenos e na indução do parto com corticosteróides ou prostaglandinas nos ruminantes. É imprescindível para o êxito da hormonioterapia que vários aspectos e condições devam ser observados antes de optar-se pelo tipo de terapia a ser utilizada. Cabe ressaltar as diferentes reações orgânicas na dependência da espécie animal, dentro de uma mesma espécie, e na dependência do estágio do ciclo estral, bem como da gestação. Deve-se considerar ainda a dose a ser aplicada, as vias de aplicação, os efeitos colaterais e em última análise os efeitos aparentes. Uma limitação da hormonioterapia diz respeito a

distúrbios que produzem perturbações no complexo neuroendócrino entre os diversos órgãos. Animais que apresentem defeitos de origem hereditária não devem ser tratados com hormonioterapia (Grunert & Gregory, 1984).

2.2. Regulação e fases do ciclo estral

O ciclo estral resulta da interação coordenada dos tecidos do sistema nervoso central, hipotálamo-hipófise, ovário e útero. A comunicação entre órgãos ocorre principalmente mediante os hormônios GnRH (hipotálamo), LH e FSH (hipófise), estradiol e progesterona (ovário) e prostaglandina F2 α (útero) (González, 2001).

Animais de ambos os sexos secretam dois hormônios estimulantes das gônadas (gonadotrofinas) a partir da hipófise anterior: o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH). Nos machos, estes hormônios são secretados em nível constante. Nas fêmeas, há picos que estão subjacentes às atividades cíclicas do ovário (Freeman, 1994). A secreção cíclica de gonadotrofinas pela hipófise não depende diretamente do sexo genético, mas principalmente da ausência de androgênio durante o período perinatal (Gorski, 2000).

Grande parte do conhecimento que se tem atualmente sobre o controle do ciclo ovariano de vários mamíferos que possuem ovulação espontânea fundamenta-se no estudo do ciclo estral da rata. Esse ciclo é composto por quatro fases, que além de expressarem mudanças na mucosa vaginal com a presença de células nucleadas, leucócitos e células cornificadas em cada período, exibem variações nas concentrações hormonais de esteróides gonadais e conseqüentemente de gonadotrofinas. Também, associada a essas mudanças cíclicas é possível observar alterações comportamentais. Por exemplo, no estro comportamental a fêmea apresenta um “desejo sexual”, isto é, ela está pronta para aceitar o macho, é nesta fase do ciclo que acontece a ovulação em todas as espécies domésticas, sendo exceção a espécie bovina, onde a ovulação ocorre em torno de 10 a 12 horas após o desaparecimento dos sinais do estro, dentre os quais pode-se destacar: intensa irrigação da mucosa vaginal; abertura da cérvix que possibilita a passagem dos espermatozóides (González, 2001).

O proestro caracteriza-se pelo início da regressão do corpo lúteo e termina no início do estro; nesse período observa-se um rápido desenvolvimento do folículo, que leva à ovulação e ao início da receptividade sexual. Se não há concepção, após

o estro há um período de recuperação denominado metaestro cuja duração é de três a quatro dias para a maioria das espécies, é o período de desenvolvimento inicial do corpo lúteo, onde há uma redução na quantidade de secreção das glândulas presentes no útero, cérvix e vagina. Após essa fase, segue-se o diestro que é o período de atividade do corpo lúteo formado no período anterior, que normalmente começa cerca de quatro dias após a ovulação e termina com a regressão do corpo lúteo. A duração total desta fase, normalmente é de seis dias, quando verifica-se também o começo da secreção de hormônios ovarianos para o próximo ciclo; segue-se a esta fase um novo proestro (Stabenfeldt & Edqvist, 1988).

Devido as dificuldades inerentes à complexidade dos mecanismos que controlam as variações hormonais cíclicas em fêmeas, a maioria dos estudos sobre mecanismos fisiológicos em geral é realizada em machos. O modo tônico de liberação da testosterona facilita o entendimento dos mecanismos fisiológicos em machos. Ao contrário, para se estudar o organismo feminino é necessário o acompanhamento das fases do ciclo estral. Essa complexidade e conseqüentes dificuldades contribuem para o pouco esclarecimento sobre os eventos fisiológicos que controlam a reprodução nas fêmeas. Apesar disso, é necessário que se compreenda a atividade fisiológica relacionada ao ciclo estral, para que se consiga evoluir no estudo sobre os processos fisiológicos envolvidos com a reprodução. Com isso, o conhecimento atual sobre o ciclo ovariano de mamíferos que ovulam espontaneamente baseia-se principalmente em estudos realizados em ratas por ser o rato um animal que possui uma fácil adaptação ao ambiente de biotério e cujo tamanho pequeno facilita o manuseio (Anselmo-franci et al., 1999).

2.3. Sincronização do ciclo estral

O corpo lúteo atua como bloqueador efetivo no gerador de pulsos durante a fase luteínica do ciclo estral. Nesta fase as gonadotrofinas circulantes são mantidas em concentrações tônicas e as ondas dinâmicas necessárias para provocar a ovulação não podem acontecer. A duração do ciclo estral e seu respectivo controle podem ser alcançados pela utilização de um agente luteolítico para lisar o corpo lúteo do ciclo corrente ou a utilização de um progestágeno, ou seja, criando uma fase luteínica artificial. Ao interromper o uso destes hormônios o estro se instala em poucos dias, ocorrendo a ovulação devido ao rápido aumento de FSH e LH. A

sincronização do estro pode ser obtida separadamente ou em combinação com a inibição da ovulação, indução da ovulação ou ainda pela indução ou atraso da regressão do corpo lúteo (Hafez et al., 2004).

O número de ondas por ciclo parece estar associado com a duração do ciclo estral e com a duração da fase luteínica. Isto pode ser demonstrado pelo surgimento de novas ondas de crescimento folicular quando se prolonga a fase luteínica pela administração de progesterona exógena. O folículo dominante presente na fase em que ocorre a luteólise torna-se ovulatório (Borges et al., 2001).

Em vacas adultas, um ciclo de duas ondas é predominante e o folículo dominante na segunda onda folicular torna-se um folículo pré-ovulatório e posteriormente ovula (Wolfenson et al., 1999).

Os métodos de sincronização incluem a administração de um hormônio natural ou sintético via oral, injeção intramuscular, implante e/ou através do manejo dos animais, o qual inclui um adequado manejo nutricional e um desmame no período mais apropriado (Hafez et al., 2004).

2.4. Hormônios utilizados

2.4.1. GnRH

O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) é um peptídeo chave que controla a secreção de gonadotrofinas, principalmente do LH e portanto a função gonadal. Esse hormônio hipotalâmico é liberado de modo pulsátil e, na fêmea, a sua frequência e amplitude variam durante os estágios reprodutivos nas diferentes espécies. Sinais centrais e periféricos modulam a atividade dos neurônios GnRH. Alguns desses sinais são estimulatórios para a sua liberação como a noradrenalina e o neuropeptídeo Y (NPY); e alguns são inibitórios, como a beta-endorfina e a interleucina-1. Alguns trabalhos sugerem que os estrógenos não podem atuar diretamente sobre neurônios GnRH, mas podem aumentar a atividade de neurônios noradrenérgicos (Anselmo-Franci et al., 1999).

Sabe-se que durante o período pré-ovulatório, em espécies com ovulação espontânea ou, no coito em animais com ovulação induzida, o GnRH é liberado como uma onda devido ao aumento nos níveis de esteróides circulantes (estrógeno e progesterona). Diversos análogos de GnRH têm sido sintetizados quimicamente, podendo causar aumento (antagonista) ou diminuição (agonista) de sua atividade.

Nos bovinos as principais utilizações destes hormônios sintéticos estão relacionadas com a sincronização do estro e transferência de embriões para luteinização de folículos; por outro lado, nos eqüinos são usados durante o estro para produzir ovulação e diminuição do período estral, podendo serem administrados no quinto dia após a aplicação de prostaglandina ou entre o terceiro e quarto dia do estro (Pau & Spies, 1997).

Nos últimos anos, diversos pesquisadores têm buscado otimizar os resultados da monta natural e da inseminação artificial, em vacas e/ou novilhas, usando agonistas do GnRH, como a buserelina. A buserelina é um composto nonapeptídico, com aproximadamente quarenta vezes a potência do GnRH endógeno (Steven, 1983), capaz de alterar a função ovariana, modulando as ondas de crescimento folicular, prolongando a vida útil do corpo lúteo e a duração do ciclo estral (Twagiramungo et al., 1992), diminuindo a secreção de estradiol, reduzindo o vigor do mecanismo luteolítico, o que constitui em uma chance do embrião manter-se viável, produzindo interferon trofoblástico necessário para o reconhecimento materno da gestação.

Mann et al. (1995) verificaram aumento nos níveis séricos de progesterona, dois a três dias após a aplicação de buserelina em vacas inseminadas. Corroborando com estas afirmações, Drew & Peters (1994) verificaram que uma única aplicação de buserelina entre os dias 11 e 13 após a inseminação artificial, resultou num aumento de até 10% na taxa de gestação de vacas inseminadas.

Estudos realizados por Harvey et al. (1994), demonstraram que após o tratamento com buserelina, ocorre a formação de um ou mais corpos lúteos acessórios, em aproximadamente metade das vacas tratadas, sugerindo que a melhora na taxa de concepção, após o tratamento com buserelina, pode resultar da estimulação direta da produção de progesterona pelo corpo lúteo original ou decorre da formação destes corpos lúteos acessórios.

Por outro lado, Galimberti et al. (1999) estudando a taxa de gestação em receptoras de embrião bovino, constataram que o agonista do GnRH (Buserilina) aplicado quatro dias depois da inovulação de vacas e/ou novilhas, portanto, entre os dias 10 e 12 do ciclo estral destas receptoras, não modificou a taxa de gestação em receptoras do embrião bovino.

