

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA VETERINÁRIA

EFICIÊNCIA DO PROTOCOLO SUPERESTIMULATÓRIO P-36,
ASSOCIADO À ADMINISTRAÇÃO DE eCG OU LH, EM ANIMAIS
DA RAÇA NELORE

Ana Carolina dos Santos Oliveira

BOTUCATU - SP

- 2011 -

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA VETERINÁRIA

EFICIÊNCIA DO PROTOCOLO SUPERESTIMULATÓRIO P-36,
ASSOCIADO À ADMINISTRAÇÃO DE eCG OU LH, EM ANIMAIS
DA RAÇA NELORE

Ana Carolina dos Santos Oliveira

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

Orientador: Prof. Dr. Ciro Moraes Barros

BOTUCATU - SP

- 2011 -

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação - Campus de Botucatu - UNESP
Bibliotecária responsável: *Sulamita Selma Clemente Colnago* – CRB 8/4716

Oliveira, Ana Carolina dos Santos.

Eficiência do protocolo superestimulatório P-36, associado à administração de eCG ou LH, em animais da raça Nelore / Ana Carolina dos Santos Oliveira. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: *Ciro Moraes Barros*

Capes: 50504002

1. Bovino - Reprodução.

Palavras-chave: *Bos indicus*, eCG, FSH, LH, Nelore, Transferências de embriões, superovulação

Nome do Autor: Ana Carolina dos Santos Oliveira

Título: EFICIÊNCIA DO PROTOCOLO SUPERESTIMULATÓRIO P-36, ASSOCIADO
À ADMINISTRAÇÃO DE eCG OU LH, EM ANIMAIS DA RAÇA NELORE

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Ciro Moraes Barros

Presidente e Orientador

Departamento de Farmacologia

IBB-UNESP-Botucatu- SP

Prof. Dr. Roberto Sartori Filho

Membro

Departamento de Zootecnia

ESALQ – USP – Piracicaba

Dr. Ronaldo Luiz Ereno

Membro

Autônomo

Data da Defesa: 11 de abril de 2011.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Aston e Bernadete, que sempre acreditaram e alimentaram meus sonhos e sem os quais certamente não seria possível nenhum passo da minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por essa existência, por ter me dado tão grande oportunidade de poder “abraçar” a profissão que sempre desejei, quando tantos outros não podem e por ter me feito forte e perseverante em meus objetivos.

Aos meus pais, pela vida, pelo amor, pelo apoio incondicional e formação moral, pelos valores repassados, indispensáveis a um profissional correto e também por compreenderem minhas frequentes ausências.

Ao meu irmão André pelo incentivo.

À FAPESP pela bolsa de estudos concedida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ciro Moraes Barros, pelo exemplo de ética na pesquisa e pela oportunidade de me orientar na execução deste trabalho de fundamental importância para o meu crescimento profissional.

Ao professor Roberto Sartori Filho pelas oportunidades oferecidas durante o mestrado, convivência enriquecedora e principalmente pelo empenho em viabilizar o experimento.

Ao professor Marcelo Marcondes Seneda, responsável pelos primeiros passos trilhados neste longo caminho. Especialmente pela amizade e pelos valiosos ensinamentos, não só no âmbito profissional, mas como ser humano.

Aos meus avôs Antônio, Lenira e João (*in memoriam*), mesmo em outro plano certamente acompanharam cada um dos meus passos, à avó Maria, aos meus tios e primos pelos momentos agradáveis e pelo carinho indispensável de sempre.

Aos amigos de pós-graduação de Botucatu e Piracicaba Fernanda Rosa, Rafael Satrapa, Eduardo Razza, Cíntia Fernandes, Janahi Ticianelli, Rafaela, Raquel Puelker, Vinícius Pinheiro, José Renato, Ronaldo Ereno, Marcelo Pegorer, Anthony Castilho, Midyan, Zé, Fernanda Zinsly, especialmente Camila Chavier e Monique Mendes Guardieiro pela amizade, e incentivo, vocês me mostraram o valor de uma verdadeira amizade e foram

fundamentais para que eu aqui estivesse. Obrigado por todas as trocas de informações e pela amizade sincera de todos vocês.

À grande companheira Maria Clara Costa Mattos, pelo apoio durante o experimento, sem você tudo teria se tornado mais difícil.

À Fazenda Figueira, da Fundação de Estudos Agrários “Luiz de Queiroz”, especialmente ao José Renato (Raí) e à Laísse, que auxiliaram na execução do experimento.

À todos os funcionários da fazenda: Sr. Antenor, Nino, Nardão, Diego e Vavá, por auxiliarem no manejo dos animais.

Aos estagiários que acompanharam e contribuíram para o desenvolvimento deste experimento: Henrique (Anhanguera), Ricardo (ESALQ) e Felipe “Maranhão” (UFG).

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu, em especial ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária e ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências, pela oportunidade de aprimoramento técnico, científico e acadêmico.

Aos professores das disciplinas que cursei ao longo do curso de mestrado pelos excepcionais ensinamentos e aos funcionários que durante os últimos anos me forneceram o suporte necessário para que pudesse concluir mais esta etapa.

Aos professores Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira e Dr^a Maria Denise Lopes pelas ricas contribuições no meu Exame Geral de Qualificação.

À professora Luzia Aparecida Trinca pela realização da análise estatística.

Por fim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que chegasse até aqui.

Minha eterna gratidão a todos vocês!

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Média (\pm EPM) do número de folículos maiores que 6 mm presentes no D9 do protocolo superestimulatório, taxa de ovulação 48 horas após a administração de LH (D11), número de corpos lúteos no momento da coleta de embriões, estruturas colhidas, embriões viáveis, taxa de viabilidade e número total de embriões viáveis em vacas Nelore (n=25) tratadas com os protocolos P-36 (controle), P-36/eCG, P-36/LH2 e P-36/LH4.....	36
Tabela 2 -	Número total de embriões classificados como G I, G II, G III de acordo com suas características morfológicas obtidos em vacas Nelore tratadas com P-36 (controle), P-36/eCG, P-36/LH2 e P-36/LH4.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Protocolo de superovulação conhecido como P-36.....	24
Figura 2 -	Tratamento superestimulatório (P-36) utilizado nas vacas Nelore do Grupo P-36 (controle).....	30
Figura 3 -	Tratamento superestimulatório utilizado nas vacas Nelore do Grupo P-36/eCG.....	31
Figura 4 -	Tratamento superestimulatório utilizado nas vacas Nelore dos Grupos P-36/LH2 e P-36/LH4.....	31
Figura 5 -	Taxas de prenhez obtidas após a transferência de embriões frescos, vitrificados e congelados produzidos em vacas Nelore tratadas com P-36 (controle), P-36/eCG, P-36/LH2 e P-36/LH4.....	37

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Foliculogênese e Dinâmica Folicular	17
2.2. Controle da dinâmica folicular e tratamentos superestimulatórios.	20
2.3. Indução da ovulação e Inseminação artificial em tempo fixo nas doadoras superestimuladas	22
2.4. Particularidades do Protocolo P-36	24
2.5. Uso da eCG ou LH como agente superovulatório	25
3. OBJETIVO	28
4. HIPÓTESES	28
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
5.1. Colheita e classificação de embriões	32
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
7. RESULTADOS.....	36
8. DISCUSSÃO	38
9. CONCLUSÃO.....	41
10. REFERÊNCIAS	42
11. ANEXO 1	56

LISTA DE ABREVIATURAS

BE = Benzoato de estradiol

CL = Corpo lúteo

eCG = Gonadotrofina coriônica equina

EPM = Erro padrão da média

FD = Folículo dominante

FSH = Hormônio folículo estimulante

GnRH = Hormônio liberador de gonadotrofinas

IA = Inseminação artificial

IATF = Inseminação artificial com tempo fixo

IM = Via intramuscular

LH = Hormônio luteinizante

mg = Miligramas

MHz = Mega hertz

ml = Mililitros

mm = Milímetros

PBS = Tampão fosfato salina

pFSH = hormônio folículo estimulante de pituitária suína

PGF_{2α} = Prostaglandina F_{2α}

pLH = hormônio luteinizante de pituitária suína

PMSG = Gonadotrofina sérica da égua prenhe ou Gonadotrofina coriônica equina

Primer[®] = Dispositivo intravaginal de liberação controlada de droga, para a espécie bovina

P4= Progesterona

TE = Transferência de embrião

TETF = Transferência de embriões em tempo fixo

UI = Unidade internacional

US = Ultrassom ou ultrassonografia

µg = microgramas

µL = microlitros

µm = micrômetro

OLIVEIRA, A.C.S. **Eficiência do protocolo superestimulatório P-36, associado à administração de eCG ou LH, em animais da raça Nelore.** Botucatu, 2011. 77p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Objetivou-se com o presente trabalho verificar em doadoras da raça Nelore, o uso de pLH em substituição à eCG, no último dia do tratamento superestimulatório P-36. Vinte e cinco vacas foram distribuídas em 4 grupos: P-36 (controle), P-36/eCG, P-36/LH2 e P-36/LH4. Todos os animais receberam os quatro tratamentos superovulatórios de forma alternada (“cross-over”). Em dia aleatório do ciclo estral (D0), as doadoras receberam um dispositivo intravaginal contendo 1,0 g de progesterona (DIV) e benzoato de estradiol (2 mg, via IM). No grupo controle, os animais foram superestimulados com pFSH (via IM, dose total = 133 mg) duas vezes ao dia em doses decrescentes do D5 ao D8, enquanto que no grupo P-36/eCG, P-36/LH2 e P-36/LH4 as duas últimas doses de FSH foram substituídas por eCG (totalizando 400 UI via IM) ou pLH (totalizando 2 mg e 4 mg, via IM), respectivamente. Todas as vacas foram tratadas com d-cloprostenol (150 µg, via IM) no dia 7, e o DIV foi removido 36 h após a administração do análogo da prostaglandina $F_{2\alpha}$. No dia 9, a ovulação foi induzida com 12,5 mg de pLH (via IM,) e as doadoras foram inseminadas em tempo fixo 12 e 24 h após a aplicação de pLH. A coleta de embriões foi realizada no dia 16. Os dados foram analisados por ANOVA considerando vaca como efeito aleatório (Proc Mixed do SAS), após transformação da variável resposta quando necessário. Observou-se diferença no número de CL quando comparado o grupo eCG (19,2±2,4) com os grupos LH2 (12,7±2,0) e LH4 (12,3±1,5; $p<0,05$). Além disso, a taxa de ovulação tendeu a ser menor quando comparados os grupos LH2 e eCG (50,6 e 67,8%, respectivamente; $p=0,06$). Entretanto, não houve diferença significativa ($p>0,05$) no número de embriões viáveis entre os grupos P-36 (3,3±0,7), P-36/eCG (4,5±0,5), P-36/LH2 (3,7±0,8) e P-36/LH4 (4,2±1,0). Conclui-se que a substituição de eCG por pLH no último

dia do tratamento superestimulatório pode ser realizada sem alterar significativamente a produção de embriões viáveis.

Palavras-chave: FSH, LH, eCG, transferências de embriões, superovulação, Nelore, *Bos indicus*.

OLIVEIRA, A.C.S. **Efficiency of P-36 protocol associated with eCG or LH administration in the last day of superestimulatory treatment in Nelore cows.** Botucatu, 2011. 77p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the use of pLH in replacement of eCG on the last day of P-36 superstimulatory treatment in Nelore donors. Twenty-five Nelore cows were randomly allocated in four groups: P-36 (Control), P-36/eCG, P-36/LH2, and P-36/LH4. All animals underwent four treatments in a crossover design. At a random stage of the estrous cycle (D0), donors received an intravaginal device (IVD) containing 1.0 g of progesterone and estradiol benzoate (2.0 mg, i.m.). Control group cows were superstimulated with decreasing doses of pFSH (133 mg, i.m.). In P-36/eCG, P-36/LH2 and P-36/LH4 the last two doses of pFSH were replaced by 2 doses of eCG (200 IU each dose, i.m.) or pLH, (1 and 2 mg each dose, i.m) respectively. All animals were treated with PGF_{2α} (150 µg d-cloprostenol) on D7, and the IVD was removed after 36 h. Ovulation was induced with 12.5 mg of pLH (i.m.) on D9 and all animals received fixed-time artificial insemination (FTAI) 12 and 24 h after pLH. Embryo flushing was performed on D16. Data were analyzed by ANOVA (Proc Mixed, SAS). There was a significant difference in the number of CL in eCG group (19.2±2.4) when compared to LH2 (12.7±2.0) and LH4 groups (12.3±1.5; p<0.05). Moreover, there was a tendency of lower ovulation rate in LH2 when compared to eCG group (50.6 and 67.8%, respectively; p=0.06). However there was no difference in viable embryo yield among groups P-36 (3.3±0.7), P-36/eCG (4.5±0.5), P-36/LH2 (3.7±0.8) and P-36/LH4 (4.2±1.0); P>0.05. In conclusion eCG can be replaced by pLH, in the last day of P-36 protocol, without affecting the production of viable embryos in Nelore cows.

Keywords: FSH, LH, eCG, embryo transfer, superovulation, Nelore, *Bos indicus*.

1. INTRODUÇÃO

O agronegócio brasileiro destaca-se por contribuir com 23,1% do produto interno bruto (PIB) do país (CEPEA, 2010). A pecuária bovina insere-se neste contexto por possuir o maior rebanho comercial do mundo. Dentre as raças de corte, a Nelore (*Bos indicus*) é a que possui o maior contingente numérico (acima de 100 milhões de cabeças, ACBN, 2008)

Em decorrência da facilidade de adaptação ao ambiente tropical, os zebuínos, predominam não só no Brasil como em muitos países do hemisfério sul, contrastando com o hemisfério norte, onde prevalecem as raças europeias (*Bos taurus*).

A demanda crescente por animais de elevado mérito genético tem impulsionado o uso de técnicas avançadas de biotecnologia, notadamente aquelas associadas à reprodução. A indução de ovulação múltipla (superovulação) para a produção e transferência de embriões (TE) insere-se como uma das biotecnologias mais importantes para acelerar o melhoramento genético do rebanho. Sendo assim a utilização dessas biotécnicas tem sido amplamente difundida, a fim de aperfeiçoar as linhagens populacionais já existentes, tendo como principal objetivo, obter o máximo número de embriões com altas taxas de prenhez (Mapletoft e Pierson, 1993). Todavia, há uma variação individual na resposta ao tratamento superestimulatório com gonadotrofinas pelas doadoras de embriões, esta variabilidade na resposta ovariana continua a ser um dos maiores entraves nos programas comerciais de TE (Armstrong, 1993; Boland e Roche, 1993; Adams, 1994; Barros e Nogueira, 2001), apesar das diversas pesquisas realizadas nesta área (Callesen et al., 1987; Del Campo et al., 1990; Hytell et al., 1991; Stock et al., 1996; Nogueira et al., 2002).

Com o advento da ultrassonografia e o conhecimento da dinâmica folicular dos bovinos (Savio et al., 1988; Sirois e Fortune, 1988; Ginther et al., 1989), tornou-se possível o desenvolvimento de tratamentos hormonais capazes de regular o crescimento folicular e o momento da ovulação, viabilizando a IA com tempo fixo (IATF) (Barros et al., 1998). Similarmente, o desenvolvimento

folicular e o momento da ovulação podem ser controlados farmacologicamente para melhorar os tratamentos superovulatórios empregados na TE (Barros e Nogueira, 2001; Nogueira et al., 2002; Baruselli et al., 2006; Barros et al., 2010).

Dentre os tratamentos superovulatórios utilizados, Barros e Nogueira (2001) desenvolveram um protocolo no qual a fonte de progesterona é mantida por 36 horas após a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (daí a denominação P-36) e a ovulação é induzida com LH exógeno, administrado 12 horas mais tarde. Graças à administração exógena de LH é possível controlar o momento da ovulação, que ocorre entre 24 e 36 horas após a injeção de LH (Nogueira e Barros, 2003). Consequentemente, a IA é realizada em tempo fixo (IATF) 12 e 24 horas após a aplicação de LH, dispensando a detecção do cio das doadoras.

Entretanto, a utilização do protocolo P-36 em raças europeias diminui o número de embriões viáveis quando comparado a protocolos convencionais com observação do estro. Esta observação motivou ajustes no mesmo, a fim de torná-lo eficaz também, em raças europeias. Nas raças Holandesa (Martins et al., 2005) e Angus (Chesta et al., 2007) o protocolo P-36 se mostrou mais eficaz quando o agente indutor da ovulação (LH ou GnRH), foi aplicado 60 horas (P36/LH60), ao invés de 48 horas (P36/LH48), após a administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$. De forma similar, resultados obtidos por Barcelos et al. (2006), na raça Bonsmara ($\frac{5}{8}$ Africâner e $\frac{3}{8}$ Hereford e Shorthorn) indicam que a aplicação de pLH 60 h após a $\text{PGF}_{2\alpha}$, pode ser vantajosa também para esta raça. Além disso, estes autores testaram outra modificação no protocolo P-36, ou seja, substituíram as duas últimas doses de pFSH por uma única aplicação de eCG (200 UI) para estimular tanto o crescimento final (após a fase de divergência) quanto à maturação dos folículos ovarianos (atividade LH da eCG). Apesar de não haver diferença entre os tratamentos, os resultados promissores estimularam novos experimentos com a eCG na raça Nelore.

Barcelos et al. (2007) testaram, em vacas da raça Nelore, se a substituição do pFSH por eCG (2 doses 200UI), no último dia do tratamento superestimulatório, aumentaria o crescimento folicular, a taxa de ovulação e a

produção de embriões. Tanto o número de folículos com diâmetro superior a 6 mm presentes no momento da administração de pLH, quanto o número de estruturas totais colhidas foram superiores ($p < 0,03$) nos animais que receberam eCG. Apesar de não ter ocorrido aumento significativo na média de embriões viáveis nas vacas tratadas com eCG ($7,30 \pm 1,20$) quando comparadas às que não receberam esta gonadotrofina ($5,10 \pm 1,10$), o número total de embriões viáveis produzidos pelas vacas tratadas com o protocolo foi de 146 e 102, respectivamente para os protocolos P-36/eCG e P-36/LH48, sugerindo desta forma a vantagem de se substituir as duas últimas doses de pFSH por eCG.

Todavia, há diminuição na resposta superovulatória e produção de embriões viáveis após a terceira aplicação consecutiva de 2000 UI de eCG, (Baruselli et al., 2008).

Levando-se em consideração os resultados favoráveis do uso da eCG no protocolo P-36 e a possibilidade de formação de anticorpos contra esta gonadotrofina, a substituição da eCG pelo pLH, no último dia do tratamento superestimulatório pode promover aumento na produção de embriões viáveis sem que haja formação de anticorpos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Foliculogênese e Dinâmica Folicular

A foliculogênese bovina é um processo contínuo de crescimento e atresia dos folículos ovarianos (Matton et al., 1981; Woolums e Peter, 1994), que se inicia na vida fetal com a migração das células germinativas primordiais para as gônadas em formação, passa pela puberdade (Evans et al., 1994) e continua na vida reprodutiva até a senilidade (Hafez, 1993).

Os folículos encontrados nos ovários de uma fêmea pré-púbere podem ser classificados em: primordiais em repouso (primário), pré-antrais em crescimento (secundário), antrais em maturação (terciários) e folículo pré-ovulatório (Woolums e Peter, 1994). Em bovinos, são necessários cerca de três meses para que os folículos pré-antrais (primordial) cresçam até o estágio de folículo pré-ovulatório (Webb et al., 2003).

O início do crescimento folicular (ativação) inicia-se com a transformação das células planas da pré-granulosa do folículo primordial em uma única camada de células da granulosa cubóides, formando o folículo primário. O folículo secundário surge a partir da proliferação das células da granulosa em duas a seis camadas ao redor do oócito. Ambos são folículos pré-antrais. O passo seguinte da foliculogênese é a formação do antro, a partir da secreção de fluido folicular pelas células da granulosa (Lussier et al., 1987; Braw-tal et al., 2005).

O fluido folicular é um meio de suporte nutricional e de desenvolvimento do ovócito, bem como um veículo no qual o ovócito é transportado para a tuba uterina durante a ovulação (Woolums e Peter, 1994). O fluido é rico em glicoproteínas como a inibina (inibe a secreção de FSH e o crescimento de folículos subordinados) (Dekhester e Robertson, 1989; Rice, 1991), a folistatina (suprime a liberação de FSH e se liga à ativina bloqueando sua atividade) e a ativina (estimula a síntese e/ou a liberação do FSH), (Knight, 1996).

O processo contínuo de crescimento e regressão dos folículos antrais ovarianos que induz o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório é conhecido como dinâmica de crescimento folicular, enquanto que o padrão de crescimento e atresia de um grupo de folículos ovarianos é denominado onda

de crescimento folicular (Lucy et al., 1992). O crescimento folicular em padrão de ondas ocorre em vários estágios da vida reprodutiva, como no período anterior à puberdade (6 a 8 meses de idade, Adams et al., 1992; Evans et al., 1994), durante o ciclo estral, a gestação (Ginther et al., 1996b) e no pós-parto (Murphy et al., 1990; Savio et al., 1990a, b).

A dinâmica de crescimento folicular dos bovinos é caracterizada pela presença de duas ou três ondas de crescimento folicular (Savio et al., 1988; Sirois e Fortune, 1988; Ginther et al., 1989; Figueiredo et al., 1997; Viana et al., 2000; Sartorelli et al., 2005; Castilho et al., 2007; Gimenes et al., 2008) e esporadicamente, uma ou quatro ondas (Savio et al., 1988; Sirois e Fortune, 1988; Murphy et al., 1990; Viana et al., 2000).

A emergência da onda folicular consiste no recrutamento simultâneo de um grupo de folículos com diâmetro aproximado de 4 a 5 mm (Ginther et al., 1996a), estimulados por um aumento transitório do FSH (Fortune, 1993). Mais recentemente, com o avanço na qualidade dos aparelhos de ultrassonografia acoplados a transdutores de 9,0 MHz, foi possível a visualização de folículos com diâmetro a partir de 1,0 mm (Jaiswal et al., 2004; Ereno, 2008). Além disso, pode-se observar a emergência da onda folicular cerca de 12 horas antes da ovulação (Ereno, 2008) ou 48 horas antes do surgimento de folículos de 4 mm (Jaiswal et al., 2004).

Aproximadamente três dias após a emergência folicular (folículos com 4 a 5 mm), quando o maior folículo atinge o diâmetro médio de 8,5 mm para *Bos taurus* (Ginther et al., 1996a), ocorre o evento denominado desvio folicular, momento em que ocorre diferença na taxa de crescimento entre os dois maiores folículos da onda (Ginther et al., 1996a, 1997).

Do ponto de vista ultrassonográfico, pode-se definir a seleção pelo momento do “desvio” folicular. Os mecanismos de seleção são controversos, mas provavelmente o folículo selecionado apresenta mais precocemente a capacidade de responder ao estímulo promovido pelo LH (Driancourt, 2001; Sartori et al., 2001). Em resposta ao LH o folículo selecionado continua a crescer e sua capacidade de produzir estradiol e inibina aumenta. Desta forma,

o folículo selecionado exerce “dominância” sobre os demais folículos, ou seja, inibe o crescimento dos outros folículos ovarianos (Karsh et al., 1997).

Apesar do mecanismo preciso para a seleção do folículo dominante ainda não estar completamente elucidado, sabe-se que durante este evento além do possível papel do LH e seus receptores estão também envolvidos os fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFs), que parecem desempenhar papel importante neste processo (Fortune et al., 2004). Embora não se tenha encontrado diferenças nas concentrações de IGF total de folículos dominantes em relação aos subordinados (De La Sota et al., 1996), a concentração de IGF-I livre foi maior no fluido folicular do maior folículo comparado ao segundo maior da mesma onda, mesmo antes da observação de diferenças no diâmetro e na concentração de estradiol (Beg et al., 2002). Essas observações sugerem a existência de um sistema modulador da disponibilidade de IGF intrafolicular, diferencialmente regulado em folículos dominantes e subordinados, o que permitiria ao maior folículo ter uma dominância bioquímica antes do estabelecimento da dominância morfológica (Fortune et al., 2004).