Portanto, o uso de um agonista do GnRH (Buserelina) pode ou não resultar em aumento na taxa de gestação em vacas e/ou novilhas inseminadas,

considerando que o estabelecimento da gestação nas fêmeas bovinas, envolve uma complexa integração entre o embrião, o ambiente uterino e o corpo lúteo (Mann et al., 1995). O mesmo autor salienta que o estabelecimento da gestação depende da produção do anti-luteolítico interferon trofoblástico pelo concepto em tempo hábil. A progesterona provoca modificações no ambiente uterino, influenciando o crescimento e desenvolvimento do concepto (Geisert et al., 1992). Entretanto, de acordo com Mann et al. (1995), o embrião pode não receber suficiente estímulo, mediado pela progesterona, para produção do interferon trofoblástico, necessário para bloquear o desenvolvimento do mecanismo luteolítico e manter a gestação.

2.4.2 LH e FSH

O crescimento folicular pode ser sincronizado com diferentes fármacos tal como progesterona, estradiol, uma combinação de progesterona, estradiol e GnRH. O emprego de progesterona ou progestágenos em doses elevadas pode suprimir o suporte de LH para o folículo dominante, induzindo assim atresia do folículo (Thatcher et al., 2001).

Os hormônios hipofisiários gonadotróficos importantes para a reprodução na fêmea são o hormônio folículo estimulante (FSH), o hormônio luteinizante (LH) e a prolactina (PRL), os quais são glicoproteínas, ou seja, são compostos de cadeias de aminoácidos ligadas por peptídeos e de cadeias de carboidratos ligados aos fosfolipídeos (Hafez et al., 2004).

Os hormônios glicoprotéicos tem duas cadeias polipeptídicas, alfa e beta, ligadas de maneira não covalente. As subunidades alfa de todos os hormônios glicoprotéicos são idênticas dentro de uma espécie; as subunidades beta são diferentes, tanto em conteúdo de aminoácidos como de carboidratos, o que confere especificidade de ação ao hormônio (Domingues et al., 1996).

A secreção de LH e FSH é controlada pelo GnRH, sendo que ambos são liberadores de uma forma tônica ou basal, tanto no macho como na fêmea. Os níveis tônicos de LH e FSH são controlados por um mecanismo de “feedback” negativo das gônadas (Amaral et al., 2004).

Existe uma outra forma de liberação denominada de onda pré-ovulatória de LH e de FSH, que é evidente na fêmea antes da ovulação. Esta onda pré-ovulatória é responsável pela ovulação e persiste de 6 a 12 horas na maioria das espécies. A onda pré-ovulatória de LH é iniciada por um aumento na concentração de estrógeno

circulante, três dias antes da ovulação, esta apresenta um efeito feedback positivo sobre o eixo hipotálamo-hipofisiário na indução da liberação de LH e FSH (Hafez,1996).

Segundo Chagas & Silva (2002), o LH é responsável pela ovulação e transformação do folículo ovariano em corpo lúteo, enquanto que a principal função do FSH é promover o desenvolvimento do folículo de Graaf no ovário. O FSH atua precocemente no desenvolvimento folicular e certamente para a formação do antro do folículo. Talvez, o mais importante seja que a ação sinérgica do FSH com os estrógenos, proporcione a formação de receptores para o FSH e o LH, nas células granulosas do folículo.

O hormônio folículo estimulante (FSH) tem função essencial no desenvolvimento dos folículos. O uso de FSH exógeno para induzir a superovulação é baseado nessa função fisiológica. Folículos em vários estágios de desenvolvimento estão normalmente presentes nos ovários, em qualquer tempo. Grupos consecutivos de folículos pequenos crescem, maturam e se degeneram ou ovulam. O FSH estimula o crescimento dos folículos pequenos. FSH exógeno reverte a atresia de folículos acima de 1,7mm. O hormônio luteinizante (LH) estimula a produção de andrógenos na teca interna. Andrógenos tecais são usados como precursores para a produção de estrógenos pelas células granulosas que foram estimuladas pelo FSH (Bényei & Barros, 2000).

Os animais das raças zebuínas são mais sensíveis aos medicamentos em comparação com os das raças européias. Animais da raça Nelore possuem ovários, folículos e corpos lúteos menores, o que pode estar relacionado à exigência de menor concentração de FSH para a indução da superovulação (Visintin et al., 1999).

Em bovinos, o cortisol endógeno liberado pelo estresse pode suprimir o pico de LH e ovulação ou diminuir a resposta superovulatória, que poderia confundir a sensibilidade para gonadotrofinas exógenas (Costa et al., 2001).

Diversos trabalhos com FSH, LH e seus análogos em fêmeas bovinas, têm sido conduzidos com a intenção de obter-se maiores taxas de fertilização e de transferência de embriões.

Elsden et al. (1983) superovularam vacas e novilhas Nelore com três doses diferentes de FSH (50, 36 e 24 mg), sendo que as maiores taxas de fertilização e embriões transferíveis foram obtidas com 24 mg .

Lerner et al. (1986) relataram que em doadoras mais novas, o aumento da dose de FSH teve efeito negativo. A diminuição no número de estruturas recuperadas com o aumento da dose de FSH em vacas mais novas poderia ser devido a uma superestimulação dos ovários. Existem alterações que poderiam interferir com o apropriado desenvolvimento folicular ou ovulação quais sejam: quando um grande número de folículos são estimulados, limitações físicas dentro do ovário (ex.: suprimento sanguíneo para folículos individuais) ou quebra dos mecanismos endócrinos normais (ex.: produção excessiva de esteróides ovarianos). Com isso, maior número de folículos seria estimulado a continuar o desenvolvimento em altas doses de FSH, mas poucos seriam capazes de ovular e sofreriam luteinização ou tornar-se-iam atrésicos. Importantes diferenças fisiológicas e comportamentais entre *Bos indicus* e *Bos taurus* têm sido identificadas.

Santiago et al. (1999) em experimento conduzido para verificar a resposta superovulatória de novilhas Nelore em confinamento, tratadas com duas doses diferentes de FSH, não observaram diferenças significativas entre os tratamentos, o que indica que o tratamento com 250 UI de FSH (4,16 embriões viáveis por doadora) foi tão eficaz quanto o tratamento com 500 UI de FSH (3,15 embriões viáveis por doadora) para superovulação de novilhas Nelore.

Diferenças entre genótipos incluem uma reduzida capacidade para secreção de LH e uma maior sensibilidade a gonadotrofinas exógenas em *Bos indicus* comparado com raças *Bos taurus* (Cavalieri et al., 1997).

2.4.3. Progesterona

A progesterona é um hormônio imprescindível para a regulação do funcionamento do sistema reprodutor feminino e produzido principalmente pelo corpo lúteo, sendo este proveniente da reorganização das células foliculares após o processo ovulatório. Dentre as ações fisiológicas da progesterona encontram-se o crescimento das glândulas uterinas e mamárias, a estimulação das glândulas endometriais para secreção do fluido endometrial, o qual é necessário à nutrição do blastócisto antes da implantação, e também necessária para a manutenção da gestação na maioria dos mamíferos, pelo menos durante o terço inicial da gestação. Atua sinergicamente com os estrógenos em diversas funções fisiológicas (Hafez, 2004).

Elevados níveis de progesterona inibem o estro e a onda ovulatória de LH, estabelecendo assim a importância desta na regulação do ciclo estral (Hafez, 1996).

Nos bovinos as concentrações plasmáticas de progesterona apresentam variações cíclicas durante o ciclo estral normal, desde valores abaixo de 1 ng/mL até 2,3 ng/mL ao estro para vacas de raças zebuínas (Agarwal et al., 1977). Badinga et al. (1994) encontraram valores de 16 ng/mL em vacas da raça holandesa no 100º dia. Estas concentrações são mantidas elevadas até o início da regressão do corpo lúteo caso não ocorra a gestação. Em animais superovulados, estas concentrações podem ser superiores a 56,7 ng/mL (Morris et al., 1988).

Borges et al. (2000) encontraram níveis plasmáticos de progesterona em novilhas mestiças holandês-zebu, durante um ciclo normal entre 5 e 6 ng/mL e após o tratamento superovulatório níveis superiores a 60 ng/mL. Estas concentrações elevadas são função direta da massa do tecido luteínico e do número de corpos lúteos funcionais presentes nos ovários (Morris et al., 1988).

2.4.4. Progestágenos

Os progestágenos também são utilizados para sincronização do ciclo estral, sendo amplamente usados para indução de estro e no pós-parto de novilhas e vacas (Bo et al., 1994).

A utilização destes consiste basicamente na colocação de um implante subcutâneo na orelha juntamente com a aplicação intramuscular conjunta de um progestágeno e um estrógeno. A inseminação pode ser realizada em 48 horas após a retirada do implante. A literatura mostra resultados nos quais a manifestação de estros foi de 77 a 100% e a taxa de concepção após a primeira cobertura variou entre 33 a 68%. Alguns autores têm sugerido que as falhas de resposta a este tratamento são decorrentes de algum tipo de disfunção no sistema hipotalâmico-hipofisiário, onde verifica-se uma secreção insuficiente de LH (Hafez, 1996).

2.4.5. Prostaglandinas

As prostaglandinas são sintetizadas no próprio organismo animal a partir de fosfolipídios de membrana celular que, ao sofrerem a ação da fosfolipase A2 produzem ácido araquidônico, o qual é o precursor das prostaglandinas mais intimamente associadas com os processos reprodutivos, principalmente a F2α

(PGF2 α) e a E2 (PGE2). Todas as prostaglandinas são ácidos graxos hidroxilados não saturados de 20 carbonos, com um anel ciclopentano em C18-C12 (Hafez et al., 2004).