Austin et al. (2001) propuseram que as primeiras mudanças intrafoliculares que distinguem o folículo destinado a tornar-se dominante dos outros folículos da população em crescimento, seria a capacidade aumentada em produzir estradiol e a manutenção de baixos níveis de IGFBPs. O aumento nas concentrações intrafoliculares de estradiol, bem como os de ativina A e a diminuição dos níveis de IGFBP-2 e 4 estão relacionados à dominância folicular (Ginther et al., 2002; Kojima et al., 2003).

Na presença de um corpo lúteo (CL) funcional e de altas concentrações plasmáticas de progesterona, há decréscimo na frequência de pulsos de LH (Roberson et al., 1989). Consequentemente, o folículo dominante sofre atresia e falha em ovular (Ginther et al., 1989; Lucy et al., 1992; Stock e Fortune, 1993).

Em determinado momento do ciclo estral (17 a 20 dias após a ovulação) o CL sofre regressão morfológica e funcional causada pela liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ proveniente do endométrio (Horton e Poyser, 1975). Este processo,

denominado luteólise, é caracterizado pela queda na produção de P4 e fragmentação dos componentes celulares, incluindo a redução do suporte vascular, a proliferação do tecido conjuntivo, a desorganização celular, a degeneração e a fagocitose das células luteais (Milvae et al., 1996). Como resultado, ocorre queda nas concentrações plasmáticas de progesterona (<1 ng/mL), permitindo o aumento na pulsatilidade de LH e conseqüentemente promovendo o pico pré ovulatório de LH ovulação do folículo dominante.

2.2. Controle da dinâmica folicular e tratamentos superestimulatórios

Segundo Adams et al. (1994), aproximadamente 20 a 30 folículos de 3 a 4 mm de diâmetro emergem em cada onda folicular em fêmeas taurinas e boa parte desses folículos tem o potencial de atingir o estágio pré-ovulatório, fato esse que pode ser demonstrado pela possibilidade de estimular o crescimento e a ovulação de vários folículos através da administração de gonadotrofinas. Ao passo que, em fêmeas zebuínas, a emergência de uma onda folicular conta com aproximadamente 45 folículos de 3 a 4 mm de diâmetro (Buratini et al., 2000). No entanto, não se sabe se as fêmeas *Bos indicus* têm maior população folicular, ou se apresentam maior quantidade de folículos recrutados por onda (Wolfenson et al., 2004).

Essa característica tem influência direta na eficiência das técnicas de transferência de embriões e aspiração folicular, indicando vantagem de fêmeas zebuínas sobre taurinas. Além disso, há alta repetibilidade (0,90) no número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular, durante a vida reprodutiva da fêmea (Boni et al., 1997; Burns et al., 2005).

Vacas com maior quantidade de folículos emergentes apresentam oócitos de melhor qualidade, vida reprodutiva mais longa e maior fertilidade. Essas fêmeas quando tratadas com protocolos superovulatórios, geram maior porcentagem de embriões transferíveis em relação às fêmeas com menor quantidade de folículos recrutados (Ireland et al., 2007).

Diversos tratamentos capazes de promover a ovulação múltipla (superovulação) foram propostos (Gordon, 1996; Barros e Nogueira, 2001;

Baruselli et al., 2006; Barros et al., 2010). Dentre os fármacos testados destacam-se a gonadotrofina coriônica equina (eCG) administrada isoladamente (Rowson et al., 1972; Elsdén et al., 1976; Boland et al., 1978) ou associada ao soro anti-PMSG (Dieleman et al., 1987; Alfuraiji et al., 1993; Gonzalez et al., 1994) e o hormônio folículo estimulante (FSH) proveniente de extrato de pituitárias de suínos, ovinos e equinos (Donaldson, 1989) ou ainda, FSH recombinante bovino (Looney e Bondioli, 1988; Bellows et al., 1991; Wilson et al., 1993).

Devido à função de estimular o crescimento folicular ovariano, desempenhada pelo hormônio FSH, a utilização deste como agente indutor de superovulação foi amplamente pesquisada. Esses estudos envolveram dose, eficiência de produtos comerciais e diferenças na proporção FSH:LH das várias apresentações comerciais (Donaldson e Ward, 1987; Donaldson, 1990). Os trabalhos evidenciaram a diferença de potência do FSH (Braileanu et al., 1998) e a variação da relação FSH:LH existente não só entre diferentes produtos comerciais, como também no mesmo produto.

Altas concentrações de LH promovem um efeito negativo relacionado à qualidade e produção embrionária bovina, demonstrado por Donaldson et al. (1986), Gonzalez et al. (1990) e Mapletoft et al. (1993). A partir desses trabalhos foi sugerido que o máximo de contaminação de LH no FSH não ultrapasse 20%.

A produção embrionária também pode ser influenciada diante da presença de um folículo dominante no início do tratamento superestimulatório (Guibault et al., 1991; Lussier et al., 1995). A fim de evitar o folículo dominante no início dos tratamentos, algumas estratégias foram desenvolvidas como, por exemplo, começar a superestimulação com FSH no primeiro dia do ciclo estral (Goulding et al., 1990; Roberts et al., 1994; Stock et al., 1996), aspirar o folículo dominante ou todos os folículos acima de 5 mm de diâmetro antes da superestimulação com gonadotrofinas (Bergfelt et al., 1994; Bodensteiner et al., 1996; Hill e Kuehner, 1996) e sincronizar o início das ondas foliculares (Bó et al., 1995, 2003).

O uso de dispositivos intravaginais liberadores de progesterona (DIV) é uma das principais estratégias utilizadas para promover a sincronização da emergência da onda folicular em taurinos e zebuínos. Uma série de trabalhos publicados por R. J. Mapletoft e G. A. Bó (revisto por Bó et al., 1995, 2003) caracterizaram o uso de dispositivos intravaginais à base de P4 associados à administração de estrógenos (estradiol 17- β ou benzoato de estradiol) como agentes promotores da atresia folicular e conseqüentemente, capazes de originar uma nova onda folicular, cerca de 3 a 4 dias após o início dos tratamentos. A fim de evitar a presença de um folículo dominante o tratamento superestimulatório com FSH começa concomitantemente com a nova onda folicular, ou seja, 4 ou 5 dias após a colocação do dispositivo intravaginal e aplicação de estrógeno. Dois dias após a primeira aplicação de FSH, é administrada uma dose luteolítica de PGF_{2 α} e 12 horas mais tarde o dispositivo intravaginal é removido (P-12). As doadoras são inseminadas artificialmente 12 e 24 horas após a detecção do cio. Seis a sete dias mais tarde os embriões são colhidos, classificados e inovulados ou ainda criopreservados. Como atrativos este protocolo apresenta a possibilidade de ser iniciado aleatoriamente em relação ao ciclo estral e ainda dispensa a observação do cio base. Porém, traz a inconveniência da detecção do estro para a inseminação artificial das doadoras.

2.3. Indução da ovulação e Inseminação artificial em tempo fixo nas doadoras superestimuladas

A detecção do estro é um dos maiores entraves nos programas de coleta e transferência de embriões. Em função dessa inconveniência, muitos foram os estudos desenvolvidos na tentativa de permitir a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em fêmeas bovinas submetidas à superovulação (Barros e Nogueira, 2001 e 2005; Baruselli et al., 2006; Barros et al., 2010). Ademais, sugeriu-se que folículos não ovulados, após a superestimulação farmacológica, provavelmente apresentavam desenvolvimento anormal, ou ainda insuficiência na quantidade de receptores de LH, dessa forma seriam incapazes de responder ao pico pré-ovulatório de LH (Xu et al., 1995; D'Occhio et al., 1997;

Liu et al., 1998). Por esse motivo promover o atraso do pico pré-ovulatório de LH poderia ampliar o número de embriões obtidos (D'Occhio et al., 1997; Van De Leemput et al., 2001).

Tendo como base trabalhos desenvolvidos por pesquisadores holandeses (Vos et al., 1994; Vos et al., 1995; Van De Leemput et al., 2001) e australianos (D'Occhio et al., 1997), Barros e Nogueira (2001) testaram a eficácia de protocolos, nos quais o momento esperado da ovulação era atrasado por 6 a 12 horas e a ovulação era induzida pela administração de LH ou GnRH (Barros e Nogueira, 2001; Nogueira et al., 2002). Estes protocolos não aumentaram significativamente o número de embriões viáveis quando comparados a protocolos com detecção do estro. Contudo, esses novos trabalhos forneceram informações importantes, que permitiram o controle do momento da ovulação e a utilização da IATF e ainda a manutenção de níveis plasmáticos médios (ao redor de 1,5 a 2,5 ng/mL) de progesterona após a última aplicação de FSH. A manutenção dos níveis de progesterona elevados poderia ser prejudicial ao desenvolvimento embrionário, se mantida durante tempo prolongado (Barros e Nogueira, 2001; Melo et al., 2004).

Baseado nos dados obtidos a partir desses estudos foi desenvolvido um protocolo no qual a fonte de progesterona é mantida por até 36 horas após a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Por esse motivo recebeu a denominação P-36 (Barros e Nogueira, 2001) e a ovulação é induzida com LH exógeno, administrado 12 horas mais tarde (ou seja, 48 horas após a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$); Fig. 1. Devido à administração exógena de LH é possível controlar o momento da ovulação, que ocorre entre 24 e 36 horas após a injeção de pLH (Nogueira e Barros, 2003). Conseqüentemente, a IATF 12 e 24 horas após aplicação de LH, dispensando a detecção do cio das doadoras.

A diminuição da dose de 25 para 12,5 mg de pLH em vacas Nelore não altera significativamente o número de embriões viáveis ($9,8 \pm 1,09$, e $9,2 \pm 0,77$, respectivamente) ou a taxa de viabilidade (73,7 e 69,5%, respectivamente; Nogueira et al., 2002; Nogueira e Barros, 2003). Outrossim, é possível utilizar-se de diversas fontes exógenas de progesterona sem que

haja alterações na produção de embriões (Barros e Nogueira, 2005; Baruselli et al., 2006, Nogueira e Barros, 2006).

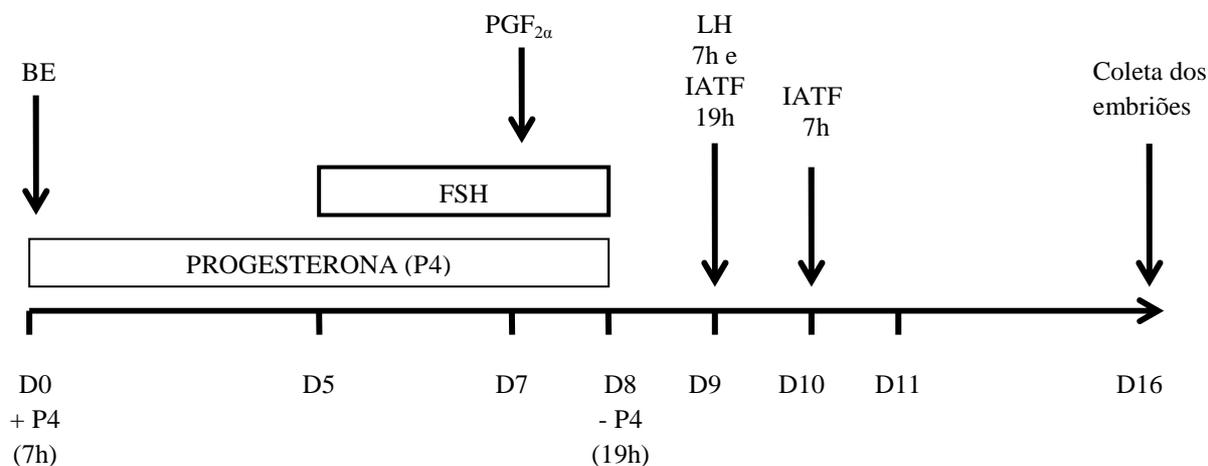


Figura 1: Protocolo de superestimulação ovariana e SOV conhecido como P-36, com a retirada do implante de progesterona no dia 7 à tarde, Barros e Nogueira (2001).