Os níveis sanguíneos da maioria das prostaglandinas geralmente são muito baixos, embora pareçam ser elevados sob certas condições, como no parto. As prostaglandinas são rapidamente metabolizadas e degradadas, o que provavelmente seja responsável pela sua transitória atividade farmacológica e baixos níveis sanguíneos. Estão envolvidas na liberação de gonadotrofinas (PGE2 de LH "in vitro" e "in vivo" e a PGF2 α "in vivo" em diversos animais de laboratório e espécies domésticas). Evidências do seu efeito na ovulação foram obtidas quase exclusivamente em coelhas, através da administração de um inibidor da síntese de prostaglandina, o indometacina, que bloqueia a ovulação (Bo et al., 1994).

A PGF2 α é considerada a substância que inicia a regressão do corpo lúteo. Este conceito surgiu a partir de inúmeras investigações que demonstraram que concentrações elevadas de PGF2 α no sangue devido à administração exógena ou síntese e liberação fisiológicas foram concomitantes com a regressão do corpo lúteo. Na vaca por exemplo, as ondas têm, em média cinco a seis horas de duração com aproximadamente o mesmo intervalo entre elas. No entanto, ainda não está totalmente esclarecida a maneira como se dá o controle da secreção de PGF2 α no início da luteólise, a hipótese mais provável é de que a progesterona seja o principal estímulo para o aumento da secreção de PGF2 α , sendo assim os níveis de progesterona nos primeiros dias do ciclo "programariam" o útero para liberar PGF2 α sete a oito dias depois (Stabenfeldt & Edqvist, 1988).

A detecção do cio é um problema sério no manejo dos rebanhos de bovinos. Segundo Stevenson & Britt (1977) cerca de 50% do período de manifestação do estro não é detectado. Isso implica em severas conseqüências econômicas, pois erros de detecção de cio, resultam em inseminações em horários inadequados e, conseqüentemente, redução no índice de prenhez.

No manejo reprodutivo de bovinos a PGF2 α e seus análogos são os fármacos mais utilizados. Nos bovinos de corte, o uso em ordem decrescente, é mais comum nas seguintes situações: tratamento de patologias uterinas, indução de abortos, controle e sincronização de estros e indução do parto. Nos bovinos de leite, sua utilização é maior nos casos de sincronização de estros, evidenciar estros não

detectados, retenção placentária, cistos ovarianos, indução de abortamentos e de parto (González, 2001).

O uso de agentes luteolíticos como a PGF2 α , ou os seus análogos, tem sido amplamente utilizada, na monta natural, inseminação artificial e na técnica de transferência de embriões, pois é uma metodologia prática e que propicia um estro de fertilidade comparada ao natural, entretanto os agentes luteolíticos têm um custo relativamente elevado, o que na prática é um entrave na utilização destes, principalmente na sincronização de estros entre doadoras e receptoras num programa de transferência de embriões (Fernandes, 1994).

A sincronização do estro por meio da aplicação de agentes luteolíticos como a PGF2 α ou seus análogos, possibilita uma concentração dos esforços para a observação dos sinais clínicos do cio em um período pré determinado, o que pode produzir maior eficiência na observação. Além disso, quanto maior o número de vacas em cio dentro do grupo, maior a intensidade da manifestação. O uso de luteolíticos na espécie bovina tem importantes aplicações práticas além da sincronização do cio, como por exemplo: auxilia no rápido retorno ao cio no pós parto, coadjuvante no tratamento de endometrites, tratamentos de cistos luteinizados, interrupção da gestação, indução do parto, eliminação de fetos mumificados, tratamento da involução uterina retardada e retenção de placenta (Bo et al., 2000).

Etiproston é um análogo sintético de PGF2 α que possui dois átomos de oxigênio no C15. Sua molécula é muito estável, possuindo meia vida maior que a PGF2 α natural (Benech et al., 1994). Além do efeito luteolítico, este análogo tem uma forte ação sobre a contração uterina (Basselin, 1989).

Costa et al. (2000a) em avaliação da resposta de vacas zebuínas na sincronização estral, pela administração de etiproston (via intramuscular) nos dias seis, sete, oito e nove do ciclo estral, concluíram que o corpo lúteo foi responsivo à PGF2 α exógena nos primeiros dias do diestro, sendo que os animais que receberam o luteolítico no dia seis, foram os que manifestaram estro mais rápido, indicando que a partir do sexto dia do ciclo estral talvez já existam um número mínimo de receptores necessários para a ação do luteolítico. Isto indica também a presença de uma proporção de células luteais grandes e pequenas como ocorre em *Bos taurus* (Lei et al., 1991), que possibilitam a regressão total do tecido luteal e a conseqüente redução dos níveis plasmáticos de progesterona,

possibilitando um bloqueio do seu efeito inibitório sobre as gonadotrofinas levando a um rápido aumento dos níveis de estradiol, os quais desencadeiam os sinais clínicos do estro.

De acordo com as observações de Costa et al. (2000b) em vacas zebuínas, os análogos da PGF2 α , etiproston e cloprostenol apresentam a mesma taxa de sincronização e intervalo de aplicação do fármaco à manifestação do cio, independentemente da via de aplicação intramuscular ou subcutânea na vulva.

Fernandes & Figueiredo (2000) em experimento para avaliar doses e vias de aplicação de D-cloprostenol sódico na sincronização do estro, em novilhas mestiças em um programa de transferência de embriões, constataram que os animais do tratamento A (150 mg; via intramuscular) mostraram maior percentual de sincronização do estro, seguidos pelos animais do tratamento B (75 mg; via intramuscular) e por último pelo tratamento C (75 mg; vulva). Entretanto não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre as doses aplicadas e a via de aplicação entre os animais dos tratamentos B e C. Deve-se considerar que a aplicação intramuscular de 75 mg de D-cloprostenol sódico, provoca uma redução de aproximadamente 10% na eficiência da sincronização do estro em relação à dose de 150 mg.

2.5. Transferência de embriões

Pode ser realizada quando a doadora apresentar um estro fisiológico ou induzido, bem como pela indução da sincronização estral em outras fêmeas, as quais serão as prováveis receptoras. O GnRH pode ser empregado para que possibilite a luteinização folicular e conseqüentemente a ovulação, tanto nas receptoras como nas doadoras. A superovulação pode ser promovida utilizando-se a aplicação de gonadotrofinas placentárias (hCG ou eCG), gonadotrofinas hipofisiárias (LH e FSH), ou ainda pela utilização de GnRH para aumentar a luteinização dos folículos produzidos (Lei et al., 1991),.

Algumas diferenças endócrinas poderiam estar contribuindo para a obtenção de estágios embrionários mais avançados em zebuínos quando comparados com os obtidos em taurinos. Fêmeas *Bos indicus* geralmente atingem a puberdade mais tarde, têm período de gestação mais longo, exibem anestro pós-parto prolongado e apresentam importante sazonalidade reprodutiva, isto é, tendem a serem acasaladas

em dias longos. Quanto ao ciclo estral, apresentam estro mais curto e em menor intensidade, e tendência em não permitir a monta por outras fêmeas. Outro importante aspecto divergente entre taurinos e zebuínos são as características do corpo lúteo (CL). O CL é primariamente reconhecido por sua habilidade de sintetizar e secretar progesterona. O corpo lúteo é formado a partir da hiperplasia e diferenciação das células da granulosa e da teca do folículo ovulatório, passando de 200 miligramas no momento da ovulação (células foliculares) a 48 gramas de peso no 11º dia do ciclo estral nas raças zebuínas. Esse peso é consideravelmente maior nas raças européias. O peso do CL está relacionado com sua capacidade de produzir progesterona, hormônio intimamente relacionado com a manutenção de um ambiente útero-tubárico adequado ao desenvolvimento embrionário e manutenção do próprio CL durante o período crítico da vida embrionária (da ovulação à implantação), quando ocorre o reconhecimento materno da gestação. Fêmeas zebuínas apresentaram CL menor, com menor conteúdo de progesterona por grama de tecido luteal (Fonseca et al., 2001).

O controle farmacológico do ciclo estral e da ovulação de vacas zebuínas (*Bos taurus indicus*) depende primeiramente do entendimento do comportamento fisiológico reprodutivo da vaca, o qual está ligado diretamente com seu estado nutricional e condição, parida ou solteira (Moreira, 2002).

A alta variabilidade de respostas aos tratamentos gonadotróficos têm motivado a realização de estudos com a finalidade de formular protocolos com capacidade de estabilizar e racionalizar os programas de superovulação (Andrade et al, 1999).

Dois fatores muito importantes agem na variação da resposta ovariana: tratamento com gonadotrofinas por protocolo e condição ovariana e o tempo de tratamento com gonadotrofinas (Alvarez et al., 1998).

A variação do número de embriões após diferentes tratamentos superovulatórios tem sido atribuída a fatores individuais, utilizando tratamentos idênticos, obtiveram respostas altamente variáveis. Em relação às concentrações do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) presentes no extrato pituitário comumente usado para estimular a resposta ovulatória, encontraram melhores resultados em preparações com baixa concentração de LH, salientando que as altas concentrações de LH causam ovulação prematura ou luteinização de folículos ocasionando baixa resposta superovulatória (Visintin et al., 1999).

O crescimento dos folículos ovarianos em bovinos ocorrem em um padrão denominado ondas de crescimento folicular, onde em um ciclo há normalmente a emergência de duas ou três ondas de crescimento folicular (Moreira, 2002).

O tratamento superovulatório deve ser realizado no começo de uma onda folicular, antes da seleção do folículo dominante, para obter-se a melhor resposta possível (Bo, 2002).