2.4. Particularidades do Protocolo P-36

Em várias publicações o protocolo P-36 tem sido apontado como eficaz em animais da raça Nelore (Barros e Nogueira, 2001; Barros e Nogueira, 2005; Baruselli et al., 2006, Nogueira et al., 2007a). Em 2007(a), Nogueira e colaboradores relataram em 136 coletas a média de $13,3 \pm 0,75$ estruturas totais e $9,4 \pm 0,63$ embriões viáveis, com 71,0% (1279/1807) de viabilidade, em doadoras da raça Nelore tratadas com o protocolo P-36. Todavia, quando doadoras taurinas (*Bos taurus*) são submetidas a este protocolo, o número de estruturas totais tem sido insatisfatório (Baruselli et al., 2006). Estes resultados podem ser atribuídos às particularidades fisiológicas que diferenciam vacas *Bos taurus* e *Bos indicus*. Dentre elas, o diâmetro folicular, sendo que fêmeas *Bos taurus* atingem a fase de desvio folicular com diâmetro superior ao de fêmeas *Bos indicus* (8,5 mm para *Bos taurus*; Ginther et al., 1996a e 6,1 mm para *Bos indicus*; Sartorelli et al., 2005). Deste modo supõe-se que os folículos de fêmeas taurinas, para atingirem capacidade ovulatória, necessitem alcançar diâmetros maiores do que as fêmeas zebuínas.

De fato Sartori et al. (2001) verificaram que fêmeas *Bos taurus* ovulam à administração de LH somente folículos com diâmetro acima de 10 mm ao passo que Gimenes et al. (2008) e Simões et al. (2010) observaram que fêmeas *Bos indicus* apresentaram capacidade ovulatória com folículos de diâmetro em torno de 8 mm, sendo que, a capacidade ovulatória está relacionada ao aumento do diâmetro folicular e expressão de receptores de LH nas células da granulosa (Simões et al., 2010). Desta forma, protocolos nos quais, a administração do indutor da ovulação (pLH) é atrasada 12 horas (P-36/LH60), talvez por disponibilizar maior tempo para que os folículos atinjam diâmetros condizentes com a capacidade ovulatória, são mais efetivos em fêmeas taurinas do que o protocolo P-36/LH48 (Martins et al., 2005).

Esta hipótese motivou alterações no protocolo P-36, tanto na raça Holandesa (Martins et al., 2005) quanto na Angus (Chesta et al., 2007, Rosa, 2010). O protocolo P-36 se mostrou mais eficaz quando o agente indutor da ovulação (LH ou GnRH), foi aplicado 60 horas (P36/LH60), ao invés de 48 horas (P36/LH48), após a administração de PGF_{2α}. De forma similar, resultados obtidos por Barcelos et al. (2006), na raça Bonsmara ($\frac{5}{8}$ Africâner e $\frac{3}{8}$ Hereford e Shorthorn) indicam que a aplicação de pLH 60 h após a PGF_{2α}, pode ser vantajosa também para esta raça.

2.5. Uso da eCG ou LH como promotores da maturação folicular

Várias publicações destacam o uso da gonadotrofina coriônica da égua prenhe (eCG) como agente superovulatório (Rowson et al., 1972; Elsden et al., 1976; Boland et al., 1978). Produzida pelos cálices endometriais da égua prenhe entre os dias 40° a 120° de gestação (Combar nous, 1992), quando administrada em outras espécies a eCG pode exercer atividade tanto de FSH como de LH. Nos bovinos essa gonadotrofina apresenta longo tempo de ação, variando de 50 a 100 horas, devido à proporção de ácido siálico (10 a 15%) presente em sua molécula (Schams et al., 1978).

Em função da longa meia-vida, essa gonadotrofina persiste por até 10 dias na circulação das fêmeas bovinas, dessa forma pode ser administrada

normalmente em uma única aplicação para promover a superestimulação (Dieleman et al., 1993). Enquanto que a meia vida do FSH na vaca foi estimada em 5 horas ou menos, por isso deve ser aplicada duas vezes ao dia, durante 4 dias, para induzir superovulação (Monniaux et al., 1983). A meia vida longa da eCG pode provocar uma estimulação contínua dos ovários, folículos anovulatórios, perfis endócrinos anormais e redução da qualidade embrionária (Saumande et al., 1978; Mikel-Jenson et al., 1982; Moor et al., 1984). Entretanto, o uso da eCG em dose única, (2000 UI) após a sincronização do início da onda folicular com progesterona e benzoato de estradiol, originou um número semelhante de embriões viáveis e congeláveis quando comparado ao grupo que recebeu 8 aplicações de FSH em doses decrescentes (Martins et al., 2006).

Doadoras superestimuladas com FSH apresentam atraso na maturação citoplasmática do oócito, prejudicando a fertilização e diminuindo as taxas de prenhez (Greve et al., 1995). Price et al. (1999) relataram que durante o tratamento superestimulatório com FSH ocorre diminuição nos pulsos de LH, essenciais para o crescimento final dos folículos e maturação dos oócitos. Com o objetivo de melhorar a resposta superestimulatória das doadoras de embriões *B. indicus*, alguns estudos preconizaram alterações no protocolo superestimulatório à base de gonadotrofinas, como a substituição de FSH por eCG no final do protocolo, com a finalidade aumentar o crescimento folicular, a taxa de ovulação e a produção embrionária.

Barcelos et al., (2007) testaram se a substituição do pFSH por eCG, no último dia do tratamento superestimulatório, aumentaria o crescimento folicular, a taxa de ovulação e a produção de embriões, doadoras da raça Nelore (n = 20) foram divididas ao acaso em dois grupos: P-36 e P-36/eCG. Cada fêmea recebeu os dois tratamentos de forma alternada (cross-over). Nas vacas do grupo P-36/eCG as duas últimas aplicações de pFSH foram substituídas por duas doses de 200 UI da eCG (total de 400 UI IM). Os autores observaram melhora na resposta superestimulatória (folículos ≥ 6 mm no momento da indução da ovulação) dos animais tratados com FSH-p/eCG em relação aos animais tratados apenas com FSH ($21,05 \pm 2,76$ vs. $15,25 \pm 2,06$; $p < 0,01$;

respectivamente). O número total de estruturas colhidas, também, foi maior no grupo P-36/eCG ($10,0 \pm 1,48$ vs. $6,65 \pm 1,18$; $p \leq 0,03$). Estes dados são indicativos de que a eCG estimulou o crescimento folicular final, resultando em maior número de folículos capazes de ovular em resposta a administração exógena de LH e conseqüentemente, aumentou o número total de estruturas recuperadas. Apesar da média de embriões viáveis nas vacas tratadas com eCG não ter diferido, o número total de embriões viáveis produzidos pelas vacas tratadas com o protocolo P-36/eCG (146) vs P-36 (102) evidencia a vantagem de se substituir as duas últimas doses de pFSH por eCG.

Resultados positivos também foram obtidos na raça Brangus, onde o protocolo P-36/eCG melhorou a quantidade de embriões viáveis ($10,9 \pm 1,5$) quando comparado ao protocolo P-36 ($7,1 \pm 1,4$; Reano et al., 2009). Porém, Sartori et al. 2008 não observaram aumento na produção de embriões ao compararem o protocolo P-24/eCG ($3,7 \pm 0,5$ embriões viáveis) com o P-24 ($4,9 \pm 0,7$) em novilhas Nelore. Já na raça Sindi (*Bos indicus*), os mesmos autores verificaram que a adição de eCG no protocolo P-36 aumentou o número de embriões viáveis ($6,5 \pm 1,2$ vs $2,4 \pm 0,7$; $p < 0,01$, Mattos et al., 2010). Estes resultados indicam que a adição de eCG ao protocolo P-36 parece ser vantajosa, porém o seu uso no protocolo P-24 precisa ser melhor estudado. A diferença entre estes protocolos é que no P-24 a fonte de progesterona é retirada 12 horas antes, em relação ao P-36 e, conseqüentemente, pode permitir uma liberação precoce de LH que poderia adiantar a maturação oocitária e prejudicar a fertilização após a IATF.

Entretanto, Baruselli et al. (2008) demonstraram uma diminuição na resposta superovulatória após a terceira aplicação consecutiva de 2.000 UI de eCG, devido, provavelmente, à produção de anticorpos anti-eCG. Em cabras, já foi demonstrada a presença desses anticorpos após a utilização da eCG em protocolos de IATF, com diminuição na fertilidade após a IA (Roy et al., 1999).

3. OBJETIVO

Objetivou-se com o presente trabalho testar a substituição da eCG pelo LH no último dia do tratamento superestimulatório em vacas da raça Nelore, sem comprometer a produção de embriões viáveis.

4. HIPÓTESE TESTADA

A eCG pode ser substituída por pLH, no último dia do tratamento superestimulatório, sem prejudicar a produção de embriões viáveis.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Fazenda Figueira, pertencente à Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz – FEALQ, no distrito de Paiquerê, município de Londrina, estado do Paraná (latitude 23°33' S, longitude 50°58' O, altitude 622 m). As doadoras da raça Nelore com escore de condição corporal 3,0 a 4,0 (escala de 1 a 5; Lowman et al., 1976), foram mantidas em pastagem capim Tanzania (*Panicum maximum*) e estrela branca (*Cynodon plectostachyus*), mineralização adequada e água à vontade. Durante o período de Outubro de 2009 a Fevereiro de 2010.

As vacas (n = 25) foram distribuídas aleatoriamente em 4 grupos: Controle (P36/FSH), P-36/eCG, P-36/LH2 e P-36/LH4. Posteriormente os animais foram trocados de grupo de maneira que todas as doadoras fossem submetidas aos quatro tratamentos (cross-over). Cada período em que a doadora recebeu um tratamento obteve a denominação de rodada.

Em dia aleatório do ciclo estral, denominado dia zero (D0), as 25 vacas foram avaliadas com ultrassom para verificar a condição ovariana (população de folículos, presença de corpo lúteo (CL) e ocorrência de cisto folicular e receberam um dispositivo intravaginal contendo progesterona (1 g, Primer[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil) e administração de 2 mg de benzoato de estradiol (BE, via IM, Estrogin[®]; Farmavet, São Paulo, Brasil). Cinco dias mais tarde (D5) foi iniciado o tratamento superestimulatório (FSH, 133 mg, Folltropin-V[®], IM, Bioniche Animal Health, Ontário, Canadá), 2 vezes ao dia, durante 4 dias consecutivos (40, 30, 20 e 10% da dose total, respectivamente).

No dia sete (D7) às 7 h foi administrada uma dose luteolítica de um análogo da PGF_{2α} (150 µg de d-cloprostenol, via IM, Prolise[®], ARSA S.R.L., Buenos Aires, Argentina). Trinta e seis horas após a aplicação de PGF_{2α} (D8 às 19 h), o dispositivo intravaginal contendo progesterona foi removido. A indução da ovulação foi realizada através da administração de LH (Lutropin[®], 12,5 mg, via IM, Bioniche Animal Health, Ontário, Canadá) no dia nove (D9) às 19 h, ou seja, quarenta e oito horas após a aplicação do análogo da PGF_{2α}. Os animais

foram inseminados artificialmente em tempo fixo (IATF), sem a observação de cio, 12 e 24 horas após a aplicação de LH (Figura 2).

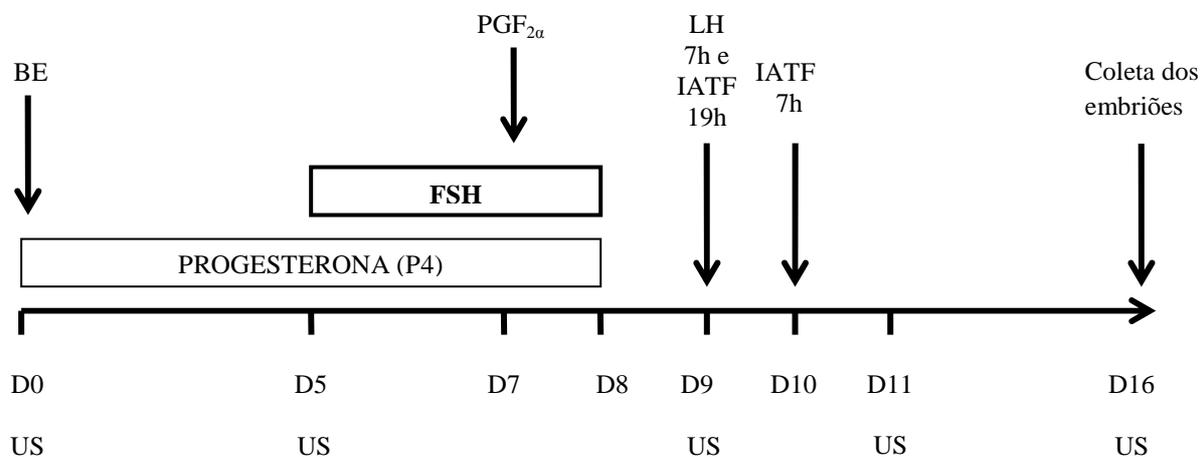


Figura 2: Tratamento superestimulatório ovariano e SOV (P-36) utilizado nas vacas da raça Nelore do Grupo P-36 (controle). BE = benzoato de estradiol; US = ultrassom; FSH = hormônio folículo estimulante; $PGF_{2\alpha}$ = prostaglandina; LH = hormônio luteinizante; IATF = inseminação artificial em tempo fixo.