Aplicações de FSH exógeno (eCG ou FSH) são amplamente utilizadas em programas de ovulação múltipla/transferência de embriões para aumentar o fornecimento de embriões de animais de qualidade genética. Aplicações subcutâneas ou intramusculares de eCG ou FSH estimulam o crescimento de folículos adicionais, os quais ovulam espontaneamente sem a necessidade de LH ou hCH exógeno em vacas, búfalas, ovelhas e cabras (Jainudeen et al., 2004).

O tratamento superovulatório não promove o desenvolvimento folicular e sim, fornece aqueles folículos que normalmente se tornariam atrésicos, um meio hormonal adequado para que continuem seus processos de maturação, culminando com a ovulação (Diniz et al., 1999).

2.5.1) Gonadotrofinas placentárias

A gonadotrofina coriônica humana (hCG) é uma glicoproteína constituída de unidades alfa e beta, com 92 aminoácidos residuais e duas cadeias de carboidratos. É sintetizada pelas células sinciotrofoblásticas da placenta, e excretada pela urina de primatas e mulheres gestantes. O hCG possui funções semelhantes às do LH, entretanto a sua meia vida é maior, variando de 12 a 14 horas, dependendo da espécie animal (Hafez et al., 2004).

O hCG tem sido utilizado como uma alternativa à suplementação de progesterona como luteotrófico durante a fase luteínica ou no período de luteólise cíclica. Resultados de Diskin & Sreenan (1986) citado por Gonzalez (2001), mostraram aumentos significativos nas concentrações de progesterona como consequência de um aumento no número de corpos lúteos acessórios. Entretanto, os resultados sobre a taxa de concepção não mostraram incremento significativo (58% vs. 65,5%, para vacas controle e tratadas, respectivamente).

Indica-se o uso de hCG em fêmeas bovinas no tratamento de ovários císticos, atresia folicular, indução da ovulação e estudo de receptores de LH, uma vez que

competem pelo mesmo receptor. Nos casos de cistos foliculares recomenda-se administração intracistal de 1000 UI, 5000 UI via endovenosa e 10000 UI via intramuscular ou subcutânea (Gonzalez et al., 2001).

A gonadotrofina coriônica de égua (eCG) é um hormônio glicoprotéico com alto conteúdo de ácido siálico. É produzida nos cálices endometriais do útero da égua do 40º ao 150º dia de gestação. O eCG foi isolado da urina de éguas prenhes e conseqüentemente, foi um dos primeiros hormônios gonadotróficos a ser comercialmente disponível. Tem atividade semelhante à do FSH e do LH; tem sido utilizada com freqüência para provocar extenso desenvolvimento folicular antes da superovulação visando a transferência de embriões. Para promover a superovulação em bovinos utiliza-se geralmente uma única dose de eCG. A via de administração está na dependência do tipo de preparação podendo ser subcutânea, intramuscular ou intravenosa. Normalmente, a dosagem usada está entre 1000 a 3000 UI (Grunert & Gregory, 1984).

2.5.2 Gonadotrofinas adeno-hipofisiárias

Em bovinos, normalmente são utilizadas oito aplicações com intervalos de 12 horas. A utilização de FSH em bovinos tem demonstrado resultados satisfatórios nas propriedades que dispõem de infra-estrutura para execução desta técnica. O LH excessivo durante o tratamento de superovulação causa a ativação prematura dos oócitos. Em vacas superovuladas com FSH, alta concentração de LH resultou em baixa fecundação (Bényei & Barros, 2000).

2.5.3 Superovulação

Existem diversos protocolos de superovulação, utilizando o cio natural ou em qualquer fase do ciclo estral. No cio natural inicia-se o tratamento superovulatório entre 8 a 12 dias após a manifestação do estro, coincidindo com o início da segunda onda folicular. Realiza-se 8 aplicações de FSH com intervalos de 12 horas, para aumentar o recrutamento dos folículos. No terceiro dia da superovulação realiza-se 2 aplicações de prostaglandina com o intuito de promover luteólise, para que haja redução da progesterona e conseqüente pico de LH, ocorrendo assim a ovulação (Bo, 2002).

Jaume & Campos (1991), usaram quarenta animais mestiços Holandês X Zebu para comparar o efeito superovulatório do eCG com um extrato de hipófise de cavalo (HAP). A metade dos animais receberam 200UI de PMSG, e a outra metade uma injeção de 70mg de HAP durante três dias consecutivos. Quarenta e oito horas após o início do tratamento os animais receberam 25mg de prostaglandina $F_{2\alpha}$. Foram inseminadas com sêmen congelado do mesmo touro 12 e 24 horas após a detecção do cio, e 7 dias depois, submetidos a colheita não cirúrgica de embriões. Os embriões recuperados foram classificados morfológicamente e os ovários foram aferidos quanto ao comprimento, largura e altura. Neste experimento não houve diferenças significativas ($P>0,05$) entre os tratamentos para nenhum dos parâmetros registrados.

O objetivo do tratamento superovulatório em bovinos é o de obter o número máximo de embriões fertilizados e transferidos com alta probabilidade de ocorrência de prenhez (Mapletoft et al., 2002).

Donaldson (1992), demonstrou que apesar do cumprimento de todos os requisitos, a resposta superovulatória resulta em muita variação. Um estudo que envolveu 1263 doadoras, somente 68% das fêmeas induzidas a superovulação produzirão embriões transferíveis. A superovulação é a etapa menos previsível dentro da técnica de transferência de embriões, sendo vários os fatores que influenciam os resultados, e mesmo quando praticamente não ocorreu nenhuma alteração de uma superovulação para outra, em um mesmo animal, os resultados podem ser diferentes.

A fonte mais provável de variabilidade das respostas ovarianas a estimulação exógena por gonadotrofinas, poderia ser a fase do ciclo estral em que a fêmea se encontra no início do tratamento (Diniz et al., 1999).

A variação individual e o tipo de hormônio são fatores importantes que interferem na resposta superovulatória. O estado ovariano no momento do tratamento parece ser fator determinante na resposta superovulatória, sendo uma característica constantemente pesquisada para elevar o índice de recuperação de embriões viáveis. Existem outros componentes da dinâmica folicular, como o tamanho, a distribuição e as condições dos folículos antrais que podem afetar a resposta ovulatória frente ao tratamento hormonal (Visintin et al., 1999).

Segundo Cabodevila & Torquati (2001), os efeitos negativos de altas doses de gonadotrofinas se relacionam com os fenômenos de superestimulação ovárica. Dos

animais superestimulados, geralmente se obtêm também menor taxa de recolheção (ovócitos e embriões em função dos corpos lúteos palpados ou observados). Têm-se dedicado para ela seguintes razões:

- ❑ Retenção de ovócitos nos folículos luteinizados e nos corpos lúteos;
- ❑ Retenção de ovócitos e/ou embriões nos ovidutos;
- ❑ Níveis muito alto de estrógenos produzidos pelos grandes folículos não ovulados que bloqueariam a capacidade de captação das fímbrias com a conseguinte caída de ovócitos na cavidade abdominal.

Os principais tipos de hormônios esteróides envolvidos nos processos reprodutivos da fêmea são os progestágenos e estrógenos. O progestágeno mais importante é a progesterona, a qual é produzido pelo corpo lúteo (CL), a placenta e córtex adrenal. A síntese de progesterona pelo CL é controlada pelo hormônio luteinizante (LH) no animal não gestante; a prolactina (PRL) também mantém o CL (efeito luteotrópico) em algumas espécies, particularmente em ratas, camundongas, cadelas e ovelhas. Os locais de produção de estrogênio são: ovários (células da granulosa dos folículos ovarianos), a unidade fetoplacentária e o córtex adrenal. A síntese ovariana de estrogênio é controlada pelo hormônio folículo estimulante (FSH), que atua nas células da granulosa. O LH também desempenha um papel vital na síntese do estrogênio, na qual controla a produção da molécula precursora essencial (testosterona) pelas células da teca interna (Stanbenfeldt & Edqvist, 1996).

O estabelecimento da atividade cíclica ovariana na puberdade é importante para a formação e liberação dos gametas, assim como para que ocorra a maturidade sexual (Stanbenfeldt & Edqvist, 1996).

2.6) Regulação das ondas de crescimento folicular

Durante a fase lútea (período de formação e atividade do corpo lúteo) do ciclo estral e de vacas gestantes, a progesterona secretada pelo corpo lúteo produz “feedback” negativo na liberação do LH, e por esta razão não ocorre a ovulação (Fortune, 1994). Se ocorrer uma baixa pulsatilidade de LH após a divergência dos folículos, surge um “turnover” de folículos e subsequente aumento do número de ondas de crescimento folicular por ciclo estral (Murphy et al., 1991)

Portanto, o que determina se irão ocorrer duas ou três ondas de crescimento folicular parece ser a taxa de crescimento, que pode ser dependente do padrão de

secreção do LH e ainda a duração da fase lútea do ciclo estral normal. Se a regressão do corpo lúteo ocorrer enquanto o folículo dominante da segunda onda for funcional (fase de crescimento ou estática), ele será ovulatório (ciclo estral com duas ondas). Porém, se o folículo já iniciar a fase de regressão no momento da luteólise, haverá o crescimento de outro folículo dominante da terceira onda de crescimento folicular (Kastelic et al., 1990).

No trabalho de Figueiredo et al., (1997), a dinâmica folicular para vacas e novilhas cruzadas Nelore (*Bos taurus indicus*) foram caracterizadas pela presença de duas ou três ondas de crescimento folicular. Tal padrão de crescimento folicular é igual a padrões reportados para fêmeas cruzadas européias (*Bos taurus taurus*) as quais apresentaram também duas a três ondas de crescimento folicular predominantemente. Entretanto, uma ou quatro ondas de crescimento folicular foram raramente observadas. Neste mesmo trabalho os animais que foram acompanhados por dois ciclos seguidos, apresentaram o mesmo padrão de crescimento folicular, no entanto, um terço apresentou variação no número de ondas de crescimento folicular de um ciclo para o outro.