Foi utilizado sêmen de oito touros da raça Nelore e as inseminações foram realizadas por três técnicos experientes. A morfologia e motilidade foram avaliadas (Barth et al., 1989), em todas as rodadas as doadoras receberam sêmen do mesmo touro.

Os animais do grupo P-36/eCG foram tratados de forma semelhante aos do grupo controle, porém as duas últimas doses de FSH foram substituídas por duas doses de gonadotrofina coriônica equina contendo 200UI (eCG, totalizando 400 UI via IM, Folligon[®], Intervet International B.V., Holanda, Figura 3).

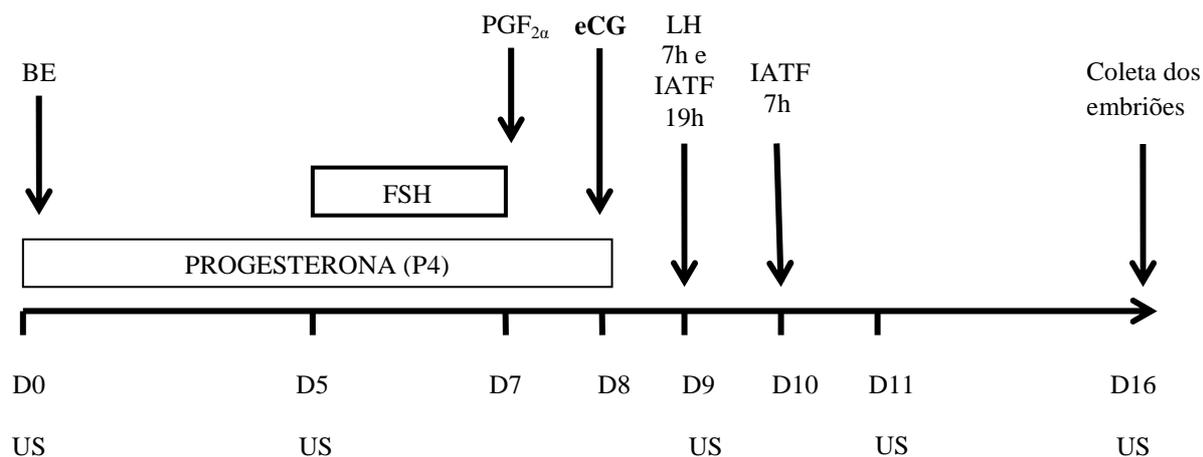


Figura 3: Tratamento superestimulatório ovariano e SOV utilizado nas vacas da raça Nelore do Grupo P-36/eCG. BE = benzoato de estradiol; US = ultrassom; FSH = hormônio folículo estimulante; PGF_{2α} = prostaglandina; eCG = gonadotrofina coriônica equina; LH = hormônio luteinizante; IATF = inseminação artificial em tempo fixo.

As doadoras do grupo P-36/LH2 e P-36/LH4 receberam tratamento semelhante, exceto que as duas últimas doses de FSH foram substituídas por duas injeções de LH contendo 1,0 e 2,0 mg, respectivamente (dose total = 2,0 e 4,0 mg; Figura 4).

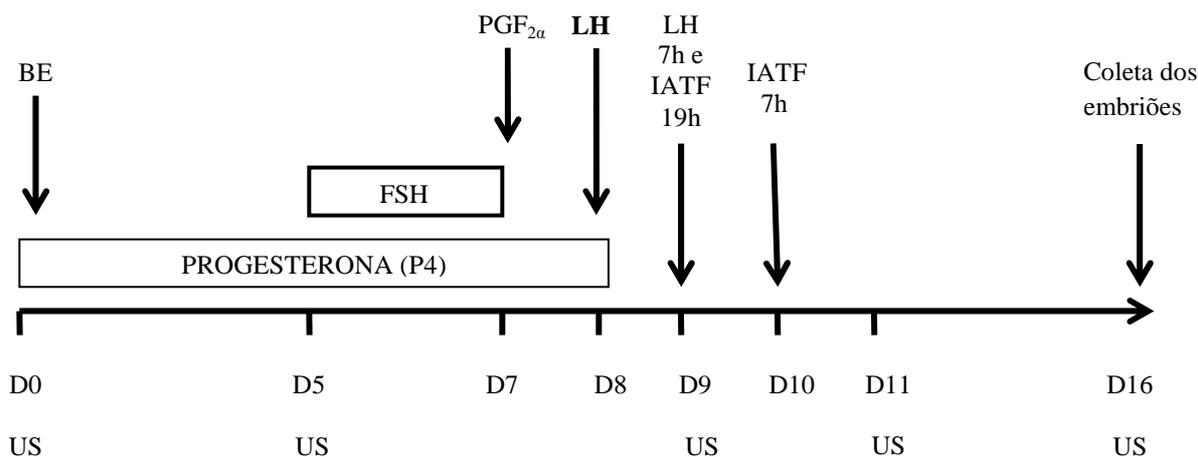


Figura 4: Tratamento superestimulatório ovariano e SOV utilizado nas vacas da raça Nelore dos Grupos P-36/LH2 e P-36/LH4. BE = benzoato de estradiol; US = ultrassom; FSH = hormônio folículo estimulante; $PGF_{2\alpha}$ = prostaglandina; LH = hormônio luteinizante; IATF = inseminação artificial em tempo fixo.

A dose de LH foi previamente determinada em experimento com 20 vacas divididas em quatro grupos experimentais ($n = 5$ por grupo) de acordo com a dose de LH administrada (12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg) a estes animais quando os folículos ovarianos atingiram diâmetro superior a 10 mm. O tratamento com 1,56 mg não induziu ovulação em nenhum dos 5 animais tratados e as demais doses (12,5; 6,25 e 3,12 mg) induziram, coincidentemente, ovulação em 80% das vacas tratadas (Simões et al., 2010). A partir destes resultados, optou-se por utilizar uma dose total de 2,0 mg de LH para promover o crescimento folicular ovariano, porém, evitando-se a indução da ovulação.

Os exames ultrassonográficos dos ovários (Mindray DP 3300-Vet, transdutor transretal linear de 7,5 MHz, Mindray Bio-Medical electronics Co.Ltda, Sheuzheu, China) foram realizados nos dias 0, 5, 9, 11 e 16 (figuras 2, 3 e 4), para avaliar a condição ovariana, a emergência da nova onda folicular, a eficácia do tratamento superestimulatório, a taxa de ovulação após administração do LH e o número de corpos lúteos.

5.1. Colheita e classificação dos embriões

A coleta de embriões foi realizada pelo método não cirúrgico (D16), através de lavagem uterina com 1L de *Dulbecco phosphate buffered saline* (DPBS), por animal. Para tanto, as fêmeas devidamente contidas em tronco individual, foram submetidas à higienização da região perineal e posteriormente à anestesia peridural com 60mg de cloridrato de lidocaína a 2% (Pearson Anestésico L[®], Eurofarma Laboratórios, Campo Belo, São Paulo, Brasil).

O balonete do cateter de Foley foi posicionado no corpo uterino justaposto ao óstio cranial da cérvix e inflado (Castro Neto et al., 2005) para a realização da lavagem uterina. Ao término da lavagem, o útero foi preenchido com DPBS e o cateter foi mantido no local com sua abertura lacrada por uma presilha de filtro de colheita. Posteriormente as doadoras foram liberadas e retornavam ao tronco 20 a 30 minutos após, para a realização de um novo procedimento de coleta de embriões (recoleta) com um volume adicional de 500 ml de DPBS, a fim de proporcionar uma melhor taxa de recuperação embrionária (Neto et al., 2005). Ao final do procedimento de recoleta cada doadora recebeu duas injeções IM de 150 µg de d-clorprostenol, com intervalo de 24 horas entre as aplicações.

O lavado uterino foi recolhido em filtro de 75 µm com a devida identificação do animal e transportado ao laboratório, onde os embriões foram avaliados sob um estereomicroscópio (Nikon – SMZ-45, Japão) e classificados de acordo com o grau de qualidade e desenvolvimento. A classificação morfológica seguiu as normas da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, (grau I, grau II, grau III, grau IV) (Sartori et al., 2002):

- Embrião grau I (excelente): Embrião esférico, os blastômeros apresentam forma bem difundida, cor e textura uniformes e nenhuma extrusão celular.

- Embrião grau II (bom): Embrião com pequenas imperfeições, pouca extrusão celular. Ocasionalmente há uma pequena distinção na forma e cor dos blastômeros e/ou presença de poucas vesículas.

- Embrião grau III (regular): Embrião que apresenta alguns blastômeros com forma e cor heterogênea.

- Embrião grau IV (pobre): Embrião com forma e cor heterogênea entre vários blastômeros, confusa diferenciação celular, extrusão evidente com degeneração e grande número de vesículas.

- Embrião degenerado: Embrião que não apresenta forma definida, sendo impossível determinar o estágio de desenvolvimento. É evidente a desorganização celular.

- Não Fecundado (Nf): Estrutura sem nenhum contorno celular, somente pigmentado.

Após a classificação os embriões transferíveis (grau I e grau II) foram mantidos em meio de manutenção (TQC Holding Plus, Bioniche, Pullman, WA) até momento da criopreservação ou inovulação das receptoras, no caso dos embriões transferidos à fresco.

Os embriões transferidos foram inicialmente alocados em seis grupos experimentais: mórulas frescas, mórulas congeladas, mórulas vitrificadas, blastocistos frescos, blastocistos vitrificados e blastocistos congelados. As avaliações referentes às técnicas de criopreservação dos embriões, bem como o estágio de desenvolvimento embrionário fizeram parte da dissertação de mestrado da aluna Maria Clara Costa Mattos, sob orientação do professor Dr. Roberto Sartori Filho, portanto não serão discutidas no presente trabalho. Entretanto, os tratamentos foram incluídos na análise estatística da taxa de prenhez.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as doadoras ($n = 25$) passaram por todos os grupos em um delineamento experimental “cross-over”. As variáveis, número de folículos maiores que 6 mm no dia 9, estruturas colhidas, estruturas fertilizadas e não fertilizadas, embriões viáveis e número de CL no dia da coleta foram transformados em raiz quadrada e os dados de porcentagem (taxas de ovulação), foram transformados em arco seno. Todos os resultados foram submetidos à Análise de Variância, cujo modelo incluiu efeito de rodada, tratamento, interação entre rodada e tratamento e efeito de doadora, sendo que este último foi considerado como efeito aleatório. Quando detectada diferença entre tratamentos, realizou-se o teste de Tukey (*a posteriori*) para comparar pares de médias. O programa utilizado para realizar as análises foi o MIXED Procedure do SAS (Statistical Analysis System, 2002).

Para investigar o efeito do tratamento sobre as contagens de embriões em cada uma das classes de embriões viáveis, grau I, II e III (excelente, bom, regular) foi realizada comparação através do teste de Friedman, considerando cada vaca como um bloco. Para os cálculos utilizou-se o RANK Procedure e GLM Procedure do SAS (Statistical Analysis System, 2002).

A análise das taxas de prenhez aos 30 e 60 dias foram efetuadas através do ajuste de um modelo de regressão logística, incluindo o efeito do estágio de desenvolvimento, qualidade e tratamento (embriões frescos, vitrificados e congelados). Para os cálculos foi usado o GLIMMIX Procedure do SAS (Statistical Analysis System, 2002).

A significância foi considerada como sendo forte evidência quando $p < 0,05$ e alguma evidência $0,05 \leq p < 0,10$.