Novilhas Brahman (*Bos taurus indicus*) apresentaram de uma ou até quatro ondas de crescimento folicular, porém a predominância é de três ondas foliculares (Rhodes et al., 1995).

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Local

O experimento foi conduzido na Fazenda São José, pertencente a APIL Agropecuária LTDA localizada no município de Bauru, na região centro-oeste do estado de São Paulo.

O período de execução do experimento foi de março de 2005 a março de 2006.

3.2. Animais e nutrição

Neste experimento foram avaliadas 57 vacas da raça Gir Leiteiro PO, não lactantes, de 4 a 7 anos, com escore corporal de 3,5 a 4,0 numa escala de zero a

cinco pontos. Os animais, durante o experimento estiveram em regime de pasto, em piquetes de capim *Braquiaria (Braquiaria decumbes)*, recebendo água e sal mineral *ad libidum*.

3.3. Tratamentos

As doadoras foram submetidas a controle de dois ciclos estrais consecutivos antes do início do experimento e posteriormente distribuídos em três grupos de forma aleatória, onde A (n=19), B (n=19) e C (n=19). As doadoras do grupo A foram superovuladas com 300 UI de FSH (Pluset®¹), o grupo B com 400 UI de FSH (Pluset®¹) e o grupo C com 500 UI de FSH (Pluset®¹). O programa de superovulação foi iniciado em fase aleatória do ciclo estral dos animais (Tabela 2).

Nos grupo A, foram utilizados dispositivos intravaginais contendo progesterona e administrado, via intramuscular, 2,5 mg de benzoato de estradiol (Estrogin®²). Cinco dias mais tarde, no início de uma nova onda folicular, inicia-se o tratamento superestimulatório com 300 UI de FSH (Quatro dias consecutivos, com doses decrescentes administradas duas vezes ao dia com aplicação intramuscular). Juntamente com a última aplicação do hormônio, administrou-se dose luteolítica de PGF₂α (Veteglan®³), via intramuscular e doze horas após a aplicação da PGF₂α foi retirado o dispositivo intravaginal. Os animais superovulados receberam uma dose de 50 µg de GnRH (Conceptal®⁴), via intramuscular, doze horas após a retirada do dispositivo intravaginal. As doadoras foram inseminadas doze horas após a aplicação de GnRH com duas doses de sêmen, em intervalos de doze horas entre as mesmas. As doses de sêmen utilizadas foram do mesmo touro e da mesma partida.

No grupo B, foram utilizados dispositivos intravaginais contendo progesterona e administrado, via intramuscular, 2,5 mg de benzoato de estradiol (Estrogin®²). Cinco dias mais tarde, no início de uma nova onda folicular, foi iniciado o tratamento superestimulatório com 400 UI de FSH (Quatro dias consecutivos, com doses decrescentes administradas duas vezes ao dia com aplicação intramuscular). Juntamente com a última aplicação do hormônio, administrou-se dose luteolítica de

¹ Laboratorios Calier, Espanha

² Farmavet – Produtos Veterinários LTDA

³ Laboratórios Calier do Brasil LTDA

⁴ Hoechst Roussel Vet. S.A.

PGF₂α (Veteglan®³), via intramuscular e doze horas após a aplicação da PGF₂α retirou-se o dispositivo intravaginal. Os animais superovulados receberam uma dose de 50 µg de GnRH (Conceptal®⁴), via intramuscular, doze horas após a retirada do dispositivo intravaginal. As doadoras foram inseminadas doze horas após a aplicação de GnRH com duas doses de sêmen, em intervalos de doze horas entre as mesmas. As doses de sêmen utilizadas foram do mesmo touro e da mesma partida.

No grupo C, foram utilizados dispositivos intravaginais contendo progesterona e administrado, via intramuscular, 2,5 mg de benzoato de estradiol (Estrogin®²). Cinco dias mais tarde, no início de uma nova onda folicular, iniciou-se o tratamento superestimulatório com 500 UI de FSH (Quatro dias consecutivos, com doses decrescentes administradas duas vezes ao dia com aplicação intramuscular). Juntamente com a última aplicação do hormônio, administrou-se dose luteolítica de PGF₂α (Veteglan®³), via intramuscular e doze horas após a aplicação da PGF₂α foi retirado o dispositivo intravaginal. Os animais superovulados receberam uma dose de 50 µg de GnRH (Conceptal®⁴), via intramuscular, doze horas após a retirada do dispositivo intravaginal. As doadoras foram inseminadas doze horas após a aplicação de GnRH com duas doses de sêmen, em intervalos de doze horas entre as mesmas. As doses de sêmen utilizadas foram do mesmo touro e da mesma partida.

Tabela 2: Protocolo utilizado na superovulação das vacas Gir.

DIA	0	5	6	7	8	9	10
MANHÃ	P4 + E2 ↓CIDR®	FSH	FSH	FSH	FSH	↑CIDR	IA
TARDE		FSH	FSH	FSH	FSH PGF ₂ α	GnRH	IA

As colheitas dos embriões foram realizadas pelo método não cirúrgico no dia 7,0 após a primeira inseminação artificial com o cateter de Foley 20 Fr/ch, fixado no corpo do útero para lavagem simultânea dos dois cornos uterinos utilizando-se 1000 ml de DPBS por doadora. Após a colheita os embriões foram colocados em solução de DPBS e as estruturas foram classificadas no laboratório como viáveis, degeneradas ou não fecundada.

Para análise estatística do potencial de desenvolvimento dos protocolos de superovulação, as proporções de embriões viáveis entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Qui-quadrado (χ^2), adotando os níveis de significância de 5% e 1%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização do FSH como agente indutor de superovulação tem sido extensivamente estudada, conseqüentemente, já foi testado o uso de diferentes concentrações (Pawlyshyn et al., 1996, Gonzalez et al., 1990; Saunders et al., 1990) e vias de administração (Hockley et al., 1992; tributo et al., 1993), a eficiência de produtos comerciais das mais variadas marcas e procedências (Donaldson, 1989; Page et al., 1989; Del Campo et al., 1990;; Tributo et al., 1993; Donaldson, 1995) e as variações na relação FSH:LH entre preparados comerciais (Donaldson & Ward, 1987).

No tratamento com 300 UI de FSH obtiveram-se treze embriões degenerados, quarenta e nove óvulos e trinta e três embriões viáveis, totalizando 95 estruturas recuperadas. No tratamento com 400 UI de FSH obtiveram-se vinte e um embriões degenerados, vinte óvulos e sessenta e cinco embriões viáveis, totalizando cento e seis estruturas recuperadas. No tratamento utilizando 500 UI de FSH obtiveram-se cinco embriões degenerados, dezoito óvulos e trinta e três embriões viáveis, totalizando cinquenta e seis estruturas recuperadas (Tabela 3).

Tabela 3: Resultados do número total encontrados após a colheita de embriões nas doadoras Gir.

TRATAMENTO (UI)	ED (%)	OV (%)	EV (%)	TOTAL
500	5 (8,93)	18 (32,14)	33 (58,93)	56
400	21 (19,81)	20 (18,86)	65 (61,33)	106
300	13 (13,68)	49 (51,57)	33 (34,75)	95
TOTAL	39	87	131	257

ED: Embriões degenerados; OV: Óvulos; EV: Embriões viáveis.

A variação individual e o tipo de hormônio são fatores importantes que interferem na resposta superovulatória. De acordo com Monniaux et al. (1983), o estado ovariano no momento do tratamento parece ser fator determinante na resposta superovulatória, sendo uma característica constantemente pesquisada para elevar o índice de recuperação de embriões viáveis. Moor et al. (1984) relatam a

existência de outros componentes da dinâmica folicular, como o tamanho, a distribuição e as condições dos folículos antrais que podem afetar a resposta ovulatória frente ao tratamento hormonal. Ainda salientam que apesar das melhorias nas técnicas de transferência de embriões, o problema maior continua sendo a baixa taxa de recuperação de embriões viáveis, podendo ser devido à variação individual frente ao estímulo superovulatório.

Os resultados encontrados foram analisados pelo teste de Qui-Quadrado (χ^2), com nível de significância de 1% nos tratamentos 300 e 400 UI onde se observaram diferenças estatisticamente significativas nas proporções de embriões viáveis. Com o nível de significância de 5% entre os tratamentos 300 (33/95) e 500 (33/56) UI apresentou diferenças estatísticas significativas e no tratamento com 400 (65/106) e 500 (33/56) UI não houve diferenças estatísticas (Figura 6).

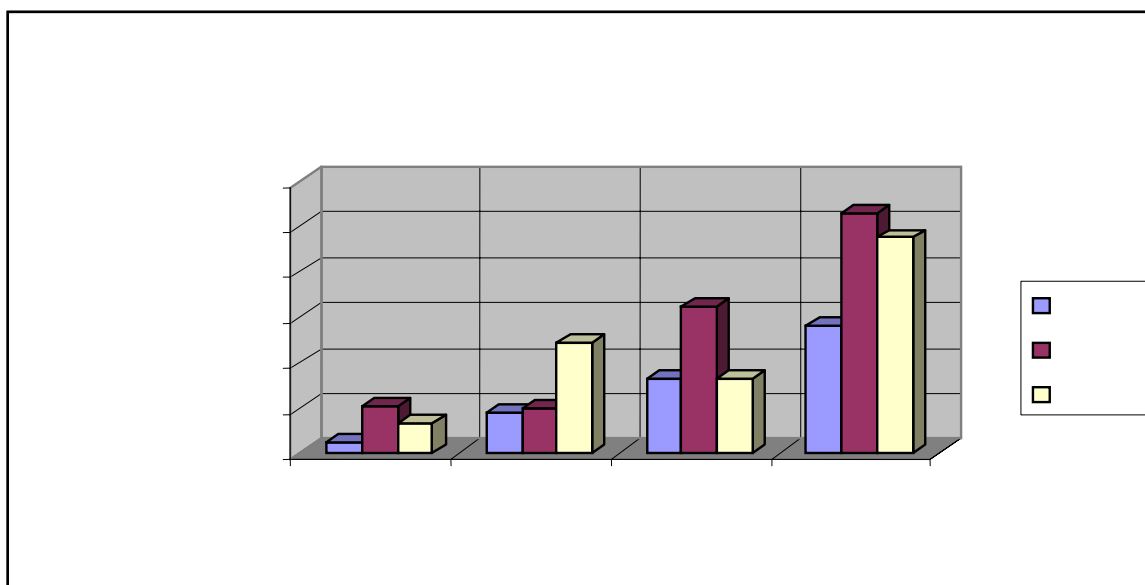


Figura 6: Proporções de estruturas recuperadas nas doadoras Gir
ED: Embriões degenerados; OV: Óvulos; EV: Embriões viáveis.