7. RESULTADOS

Os tratamentos P-36/FSH, P-36/eCG, P-36/LH2 e P-36/LH4 não apresentaram diferença quanto ao número de folículos superiores a 6 mm no D9, estruturas colhidas, estruturas fertilizadas, estruturas não fertilizadas, embriões viáveis e taxa de viabilidade ($p > 0,05$; Tabela 1). Entretanto a taxa de ovulação obtida 36 h após a administração de LH tendeu a ser menor ($p = 0,06$) no grupo P-36/LH2, quando comparado ao grupo eCG. Além disso, houve diferença significativa no número de CL ao comparar-se o grupo eCG com os grupos LH2 e LH4 (Tabela 1).

Tabela 1. Média (\pm EPM) do número de folículos maiores que 6 mm presentes no D9 do protocolo superestimulatório, taxa de ovulação 48 horas após a administração de LH (D11), número de corpos lúteos no momento da coleta de embriões, estruturas colhidas, embriões viáveis, taxa de viabilidade e número total de embriões viáveis em vacas Nelore ($n = 25$) tratadas com os protocolos P-36 (controle), P-36/eCG, P-36/LH2 e P-36/LH4.

	P-36	P-36/eCG	P-36/LH2	P-36/LH4
Folículos > 6 mm (D9)	30,2 \pm 2,6	28,3 \pm 2,6	28,6 \pm 2,5	26,3 \pm 2,6
Taxa de ovulação (D11,%)	60,7	67,8	50,6 ⁺	55,4
Corpos lúteos	16,8 \pm 2,1	19,2 \pm 2,4 [*]	12,7 \pm 2,0	12,3 \pm 1,5
Estruturas colhidas	8,6 \pm 1,6	9,6 \pm 1,5	6,9 \pm 1,4	7,4 \pm 1,3
Embriões viáveis	3,3 \pm 0,7	4,5 \pm 0,5	3,7 \pm 0,8	4,2 \pm 1,0
Estruturas não fertilizadas	2,8 \pm 0,7	2,0 \pm 0,5	1,2 \pm 0,5	0,5 \pm 0,2
Taxa de viabilidade	35,5	42,4	41,7	44,2
Total de embriões viáveis	83	112	87	106

^{*} Significativamente diferente ($p < 0,05$) quando comparados aos grupos LH2 e LH4.

⁺ Quando comparado ao Grupo eCG ($p = 0,06$).

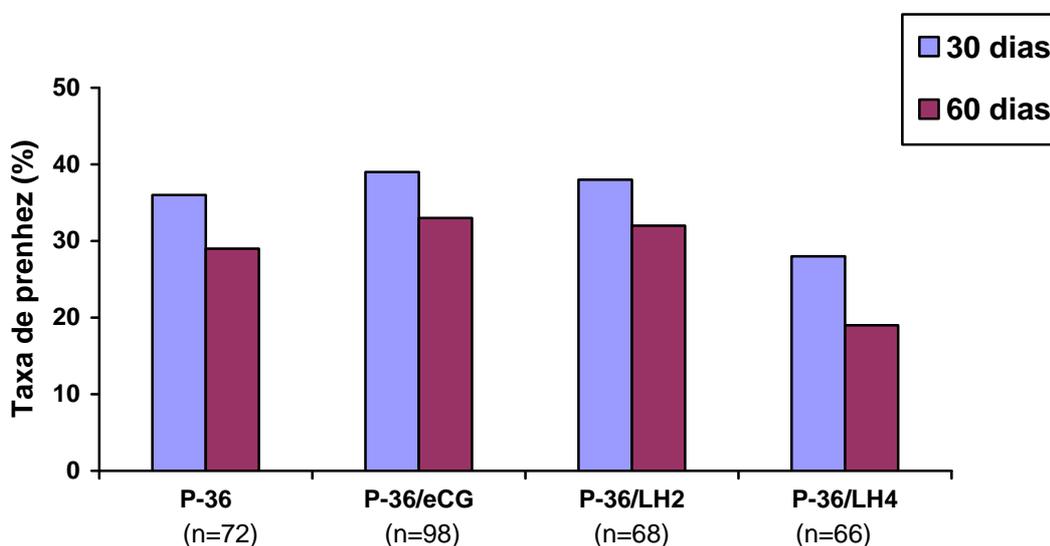
A qualidade dos embriões não foi alterada de forma significativa nos diversos tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2. Número total de embriões viáveis classificados como G I, G II, G III de acordo com suas características morfológicas obtidos em vacas Nelore tratadas com P-36 (controle), P-36/eCG, P-36/LH2 e P-36/LH4.

Classificação	Controle	eCG	LH2	LH4
GI	21	46	33	39
GII	28	32	28	30
GIII	34	34	26	37

Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

As taxas de prenhez aos 30 e 60 dias de gestação dos embriões transferidos foram semelhantes nos 4 grupos experimentais.



Não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Figura 5. Taxas de prenhez obtidas após a transferência de embriões frescos, vitrificados e congelados produzidos em vacas Nelore tratadas com P-36 (controle), P-36/eCG, P-36/LH2 e P-36/LH4.

8. DISCUSSÃO

No presente estudo, a substituição de eCG por pLH, no último dia do tratamento superestimulatório, não prejudicou a produção de embriões na raça Nelore.

Embora tenha ocorrido apenas aumento numérico (P-36/eCG) na produção de embriões viáveis nas vacas tratadas com eCG quando comparadas ao controle (P-36), estudos anteriores com o protocolo P-36 têm mostrado que quando as duas últimas doses de FSH são substituídas pela administração de eCG, há um aumento na produção de embriões viáveis (Barcelos et al., 2007; Reano et al., 2009; Mattos et al., 2010), possivelmente devido a capacidade da eCG estimular receptores de LH e FSH. Conseqüentemente, a presença da eCG no protocolo superestimulatório resultaria em aumento na taxa de ovulação e produção de embriões.

No presente trabalho a substituição de eCG por 2,0 ou 4,0 mg de pLH no último dia do protocolo P-36 não alterou significativamente a produção de embriões viáveis, embora tenha ocorrido diminuição na taxa de ovulação das vacas do grupo LH2, quando comparadas as do grupo eCG (50,6 vs 67,8%, respectivamente, $p = 0,06$). No entanto, na raça Angus a substituição de eCG por 2 mg de pLH no último dia do tratamento superestimulatório diminuiu o número de embriões viáveis (Rosa, 2010). Dentre as possíveis explicações para estes resultados conflitantes estão as particularidades fisiológicas que diferenciam vacas *Bos indicus* de *Bos taurus*, mais especificamente a necessidade de diferentes doses de gonadotrofinas tanto para superestimular quanto para induzir a ovulação em doadoras taurinas e zebuínas (Bó et al., 2006; Ree et al., 2009).

Raças de origem indiana têm demonstrado maior sensibilidade a gonadotrofinas exógenas que os bovinos taurinos. Baruselli et al. (2003), avaliaram a resposta superovulatória em 23 vacas Nelore utilizando diferentes doses de Folltropin-V (100, 133 e 200 mg). Os resultados indicaram que é possível reduzir a dose de Folltropin-V para 100 mg em um protocolo superovulatório de doadoras da raça Nelore, sem comprometer a resposta

superovulatória e a qualidade embrionária. Recentemente, Ree et al. (2009) observaram em animais *Bos taurus*, diminuição nas taxas de ovulação (32, 58 e 84%) proporcional a dose de LH utilizada (8, 12,5 e 25 mg, respectivamente), indicando a necessidade do emprego de doses mais elevadas de pLH nas raças européias (25 mg) em comparação com as preconizadas na raça Nelore (12,5 mg).

Considerando que o Folltropin-V tem aproximadamente 16% de contaminação com LH (Mapletoft et al., 2002), as duas últimas doses de pFSH (13,3 mg) no presente trabalho teriam 2,1 mg de pLH (P-36). Quando as duas últimas doses de pFSH foram substituídas por pLH, as doadoras receberam 2 mg e 4mg, (grupos P-36/LH2 e P-36/LH4, respectivamente). Na raça Angus as duas últimas doses de pFSH (20 mg) teriam aproximadamente 3,2 mg de contaminação, enquanto que a substituição permitiu que fossem aplicados somente 2 mg de pLH. Conseqüentemente, se as doadoras Angus precisam de uma dose total de FSH mais elevada do que as Nelore (200 mg vs 133 mg) e portanto, a concentração de LH contaminante também é superior (3,2 mg vs 2,1 mg), a dose de LH utilizada no último dia do tratamento superestimulatório (2,0 mg) pode ter sido insuficiente para a raça Angus, resultando em menor desenvolvimento folicular e baixas taxas de ovulação e de produção de embriões.

Outra possibilidade a ser considerada seria a necessidade de uma pequena quantidade de pFSH no último dia do tratamento superestimulatório. É possível que o FSH estimule o crescimento dos folículos que ainda não atingiram a fase de desvio, de modo a tornarem-se responsivos ao LH administrado no D9. Existe ainda, a possibilidade do FSH favorecer o aumento da expressão de receptores de LH nas células da granulosa, como indicam os resultados obtidos *in vitro* por Nogueira et al. (2007b). Estes autores observaram aumento na expressão das isoformas LHR nas células da granulosa de zebuínos cultivadas na presença de FSH, quando comparadas a células cultivadas na ausência desta gonadotrofina.

Recentemente, Rosa et al. (2010) relataram na raça Angus, que a adição de LH às duas últimas doses de FSH aumentaram significativamente a qualidade dos embriões, quando comparados aos embriões de doadoras que não receberam LH ou foram tratadas com eCG no último dia do tratamento superestimulatório P-36. Estes dados sugerem que a combinação FSH+LH pode ser benéfica para a produção de embriões e merece ser testada na raça Nelore.

No presente trabalho foram observados em média $35,5 \pm 1,4$ folículos antrais no início dos protocolos (D0). Esses resultados são próximos daqueles relatados por outros autores na raça Nelore ($39,0 \pm 4,0$ Alvarez et al., 2000; $33,4 \pm 3,2$ Carvalho et al., 2008; $29,7 \pm 3,1$ Gimenes et al., 2009; $42,7 \pm 5,9$ Bastos et al., 2010). Porém, diferem daqueles descritos em raças européias ($21,0 \pm 4,0$ Alvarez et al., 2000; $25,4 \pm 2,5$ Carvalho et al., 2008; $15,0 \pm 2,8$ Gimenes et al., 2009; $19,7 \pm 3,2$ Bastos et al., 2010). Segundo Alvarez et al. (2000) e Bastos et al. (2010), diferenças significativas entre a população folicular de taurinos e zebuínos podem estar associadas a altas concentrações circulantes de insulina e IGF-1 nas fêmeas zebuínas.

9. CONCLUSÃO

Os resultados corroboram a hipótese inicial deste trabalho, isto é, a eCG pode ser substituída por pLH, no último dia do tratamento superestimulatório sem prejudicar a produção de embriões viáveis.