Prado & Toniollo (2006), superovularam 67 vacas da raça Gir leiteiro com 300, 400 ou 500 UI de FSH, sendo administradas em 8 subdoses decrescentes, com início em fase aleatória do ciclo estral, durante 4 dias consecutivos, com intervalos de 12 horas (Tabela 3). As colheitas de embriões foram realizadas pelo método não cirúrgico sete dias após a primeira inseminação artificial. Das variáveis analisadas apenas o tratamento com 400 UI de FSH ao nível de significância de 1% influenciaram a recuperação de embriões viáveis, sendo de 2,92, onde esta média

foi inferior ao encontrado neste estudo de 3,42. Nas vacas que receberam 300 UI e 500 UI de FSH, a nível de significância de 5%, com diferenças estatísticas significativas na taxa de recuperação de embriões viáveis.

Tabela 3: Protocolo de superovulação em vacas da raça Gir Leiteiro (Prado & Toniollo, 2006)

DIA	0	4	5	6	7	8	9
MANHÃ	E2 ↓CIDR	FSH	FSH	FSH	FSH PGF ₂ α	CIO ↑CIDR	IA
TARDE		FSH	FSH	FSH	FSH PGF ₂ α	GnRH	IA

Os resultados encontrados condizem com os resultados relatados por Prado & Toniollo (2006) dentro da raça Gir Leiteiro, mas diferem dos resultados encontrados por Visintin et al. (1999) quando superovulou novilhas da raça Nelore com 300 , 400 ou 500 UI de FSH/LH, onde a taxa de recuperação de embriões viáveis com 300 UI de FSH/LH foi compatível com a literatura, no entanto, 400 e 500 UI apresentaram baixos resultados. De acordo com Figueiredo et al. (1995), os animais da raça Nelore possuem ovários, folículos e corpos lúteos menores, o que pode estar relacionado à exigência de menor concentração de FSH para indução da superovulação, assim condizem com os resultados encontrados , pois o grupo com menor dose de FSH (300 UI) apresentou maior número de embriões viáveis e de estruturas totais, onde este resultado difere dos encontrados por este estudo em vacas da raça Gir Leiteiro, pois o grupo com menor e maior dose de FSH respectivamente, 300 e 500 UI, apresentaram menor número de embriões viáveis. Zanenga & Silva (1988), encontraram médias de estruturas e de embriões viáveis de 8,2 e 4,1, respectivamente, para fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*.

Donaldson et al. (1986), Gonzalez et al. (1990) e Mapletoft et al. (1992) demonstraram os efeitos negativos de concentrações elevadas de LH na produção e na qualidade de embriões bovinos. Foi sugerido, pelos autores, que o nível máximo de contaminação com LH, numa preparação de FSH, deveria ser entre 15 a 20%.

Fonseca et al. (2001) superestimulou 26 doadoras das raças Nelore Padrão (16), Nelore Mocho (3), Gir Leiteiro (4), Brahman (2) e Guzerá (1) com 350 UI de

FSH e o número de embriões viáveis coletados em função da raça da doadora foi de: Nelore Padrão, 92 (68,2%), Nelore Mocho, 17 (12,6%), Gir Leiteiro 15 (11,1%), Brahman, 7 (5,2%) e Guzerá, 4 (3,0%). A média geral deste experimento foi de 5,2 (135/26) embriões viáveis por doadora. Essa média assemelha-se a resultados obtidos por equipes de transferência de embriões e em estudos anteriores em taurinos (Callesen et al., 1995) que relataram uma média de quatro a cinco embriões viáveis por doadoras superovuladas. A média encontrada neste trabalho superovulando vacas da raça Gir Leiteiro com os tratamentos de 500, 400 e 300 UI foram inferiores aos encontrados por Fonseca et al. (2001) dentro da raça Gir, sendo respectivamente de 1,7, 3,4 e 1,7 onde a média geral foi de 2,29 embriões viáveis por doadora.

Fonseca et al. (2002) avaliaram a resposta superovulatória de novilhas da raça Nelore tratadas com 250 ou 500 UI de FSH e concluíram que o tratamento com 250 UI de FSH foi tão eficaz quanto o tratamento com 500 UI de FSH para superestimular novilhas da raça Nelore, diferente dos resultados encontrados por neste trabalho ao superestimular fêmeas da raça Gir Leiteiro com 300, 400 ou 500 UI de FSH, onde os tratamentos com 300 e 500 UI de FSH apresentaram diferenças estatísticas ao nível de significância de 5% e os tratamentos 300 e 400 UI apresentaram diferenças ao nível de significância de 1%.

Não há informações suficientes na literatura sobre o efeito de diferentes concentrações de FSH/LH em protocolos de superestimulação dentro da raça Gir Leiteiro. Além disso, há escassez de trabalhos que avaliam efeito nutricional, dinâmica folicular e superovulação em bovinos da raça Gir Leiteiro.

O valor do investimento dentro de um programa de superovulação bovina é de aproximadamente \$ 550,00 (Quinhentos e cinquenta dolares), onde neste valor está incluído o técnico, o hormônio, sêmen e todo material empregado durante a colheita de embriões. Em relação a esses aspectos não verificou-se, observando a literatura consultada, nenhuma consideração sobre o investimento.

5. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados no presente trabalho, permitem concluir que:

- a) O tratamento utilizando 400 UI de FSH apresentou maior número de embriões viáveis;
- b) Os tratamentos com 500 e 300 UI apresentaram números iguais de embriões viáveis, porém o tratamento com 300 UI teve o maior número de estruturas totais;
- c) O tratamento com 400 UI apresentou maior número de estruturas degeneradas;
- d) O tratamento com 500 UI apresentou menor número de estruturas degeneradas;
- e) O tratamento com 300 UI apresentou maior número de óvulos;
- f) O tratamento com 500 UI apresentou menor número de óvulos

A melhor resposta superestimulatória foi utilizando o protocolo com concentração de 400 UI de FSH, proporcionando maior número de embriões viáveis.

6. REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE ZEBU A raça Gir. **Revista ABCZ** nº 8, p.30-35, 2002.

ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, O.J. et al Association between surges of FSH and emergence of follicular waves in heifers. **Journal Reproduction and fertility** v.94,p. 177-188, 1992.

AGARWAL, S.P., RAHMAN, S.A., LAUMAS, K.R., Studies on steroid hormones:progesterone concentration in the blood serum of zebu cows during oestrus cycle. **Indian Journal Animal Science**, 47(11):715-719, 1977.

ALBERTO, R.H.; Manejo de doadoras e receptoras In: PALMA, G.A., **Biotechnologia de la Reproducción**. 1ª edição editora INTA, Argentina, 2001. p.21-26

ALVAREZ, R.H.; CARVALHO, J.B.P; SILVA, A.R.; PERONE, C.N.; RIBELA, M.T.C.P.; OLIVEIRA FILHO, E.B. Endocrine profiles and ovulation rate of cows superovulated with FSH following passive immunization against steroid free-bovine follicular fluid. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* [on line]. 1998, vol.35, nº 6 [cited 15 November 2004], p. 00-00. Available from World Wide Web: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95961998000600007&lng=en&nrm=iso ISSN 1413-9596.

AMARAL,B.C.; SOUZA, J.C.; BERTECHINI, A.G.; VIVEIROS, A.T.; TEXEIRA, J.C.; ARANTES, A.F.A. Efeito de diferentes dosagens de vitamina A injetável na produção e qualidade de embriões bovinos da raça Nelore. **Ciências Agrotécnicas** v. 28, n. 3, p. 662-667, 2004.

ANDRADE, J.C.O.; OLIVEIRA, M.A.L.; SANTOS FILHO, A.S.; WISCHRAL, A.; LIMA, P.F.; SOUZA, D.M.B. Diferentes protocolos de superovulação em vacas Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** v. 23, n.3, p. 317-18, 1999.

ANSELMO-FRANCI, J.A., FRANCI, C.R, LUCION, A.B., SANVITTO, G. Projeto Temático – FAPESP - Sistema reprodutor feminino: Controle neuroendócrino e efeitos do estresse. p.1-28, 1999.

BADINGA, L., THATCHER, W.W., WILCOX, C.J. Effect of season on follicular dynamics and plasma concentrations of estradiol-17 β , progesterone and luteinizing hormone in lactating Hostein cows. **Theriogenology**, 42:1263-1274, 1994.

BALIEIRO, E.S.; PEREIRA, J.C.C.; VERNEQUE, R.S.; PEREIRA, C.S.; BERGMANN, J.A.G. Estimativas de parâmetros genéticos e de tendência fenotípica, genética e de ambiente de algumas características reprodutivas na raça Gir. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* [online]. Ago. 1999, vol. 51, nº 4 [citado 13 Novembro 2004], p. 371-376. Disponível na World Wide Web:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09351999000400014&lng=pt&nrm=iso. ISSN 0102-0935.

BENECH, H., BRUNE, P., PRUVOST, A. Fate of etiproston, a syntetic analogue of PGF2 α , in cows. **Journal Pharmacol. Therap.** 17:339-344, 1994.

BENYEI, B.; BARROS, C.C.W. Effect of superovulation on performance of bovine embryo donors imported from temperate zone to tropical climate during the first two years of adaptation. **Arq. Bras. Med. Zootec.**, Aug. 2000, vol. 52, nº 4, p. 366-371. ISSN 0102-0935.

BINELLI, M. Estratégias anti-luteolíticas para a melhora da sobrevivência embrionária em bovinos. In: MADUREIRA E.H., BARUSELLI, P.S. **Controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes**, São Paulo, FUNVET, 2000, p. 99-114.

BO, G.A. Sincronizacion Del desarrollo folicular y luteal in grupos de donantes y receptoras de embriones bovinos. In: **II Curso de abordagem teórico-prática de novas técnicas de sincronização sem observação de cio em bovinos (IA e TE)**. Cornélio Procópio-PR. Anais, 2002.

BO, G.A., ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A. et al. Follicular waves dynamic alter estradiol 17 β treatment of heifers with or without a progesterone implant. **Theriogenology**, v. 41, p. 1555-1569, 1994.

BO, G.A., ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A. et al. Exogenous control of follicular development in cattle. **Theriogenology**, v. 43, p. 31-40, 1995.

BORGES, A.M., TORRES, C.A., RUAS, J.R.M., ASSIS, A.J. de., MONTEIRO, M.S., WENCESLAU, A.A. Concentração plasmática de progesterona durante o ciclo estral normal e após a superovulação de novilhas mestiças holandês-zebu. In.: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37, 2000, Viçosa, MG. **Anais . . . Viçosa: UFV**, 2000. p. 152.

BORGES, Á.M., TORRES, C.A.A., RUAS, J.R.M., ROCHA JÚNIOR, V.R., CARVALHO, G.R. Dinâmica folicular ovariana em novilhas mestiças Holandês-Zebu. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, out. 2001, vol.53, n.5, p. 595-604. ISSN 01102-0935.

CABODEVILA, J. & TORQUATRI, S. Superovulação de Fêmeas bovinas. In: PALMA, G.A. **Biotechnologia de la Reproducción** 1ª edição INTA, Argentina, 2001. p. 79-108.

CALLESEN, H., LOVENDAHL, P., BAK, A. Et al. Factors affecting the developmental stage of embryos recovered on day 7 from superovulated dairy cattle. **Journal Animal Science**, v.73, p. 1539-1543, 1995.

CAVALIERI, J., RUBIO, I., KINDER, J.E., ENTWISTLE, K.W. Synchronization of estrus and associated endocrine changes in Bos Inducus cows. **Theriogenology**, v.47, p.801- 814. 1997.

CHAGAS & SILVA, J. et al. Embryo yield and plasma progesterone profiles in superovulated dairy cows and heifers. **Animal Reproduction Science**, v.69, n1-2, p.1-8, 2002.

COSTA, D.S., HENRY, M., OLIVEIRA, B.C.B.V., WRITE, C.R. Indução da luteólise nos primeiros dias do diestro em vacas zebu. In.: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37, 2000, Viçosa, MG. **Anais . . . Viçosa: UFV, 2000a. p.177.**

COSTA, D.S., HENRY, M., OLIVEIRA, B.C.B.V., WRITE, C.R. Uso de etiproston para sincronização de cio em vacas zebu. In.: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37, 2000, Viçosa, MG. **Anais . . . Viçosa: UFV, 2000b. p.187.**

COSTA, L.L; SILVA, J.C.; SILVA, J.R. Superovulatory response embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle. **Theriogenology** v. 56, n.1, p. 65-77, 2001.

CUPPS, T.P. **Reproduction in Domestic Animals** 4º ed. Department of Animal Science, University of California, Davis, 1991.

DEL CAMPO, M.R; BECERRA, F.; GONZALEZ, M.; MURPHY, B.D.; MAPLETOFT, R.J. Superovulation with three different comercial pituitary extracts in the cow. **Theriogenology**, 1990, p.33-208.

DINIZ, E.G.; JACOMINI, J.O.; NASCIMENTO, M.R.B.M.; MENDES JR, J.O.B.; ESPER, C.R.. Eficiência de dois diferentes produtos hormonais na superovulação de vacas da raça Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** v. 23, n.3, p. 319-20, 1999.

DOMINGUEZ, J.C., PENA, S.J., ANEL, L., CARBAJO, M., ALEGRE, B.P. **Prostanoides luteolíticos y tecnologia de la reproduccion**. Bovis – Aula Veterinaria, Jun, n.70 – Tratado de Veterinaria Practica. p.49-65. 1996.
DONALDSON, L.E; WARD, D.N.; GLENN, S.D. Use of porcine follicle stimulating hormone after chromatographic purification in superovulation of cattle. **Theriogenology**, 1986, p. 747-757.

DONALDSON, L.E.; WARD, D.N. LH effects on superovulation of cattle. **Theriogenology**, 1987, p.27-225.

DONALDSON, L.E. Porcine, equine and ovine FSH in the superovulation of cattle. **Theriogenology**, 1989, p. 31-183.

DONALDSON, L.E. Embryo production by SUPER-OV and FSH-P. **Theriogenology**, 1990, p. 33-214.

DONALDSON, L.E., **Superovulation of trial Ausa International Inc. Tyler, Texas, 1992.**

DONALDSON, L.E. A comparison of FSH products. In: **International Workshops of Embryo Transfer, Biotechnology and Advanced Technologies**, 1, 1995, Montevideo. Anais...Montevideo: Universidad de la Republica, 1995, p.01-08.

DREW, S.B., PETERS, A.R. Effect of buserelin on pregnancy rates in dairy cows. **Vet. Rec.**, v.134, p.267-269.1994.

ELSDEN, R.P., KESSLER, R.M. Superovulation of Nelore cows and heifers. **Theriogenology**, v.19, n.1, p.127. 1983.

FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; ROCHA, G.P.; PAPA, F.O. Prevalência de duas ondas de crescimento folicular ovariano em vacas da raça Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.19, n.3-4, p. 153-235, 1995.

FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINEHIRO, O.L. et al. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos Taurus indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47, p.1489-1505, 1997.

FIGUEIREDO, M.M.N.; FONSECA, F.A.; TORRES, C.A.A.; GALIMBERT, A.M.; ALMEIDA, C.A. Dinâmica folicular ovariana de vacas leiteiras no pós-parto após tratamentos com buserilina (GnRH) e cloprostenol (PGF₂α). **Revista Brasileira de Zootecnia** v.29, n.3, p.725-731, 2000.

FERNANDES, C.A.C. Efeito do tratamento com hormônio folículo estimulante (FSH) sobre a taxa de gestação de novilhas mestiças usadas como receptoras de embrião. Viçosa, MG:UFV, 1994. 63p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1994.

FERNANDES, C.A.C., FIGUEIREDO, A.C.S.de. Doses e vias de aplicação de cloprostenol sódico para sincronização de estro em novilhas. In.: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37, 2000, Viçosa, MG. **Anais . . . Viçosa: UFV**, 2000. p.161.

FONSECA, J.F.; SILVA FILHO, J.M.; PINTO NETO, A.; PALHARES, M.S. Superovulated zebu cows embryonic developmental stages. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Dec. 2001, vol. 53, nº 6, p. 671-676. ISSN 0102-0935.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biological Reproduction**, v.50, p.225-232, 1994.

FREEMAN, M.E. The ovarian cycle of the rat. In: **The Physiology of Reproduction**. Ed. E. Knobil and J. Neil *et al.* Raven Presss, NY.,45: 613-657, 1994.

GALIMBERTI, A.M., FONSECA, F.A., ARAÚJO, M.C.C., COSTA, E.P.da., COSTA,D.S. Taxa de gestação em receptoras de embrião bovino tratadas com buserelina após a inovulação. In.: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36, 1999, Porto Alegre, RS. **Anais . . . Porto Alegre: RS**, 1999. p.108.

GONZALEZ, A. LUSSIER, J.G.; CARRUTHERS, T.D.; MURPHY, B.D.; MAPLETOF, R.J. Superovulation of beef heifers with Folltropin-V: A new FSH preparation containing reduced LH activity. *Theriogenology*, 1990, p. 33-519.

GONZALEZ, F.H.D. **Endocrinologia da Reprodução**. Disponível em: www.ufrgs.br/favet/bioquimica.65p.2001.

GORSKI, R.A. Sexual Differentiation of the nervous system. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. **Principles of Neural Science**. New York, Mac Graw-Hill, 2000, p. 1131-1146.

GUINThER, O.J.; KASTELIC, J.P.; KNOPF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v.20, p.187-200, 1989.

GUINThER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biological Reproduction**, v.55,p.1187-1194, 1996.

GRUNERT, E., GREGORY, R.M. **Diagnóstico e terapêutica da infertilidade da vaca**. Porto Alegre: Sulina, 1984. p. 82-99.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução dos animais domésticos**. 6 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 726p. 1996.

HAFEZ, E.S.E., JAINUDEEN, M.R.; Y. ROSNINA Hormônios, fatores de crescimento e reprodução In: Hafez, E.S.E; Hafez, B.. **REPRODUÇÃO ANIMAL**, 7ªed. Barueri, Ed. Manole, 2004. p.33-55.

HOCKLEY, D.K; BO, G.A.; PALASZ, A.T.; DEL CARMO, M.R.; MAPLETOFT, R.J. Superovulation with a single subcutaneous injection of Folltropin in the cow: effect of dose and site of injection. **Theriogenology**, 1992, p.37-224.