10. REFERÊNCIAS

- ACNB, Associação dos criadores de Nelore do Brasil, 2008. Disponível em: <<http://www.nelore.org.br>>. Acesso em: 14 Mai 2010.
- ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H.; GINTHER, O.J. Association between surges of FSH and emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.94, p.177-188, 1992.
- ADAMS, G.P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation. *Theriogenology*, v.41, p.19-24, 1994.
- ALFURAIJI, M.M.; ATKINSON, T.; BROADBENT, P.J.; HUTCHINSON, J.S.M. Superovulation in cattle using PMSG followed by PMSG-monoclonal antibodies. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, p.99-109, 1993.
- ALVAREZ, P.; SPICER, L.J.; CHASE, Jr.C.C.; PAYTON, M.E.; HAMILTON, T.D.; STEWART, R.E.; HAMMOND, A.C.; OLSON, T.A.; WETTERM, R.P. Ovarian and endocrine characteristics during the estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *Journal of Animal Science*, v.78, p.1291-1302, 2000.
- ARMSTRONG, D.T. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology*, v.39, p.7-24, 1993.
- AUSTIN, E.J.; MIHM, M.; EVANS, A.C.O.; KNIGHT, P.G.; IRELAND, J.L.H.; IRELAND, J.J.; ROCHE, J.F. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. *Biology of Reproduction*, v.64, p.839-848, 2001.
- BARCELOS, A.C.Z.; SATRAPA, R.A.; NOGUEIRA, M.F.G. Superstimulatory protocol P-36 in Bonsmara breed: use of eCG and delay on induction of ovulation with LH. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.34, p.513, 2006 (resumo).
- BARCELOS, A.C.Z.; GOUVÊA, L.M.; MENEGHEL, M.; BARCELOS, D.S.; BARCELOS, L.N.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M. Efeito benéfico da substituição das duas últimas doses de pFSH por eCG no protocolo superestimulatório P-36, em vacas Nelore. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.35, p.1260, 2007 (resumo).
- BARROS, C.M.; MOREIRA, M.B.P.; FERNANDES, P. Manipulação farmacológica do ciclo estral para melhorar programas de inseminação artificial ou de

- transferência de embriões. *Arquivo da Faculdade de Veterinária, UFRGS*, s.26, p.179-189, 1998.
- BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, v.56, p.1483-1496, 2001.
- BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. Superovulation in zebu cattle: protocol P-36. *Embryo Transfer Newsletter*, v.23, p.5-9, 2005.
- BARROS, C.M.; ERENO, R.L.; SIMÕES, R.A.L.; FERNANDES, P.; BURATINI, J.; NOGUEIRA, M.F.G. The use of knowledge on changing receptor population in the superstimulation of cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, v.22, p.132, 2010 (abstract).
- BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; REIS, E.L.; NASSER, L.F.T.; SILVA, R.C.P.; MENEGATTI, J.A.; VALENTIN, R.; SANTOS, I.C.C. Adequação da dose de FSH (Follitropin-v) em protocolos de superovulação de vacas Nelore (*Bos indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo (SOTF). *Acta Scientiae Veterinariae*, v.31, p.244-245, 2003.
- BARUSELLI, P.S.; SÁ FILHO, M.F.; MARTINS, C.M.; NASSER, L.F.; NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, C.M.; BÓ G.A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, v.65, p.77-88, 2006.
- BARUSELLI, O.S.; MARTINS, C.M.; SALES, J.N.S.; FERREIRA, R.M. Novos avanços na superovulação de bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.36, p.433-448, 2008.
- BASTOS, M.R.; MATTOS, M.C.C.; MESCHIATTI, M.A.P.; SURJUS, R.S.; GUARDIEIRO, M.M.; MOURÃO, G.B.; PIRES, A.V.; PEDROSO, A.M.; SANTOS, F.A.P.; SARTORI, R. Ovarian function and circulating hormones in nonlactating Nelore versus Holstein cows. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.38, p.776, 2010 (resumo).
- BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K.; GINTHER, O.J. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. *Biology of Reproduction*, v.66, p.120-126, 2002.
- BELLOWS, R.A.; STAIGMILLER, R.B.; WILSON, J.M.; PHELPS, D.A.; DARLING, A. Use of bovine FSH for superovulation and embryo production in beef heifers. *Theriogenology*, v.35, p.1069-1082, 1991.

- BERGFELT, D.R.; LIGHTFOOT, K.C.; ADAMS, G.P. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology*, v.42, p.895-907, 1994.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progesterone and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science*, v.39, p.193-204, 1995.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTINEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*, v.78, p.307-326, 2003.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; CHESTA, P.M.; MARTINS, C.M. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology*, v.65, p.89-101, 2006.
- BODENSTEINER, K.J.; KOT, K.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. *Theriogenology*, v.45, p.1115-1128, 1996.
- BOLAND, M.P.; CROSBY, T.F.; GORDON, I. Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG. *Theriogenology*, v.10, p.175-180, 1978.
- BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Embryo production: alternative methods. *Molecular Reproduction and Development*, v.36, p.266-270, 1993.
- BONI, R.; ROELOFSEN, M.W.M.; PIETERSE, M.C.; KOGUT, J.; KRUIP, T.A. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology*, v.48, p.277-289, 1997.
- BRAILEANU, G.T.; ALBANESE, C.; CARD, C.; CHEDRESE, P.J. FSH bioactivity in commercial preparations of gonadotropins. *Theriogenology*, v.49, p.1031-1037, 1998.
- BRAW-TAL, R.; ROTH, Z. Gene expression for LH receptor, 17 α -hydroxylase and STAR in the theca interna of preantral and early antral follicles in the bovine ovary. *Reproduction*, v.129, p.453-461, 2005.
- BURATINI, JR.J.; PRICE, C.A.; VISINTIN, J.A.; BÓ, G.A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on

- ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology*, v.54, p.421-431, 2000.
- BURNS, D.S.; KRASSEL, J.F.; IRELAND, J.L.H.; KNIGHT, P.G.; IRELAND, J.J. Numbers of antral follicle during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biology of Reproduction*, v.73, p.54-62, 2005.
- CALLESEN, H.; GREVE, T.; HYTTEL, P. Premature ovulations in superovulated cattle. *Theriogenology*, v.28, p.155-166, 1987.
- CARVALHO, J.B.; CARVALHO, N.A.; REIS, E.L.; NICHI, M.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, v.69, p.167-175, 2008.
- CASTILHO, C.; GARCIA, J.M.; RENESTO, A.; NOGUEIRA, G.P.; BRITO, L.F. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology*, v.98, p.189-196, 2007.
- CASTRO NETO, A.; SANCHES, B. V.; BINELLI, M.; SENEDA, M. M.; PERRI, S.H.; GARCIA, J. F. Improvement in embryo recovery using uterine double flushing. *Theriogenology*, v.63, p.1249-1255, 2005.
- CEPEA. *Agribusiness*. Piracicaba CEPEA, 2007. Disponível em: <www.cepea.esalq.usp.br> Acesso em: 27 Out. 2010.
- CHESTA, P.; TRIBULO, R.; TRIBULO, H.; BALLA, E.; BARUSELLI, P.S.; BO, G.A. Effect of time of ovulation induction by gonadotrophin releasing hormone or pituitary luteinizing hormone on ova/embryo production in superstimulated beef cows inseminated at a fixed time. *Reproduction, Fertility and Development*, v.19, p.307, 2007 (abstract).
- COMBARNOUS, Y. Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Endocrine Reviews*, v.13, n.4, p.669-670, 1992.
- DEKRESTER, D.M.; ROBERTSON, P.M. The isolation and physiology of inhibin and related proteins. *Biology of Reproduction*, v.40, p.33-47, 1989.

- DEL CAMPO, M.R.; BECERRA, F.; GONZALEZ, M.; MURPHY, B.D.; MAPLETOFT, R.J. Superovulation with three different commercial pituitary extracts in the cow. *Theriogenology*, v.33, p.158-162, 1990.
- DE LA SOTA, R.L.; SIMMEN, F.A.; DIAZ, T.; THATCHER, W.W. Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. *Biology of Reproduction*, v.55, p.803-812, 1996.
- DIELEMAN, S.J.; BEVERS, M.M.; GIELEN, J.T.H. Increase of the number of ovulations in PMSG/PG-treated cows by administration of monoclonal anti-PMSG shortly after the endogenous LH peak. *Theriogenology*, v.27, p.222, 1987 (abstract).
- DIELEMAN, S.J.; BEVERS M.M.; VOS, P.L.A.M.; DE LOOS, F.A.M. PMSG/anti-PMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment. *Theriogenology*, v.39, p.25-41, 1993.
- D'OCCHIO, M.J.; SUDHA, G.; JILLELA, D.; WHITE, T.; MACLELLAN, L.J.; WHLSH, J.; TRIGG, T.E.; MILLER, D. Use of GnRH agonist to prevent the endogenous LH surge and injection of exogenous LH to induce ovulation in heifers superstimulated with FSH: a new model for superovulation. *Theriogenology*, v.47, p.601-613, 1997.
- DONALDSON, L.E.; WARD D.N.; GLENN S.D. Use of porcine follicle stimulating hormone after chromatographic purification of cattle. *Theriogenology*, v.25, p.747-757, 1986.
- DONALDSON, L.E.; WARD, D.N. LH effects on superovulation and fertilization rates, *Theriogenology*, v.27, p.225, 1987 (abstract).
- DONALDSON, L.E. Porcine, equine and ovine FSH in the superovulation of cattle. *Theriogenology*, v.31, p.183, 1989 (abstract).
- DONALDSON, L.E. Embryo production by SUPER-OV and FSH-P. *Theriogenology*, v.33, p.214, 1990 (abstract).
- DRIANCOURT, M.A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulations of reproduction. *Theriogenology*, v.55, p.1211-1239, 2001.
- ELSDEN, R.P.; HASLER, J.F.; SEIDEL G.E. JR. Non-surgical recovery of bovine eggs. *Theriogenology*, v.6, p.523-532, 1976.

- ERENO, R.L. *Expressão gênica do receptor do hormônio luteinizante (LHR), em células da granulosa de folículos de novilhas Nelore antes, durante e após a divergência folicular*. 2008, 65f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- EVANS, A.C.O.; ADAMS, G.P.; RAWLINGS, N.C. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.103, p.463-470, 1994.
- FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L.; SOLER, J.M.P. Ovarianfollicular dynamics in Nelore Breed (*Bos indicus*). *Theriogenology*, v.47, p.1489-1505, 1997.
- FORTUNE, J.E. Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: a limiting factor in improvement of fertility? *Animal Reproduction Science*, v.33, p.111-125, 1993.
- FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science*, v.82-83, p.109-126, 2004.
- GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; CARVALHO, N.A.T.; TORRES-JUNIOR, J.R.S.; SOUZA, A.H.; MADUREIRA, E.H.; TRINCA, L.A.; SARTORELLI, E.S.; BARROS, C.M.; CARVALHO, J.B.P.; MAPLETOFT, R.J.; BARUSELLI, P.S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, v.69, p.852-858, 2008.
- GIMENES, L.U.; FANTINATO NETO, P.; ARANGO, J.S.P.; AYRES, H.; BARUSELLI, P.S. Follicular dynamics of *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Bubalus bubalis* heifers treated with norgestomet ear implant associated or not to injectable progesterone. *Animal Reproduction*, v.6, p.256, 2009 (abstract).
- GINTHER, O.J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.87, p.223-230, 1989.
- GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, v.55, p.1187-1194, 1996a.
- GINTHER, O.J.; KOT, K.; KULICK, L.J.; MARTIN, S.; WILTBANK, M.C. Relationships between FSH and ovarian follicular waves during last six months

- of pregnancy in cattle., *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, v.108, p.271-279, 1996b.
- GINTHER, O.J.; KOT, K.; KULICK, L.J.; WILTBANK, M.C. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology*, v.48, p.75-87, 1997.
- GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K. Activin A, estradiol and free insulin-like growth factor I in follicular fluid preceding the experimental assumption of follicle dominance in cattle. *Biology of Reproduction*, v.67, p.14-19, 2002.
- GONZALES, A.; LUSSIER, J.G.; CARRUTHERS, T.D.; MURPHY, B.D.; MAPLETOFT, R.J. Superovulation of beef heifers with Follitropin-V: A new FSH preparation containing reduced LH activity. *Theriogenology*, v.33, p.519-529, 1990.
- GONZALEZ, A.; WANG, H.; CARRUTHERS, T.D.; MURPHY, B.D.; MAPLETOFT, R.J. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: effect of dose and antipregnant mare serum gonadotrophin serum. *The Canadian Veterinary Journal*, v.35, p.158-162, 1994.
- GORDON, I. *Controlled reproduction in cattle & buffaloes*, 1.ed. Cambridge: CAB International, 1996, p.492.
- GOULDING, D.; WILLIAMS, D.H.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day 10 of the estrous cycle. *Theriogenology*, v.34, p.767-778, 1990.
- GREVE, T.; CALLESEN, H.; HYTTEL, P.; HOIER, R.; ASSEY, R. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology*, v.43, p.41-50, 1995.
- GUIBAULT, L.A.; GRASSO, F.; LUSSIER, J.G.; ROULLIER, P.; MATTON, P. Decreased superovulatory response in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.91, p.81-89, 1991.
- HAFEZ, E.S.E. *Reproduction in farm animals*. 6. ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1993, 585p.
- HILL, B.R.; KUEHNER, L.F. Follicle aspiration prior to superovulation in cattle: a field study. *Theriogenology*, v.43, p.324, 1996 (abstract).