JAINUDEEN, M.R.; WAHID, H.; HAFEZ, E.S.E.. Indução da Ovulação, Produção e Transferência de Embriões. In: Hafez, E.S.E; Hafez, B.. **Reprodução Animal**, 7ªed. Barueri, Ed. Manole, 2004. p.413-419.

JAUME, C.M.; CAMPOS, A.L. Superovulação em bovinos usando PMSG ou um extrato bruto de hipófise de cavalo (HAP). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.26, p.591-595, 1991.

JOLLY, P.D.; TISDALL, D.J.; HEATH, D.A. Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cAMP response to FSH and LH, and follicular atresia. **Biological Reproduction**, v.51, p.934-944, 1994.

KASTELIC, J.P.; KNOPF, L.; GUINThER, O.J. Effect of day of prostaglandin F2 treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. **Animal Reproduction Science** v.23, p.169-180, 1990.

KOZICKI, L.E.; SEGUI, M.S.; FANTINI FILHO, J.C.; PRADO, F.R.A; MATTE, F.; GLASER JR., P.; WEISS, R.R. A somatotrofina bovina (bst) e sua relação com o recrutamento follicular ovariano durante o ciclo estral de vacas. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n.1, p.35-44, 2005.

LEDIC, I. L. 1994. Gir leiteiro. **Revista dos Criadores** São Paulo, p. 23-35, abril 1994.

LEI, V.M., CHEGINI, N., RAO, C.V. Quantitative cell composition of human and bovine corpora lutea from various reproductive state. **Biological Reproduction.**, 44:1148-1196. 1991.

LERNER, S.P., THAYNE, W.V., BAKER, R.D., HENSCHEN, T. Age, dose of FSH and other factors affecting a superovulation. In: Holstein cows. **Journal Animal Science**, v.63, p.176-183. 1986.

LUCY, M.C. Regulation of follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.83, p.1635-1647, 2000.

MANN, G.E., LAMMING, G.E., FRAY, M.D. Plasma estradiol and progesterone during early pregnancy in the cow and effects of treatment with buserelin. **Animal Reproduction Science.**, v.37, p.121-131, 1995.

MAPLETOFT, R.J.; NASSER, L.F.; BO, G.A.; DEL CAMPO, M.R.; The effect of LH content in a porcine pituitary extract on superovulatory response to a single subcutaneous injection in beef heifers. In: **International Congress on Animal Reproduction**, 12, 1992, de Hague. Anais...De Hague: INCAR, 1992, p. 237-239.

MAPLETOFT, R.J.; STEWARD, K.B.; ADAMS, G.P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reprod. Nutr. Dev.** v.42, p. 601-611, 2002.

MENEZES, C. 1999. Feita para o trópico. **Revista Globo Rural**, n.159, p. 44-49, janeiro 1999.

MONNIAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. Superovulatory responses of cattle. **Theriogenology**, v.19, n.1, p.55-81, 1983.

MOOR, R.M.; KRUIP, T.A.; GREEN, D. Intraovarian control of folliculogenesis: limit to superovulation? **Theriogenology**, v.21, n.1, p. 103-116, 1984.

MOREIRA, R.J.C. Uso do protocolo CRESTAR® em tratamentos utilizando benzoato de estradiol, PGF₂α, PMSG e GnRH para controle do ciclo estral e ovulação em vacas de corte. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2002. 1-62p. Dissertação (Mestrado).

MORRIS, C.A., DAY, A.M., PETERSON, A.J. An experiment to measure the doseresponse relationship of ovulation rate to FSH in cows selected with history of twinning. **New Zealand Vet. J.**, 36:189-191. 1988.

MURPHY, M.G.; ENRIGHT, W.J.; CROWE, M.A. Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle in beef heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.92, p.333-338, 1991.

NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, J.F.C.; MACIEL, M.N.. Eficiência Reprodutiva em Gado Leiteiro. In: Galina, C.; Pimentel, C.A.; Neves, J.P.; Moraes, J.C.F.; Henkes, L.E.; Gonçalves, P.B.; Weiner, T. **Avanços na Reprodução Bovina 2000**, 1ªed. Pelotas, Ed. Universitária, 2000 p.35-37.

PAGE, R.D.; JORDAN, J.E.; JOHNSON, S.K. Superovulation of Holstein heifers under heat stress with FSH-P or Folltropin. **Theriogenology**, 1989,31-236.

PAWLYSHYN, V.; LINDSELL, C.E.; BRAITHWAITE, M.; MAPLETOFT, R.J. Superovulation of beef cows with FSH-P: A dose-response trial. **Theriogenology**, 1986, p. 21-37.

PRADO, F.R.A, TONIOLO, G.H. SUPEROVULAÇÃO EM VACAS DA RAÇA GIR COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FSH/LH EM OITO SUBDOSES. **Net**. São Paulo, 2006. Radar técnico em reprodução. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br> Acesso em: 01 mar. 2006.

RAMOS, A.A., CAMARGO, L.S.A., SÁ, W.F., FERREIRA, A.M., COSTA, E.P. In vitro fertilization with bovine semen in Gyr breed. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. [online]. Aug. 2000, vol.52, nº. 4 [cited 13 November 2004], p. 360-365. Available from World Wide Web: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352000000400013&lng=en&nrm=iso. ISSN 0102-0935.

REICHENBACH, H.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F.; SANTOS FILHO, A.S.; ANDRADE, J.C.O Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: Gonsalves, P.B.D.; Figueiredo, J.R.; Freitas, V.J.F. **BIOTÉCNICAS APLICADAS À REPRODUÇÃO ANIMAL**, 1ªed. São Paulo, Ed. Varela, 2002 p.153-160.

REIS, A.R.S.; REYES, A.; GAMBARINI, M.L.; RUMPF, R. Dinâmica folicular por ultra-sonografia em novilhas pré-púberes da raça Gir **Arch. Latinoam. Prod. Anim.** Vol. 13 (2): 51-55, 2005.

RUMPF, R; BEM, D.E.; PEIXER, M.A.S.; SOUZA, R.V. **Manual de transferência e micromanipulação de embriões nas espécies bovina e eqüina**. Brasília: EMBRAPA – Recursos genéticos e biotecnologia, 2000, p. 71-103.

SANTIAGO, L.L., TORRES, C.A.A., NOGUEIRA, E.T., BORGES, A.M. Resposta superovulatória de novilhas Nelore confinadas tratadas com duas doses diferentes de FSH. In. **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, p.36,1999, Porto Alegre.

SANTIAGO, L.L.; TORRES, C.A.A; NOGUEIRA, E.T. et al. Folículo dominante e resposta superovulatória em novilhas da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Jan./fev. 2002, v.31, nº 1, supl., p. 350-362. ISSN 1516-3598.

SAUNDERS, J.; WILMOTT, N.; PALASZ, A.; MAPLETOFT, R.J. Dose titration of Folltropin in the cow. **Theriogenology**, 1990, p. 33-319.

SILCOUX, R.W.; POWELL, K.L.; KISER, T.E.; Ability of dominant follicles to respond to exogenous GnRH administration is dependent on their stage of development . **Journal of Animal Science** v.71, suppl. 1, p. 219, 1993.

SILVA, A.R.R., REYES, A.L., GAMBARINI, M.L., RUMPF, R., OLIVEIRA, C.C., OLIVEIRA FILHO, B.D. Dinâmica folicular por ultra-sonografia em novilhas pré-puberes da raça Gir **Arch. Latinoam. Prod. Anim.** V.13, n2, p. 51-55, 2005.

STABENFELDT, H.G.; EDQVIST, E.L. Processos reprodutivos na fêmea. In: Swenson, j.m.; Reece, o.w. **Fisiologia dos animais domésticos** 11º edição Rio de Janeiro, 1996, p. 615-616.

STEVENSON, J.S., BRITT, J.H. Detection of estrus by three methods. **Journal Dairy Science**. 60:1994-1998, 1977.

THACHER, W.W.; MOREIRA, F.; SANTOS, J.E.P.; MATTOS, R.C.; LOPES, F.L.; PANCARCI, S.M.; RISCO, C.A.. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. **Theriogenology** v. 55, n.1, p. 75-89, 2001.

TRIBULO, H.; JOFRE, F.; CARCEDO, J.; ALONSO, A.; TRIBULO, R.; BO, G.A.. Superovulation in *Bos indicus* cattle with a single subcutaneous injection of commercial pituitary extrats. **Theriogenology**, 1993, p.39-331.

TWAGIRAMUNGO, H.,GUILBAULT, L.A., PROULX, J. Synchronization of estrus and fertility in beef cattle with two injections of buserelin ang prostaglandin.**Theriogenology**, v.38, p.1131,1992.

VISINTIN, J.A.; ARRUDA, R.P.; MADUREIRA, E.H.; MIZUTA, K.; CELEGHINI, E.C.C.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A.; GUSMÕES, P.P.G.; CANDINI, P.H.Superovulação de novilhas da raça Nelore com diferentes doses de FSH/LH e congelação de embriões pelo método one-step com etilenoglicol. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. [online]. 1999, vol.36, nº 5 [citado 13 de Novembro 2004], p.00-00. Disponível na World Wide Web: http://www.scielo.br.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95961999000500009&lng=pt&nrm=iso. ISSN 1413-9596.

ZANENGA, C.A.; SILVA,A. Número de embriões viáveis obtidos em relação às superovulações consecutivas em *Bos indicus*. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, Universidade Federal de Santa Maria, v.18, suplemento, 32, p.32, 1988.

WOLFENSON, D.; SONEGO, H.; SHAHAM-ALBALANCY, A.; SHPIRER, Y.; MEIDAN, R. Comparison of the steroidogenic capacity of bovine follicular and luteal cells, and corpora lutea originating from dominant follicles of the first or second follicular wave. **Journal of Reproduction and Fertility** v. 117, n.2, p. 241-246, 1999.