- HORTON, E.W.; POYSER, N.L. Plasma progesterone levels in guinea-pigs actively immunized against prostaglandin F₂alpha, hysterectomized or treated with intra-uterine indomethacin. *Journal of Endocrinology*, v.67, p.81-88, 1975.
- HYTTEL, P.; CALLESEN, H.; GREVE, T.; SCHMIDT, M. Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. *Theriogenology*, v.35, p.91-108, 1991.
- IRELAND, J.J.; WARD, F.; JIMENES-KRASSEL, F.; IRELAND, J.L.H.; SMITH, G.W.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C.O. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Human Reproduction*, v.22, n.6, p.1687-1695, 2007.
- JAISWAL, R.S.; SINGH, J.; ADAMS, G.P. Developmental patterns of small antral follicles in the bovine ovary. *Biology of Reproduction*, v.71, p.1244-1251, 2004.
- KARSCH, F.J.; BOWEN, J.M.; CARATY, A.; EVANS, N.P.; MOENTER, S.M. Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. *Biology of Reproduction*, v.56, p.303-309, 1997.
- KNIGHT, P.G. Roles of Inhibins, Activins, and Follistatin in the Female Reproductive System. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v.17, p.476-509, 1996.
- KOJIMA, F.N.; BERGFELD, E.G.M.; WEHRMAN, M.E.; CUPP, A.S.; FIKE, K.E.; MARISCAL-AGUAYO, D.V.; SANCHEZ-TORRES, T.; GARCIA-WINDER, M.; CLOPTON, D.T.; ROBERTS, A.J.; KINDER, J.E. Frequency of hormone pulses in cattle influences duration of persistence of dominant ovarian follicles, follicular fluid concentration of steroids, and activity of insulin-like growth factor binding proteins. *Animal Reproduction Science*, v.77, p.187-211, 2003.
- LIU, J.; SIROIS, J. Follicle size-dependent induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle. *Biology of Reproduction*, v.58, p.1527-1532, 1998.
- LOONEY, C.R.; BONDIOLI, K.R. Bovine FSH produced by recombinant DNA technology. *Theriogenology*, v.29, p.235, 1988.
- LOWMAN, B.G.; SOMERVILLE, S.H. *Condition Scoring of Cattle*. Edinburgh: College of Agriculture. v.6, p.1-31, 1976.
- LUCY, M.C.; SAVIO, J.D.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R.L.; THATCHER, W.W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *Journal of Animal Science*, v.70, p.3615-3626, 1992.

- LUSSIER, J.P.; MATTON, P.; DUFOUR, J.J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.81, p.301-307, 1987.
- LUSSIER, J.P.; LAMOTHE, P.; PACHOLEK, X. Effects of follicular dominance and different gonadotrophin preparations on the superovulatory response in cows. *Theriogenology*, v.43, p.270, 1995 (abstract).
- MAPLETOFT, R.J.; PIERSON, R.A. Factors affecting superovulation in the cow: practical considerations. *IETS Embryo Transfer Newsletter*, v.11, p.14-24, 1993.
- MAPLETOFT, R.J.; STEWARD, K.B.; ADAMS, G.P. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction Nutrition Development*, v.42, p.601-611, 2002.
- MARTINS, C.M.; CASTRICINI, E.S.C.; REIS, E.L.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F. Produção embrionária de vacas holandesas a diferentes protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, p.286, 2005 (resumo).
- MARTINS, C.M.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; SOUZA, A.H.; BAUSELLI, P.S. Efeito do momento da aplicação do LH na resposta superovulatória e na produção embrionária em vacas Nelore (*Bos indicus*) inseminadas artificialmente em tempo fixo. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.34, p.529, 2006 (resumo).
- MATTON, P.; ADELAKOUN, V.; COUTURE, Y.; DUFOUR, J.J. Growth and replacement of the bovine follicles during the estrus cycle. *Animal Reproduction Science*, v.52, p.813-820, 1981.
- MATTOS, M.C.C.; BASTOS, M.R.; GUARDIEIRO, M.M.; CARVALHO, J.O.; MOURÃO, G.B.; BARROS, C.M.; SARTORI, R. Improvement of embryo quality by the replacement of the last two doses of porcine follicle-stimulating hormone by equine gonadotropin in superstimulated Sindi donors. *Reproduction, Fertility and Development*, v.22, p.364, 2010 (abstract).
- MELO, D.S.; FERREIRA, M.M.G.; MONTEIRO, F.M.; NOGUEIRA, M.F.G.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M. Manutenção de níveis sub-luteais de progesterona, após tratamento superestimulatório, pode diminuir a taxa de recuperação de embriões. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.32, p.206, 2004 (resumo).

- MIKEL-JENSON, A.; GREVE, T.; MADEJ, A.; EDQVIST, L.E. Endocrine profiles and embryo quality in the PMSF-PGF_{2α} treated cow. *Theriogenology*, v.18, p.33-34, 1982.
- MILVAE, R.A.; HINCKLEY, S.T.; CARLSON, J.C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. *Theriogenology*, v.45, p.1327-1349, 1996.
- MONNIAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*, v.19, p.55-82, 1983.
- MOOR, R.M.; KRUIP, T.H.; A.M.; GREEN, D. Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation? *Theriogenology*, v.21, p.103-116, 1984.
- MURPHY, M.G.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.90, p.523-533, 1990.
- NETO, A.S.; SANCHES, B.V.; BINELLI, M.; SENEDA, M.M.; PERRI, S.H.; GARCIA, J.F. Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. *Theriogenology*, v.63, p.1249-1255, 2005.
- NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, B.J.P.; TEIXEIRA, A.B.; TRINCA, L.A.; D'OCCHIO, M.J.; BARROS, C.M. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in superstimulated beef cows. *Theriogenology*, v.57, p.1625-1634, 2002.
- NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, C.M. Timing of ovulation in Nelore cows superstimulated with P36 protocol. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.31, p.509, 2003 (abstract).
- NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, C.M. Aspectos práticos e perspectivas futuras do modelo P-36 de superovulação em doadoras da raça Nelore. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.34, p.25-29, 2006.
- NOGUEIRA, M.F.G.; FRAGNITO, P.S.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M. The effect of type of vaginal insert and dose of pLH on embryo production, following fixed-time AI in a progestin-based superstimulatory protocol in Nelore cattle. *Theriogenology*, v.67, p.655-660, 2007a.
- NOGUEIRA, M.F.G.; BURATINI, J. Jr.; PRICE, C.A.; CASTILHO, A.C.; PINTO M.G.; BARROS, C.M. Expression of LH receptor mRNA splice variants in

- bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, v.74, p.680-686, 2007b.
- PRICE, C.A.; CARRIÈRE, P.D.; GOSSELIN, N.; KOHRAM, H.; GUILBAULT, L.A. Effects of superovulation on endogenous LH secretion in cattle, and consequences for embryo production. *Theriogenology*, v.51, p.37-46, 1999.
- REANO, I.; CARBALLO, D.; TRIBULO, A.; TRIBULO, P.; BALLA, E.; BO, GA. Efecto de la adición de eCG a los tratamientos superovulatorios con Folltropin-V en la producción de embriones de donantes de embriones. *VIII Simpósio Internacional de Reproducción Animal*, v.1, p.54, 2009.
- REE, T.O.; COLAZO, M.G.; LAMONT, A.G.; KASTELIC, J.P.; DYCK, M.K.; MAPLETOFT, R.J.; AMETAJ, B.N.; AMBROSE, D.J. The effect of porcine luteinizing hormone in the synchronization of ovulation and corpus luteum development in nonlactating cows. *Theriogenology*, v.72, p.120-128, 2009.
- RICE, C.H. The control of FSH secretion in the larger domestic species. *Journal Endocrinology*, v.131, p.177-184, 1991.
- ROBERTS, A.J.; GRIZZLE, J.M.; ECHTERNKAMP, S.E. Follicular development and superovulation response in cows administered multiple FSH injections early in the estrous cycle. *Theriogenology*, v.35, p.917-929, 1994.
- ROBERSON, M.S.; WOLF, M.W.; STUMPF, T.T.; KITTOCK, R.J.; KINDER, J.E. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. *Biology of Reproduction*, v.45, p.997-1003, 1989.
- ROWSON, L.E.A.; LAWSON, R.A.S.; MOOR, R.M.; BAKER, A.A. Egg transfer in the cow: synchronization requirements. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.28, p.427-431, 1972.
- ROSA, F.S. *Eficiência do protocolo supervovulatório P-36, associado à administração eCG ou LH em doadoras da raça Angus*. 2010, 63f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Departamento de Farmacologia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- ROY, F.; MAUREL, M.C.; COMBES, B.; VAIMAN, D.; CRIBIU, E.P.; LANTIER, I.; POBEL, T.; DELÉTANG, F.; COMBARNOUS, Y.; GUILLOU, F. The negative effect of repeated equine chorionic gonadotrophin treatment on subsequent fertility in alpine goats is due to a humoral immune response involving the major histocompatibility complex. *Biology of Reproduction*, v.60, p.805-813, 1999.

- SARTORELLI, E.S.; CARVALHO, L.M.; BERGFELT, R.D.; GINTHER, O.J.; BARROS, C.M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology*, v.63, p.2382-2394, 2005.
- SARTORI, R.; FRICKE, P.M.; FERREIRA, J.C.; GINTHER, O.J.; WILTBANK M.C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biology of Reproduction*, v.65, p.1403-1409, 2001.
- SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S.A.; GUENTHER, J.N.; PARRISH, J.J.; WILTBANK, M.C. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science*, v.85, p.2803-2812, 2002.
- SARTORI, R.; GUARDIEIRO, M.M.; BARROS, C.M.; BASTOS, M.R., MACHADO, G.M.; LEME, L.O.; RUMPF, R. Lack of improvement on embryo production by the replacement of the last two doses of pFSH by eCG in superstimulated Nelore heifers. *Reproduction and Development*, v.21, p.245-246, 2008.
- SAS Institute Inc. *SAS/STAT Software, Release 9.2*. Cary: SAS Institute Inc., 2002-2008.
- SAUMANDE, J.; CHUPIN, D.; MARIANA, J.C.; ORTAVANT, R.; MAULEON, P. Factors affecting the viability of ovulation rates after PMSG stimulation. In: Control of reproduction in the cow. *Sreenan JM*, ed. Martinus Nijhoff, p.195-224, 1978.
- SAVIO, J.D.; KEENAN, L.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle of heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.83, p.663-671, 1988.
- SAVIO, J.D.; BOLAND, M.P.; HYNES, N.; ROCHE, J.F. Resumption of follicular activity in the early postpartum period of dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, v.88, p.569-579, 1990a.
- SAVIO, J.D.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in postpartum dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, v.88, p.581-591, 1990b.
- SCHAMS, S.; MENZER, C.H.; SCHALLENBERGER, E.; HOFFMAN, B.; HABA, R. Some studies on pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle, In: Control of

- Reproduction the Cow. *Commission of the European Communities*, Luxembourg, p.25-80, 1978.
- SIMÕES, R.A.L.; SATRAPA, R.A.; ROSA, F.S.; PIAGENTINI, M.; CASTILHO, A.C.S.; ERENO, R.L.; NOGUEIRA, M.F.G.; BURATINI, J.; BARROS, C.M. Follicular diameter, ovulation rate, and LH receptor gene expression in Nelore cows. *Reproduction, Fertility and Development*, v.22, p.270, 2010 (abstract).
- SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrus cycle in heifers monitored by Real-Time Ultrasonography. *Biology of Reproduction*, v.39, p.308-317, 1988.
- STOCK, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology*, v.132, p.1108-1116, 1993.
- STOCK, A.E.; ELLINGTON, J.E.; FORTUNE, J.E. A dominant follicle does not affect follicular recruitment by superovulatory doses of FSH in cattle but can inhibit ovulation. *Theriogenology*, v.45, p.1091-1102, 1996.
- VAN LEEMPUT, E.; VOS, P.; HYTTEL, P.; VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.; VAN DER WEIJDEN, G.; DIELEMAN, S.J. Effects of brief postponement of the preovulatory LH surge on ovulation rates and embryo formation in eCG/prostaglandin-treated heifers. *Theriogenology*, v.55, p.573-592, 2001.
- VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A. Follicular dynamics in zebu cattle. *Pesquisa agropecuária brasileira*, v.35, n.12, p.2501-2509, 2000.
- VOS, P.L.A.M.; BEVERS, M.M.; WILLEMSE, A.H.; DIELEMAN, S.J. Effects of suppression by a progesterone-releasing device and subsequent induction by GnRH of the preovulatory LH surge on follicular function in PMSG/PG-treated heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.101, p.43-49, 1994.
- VOS, P.L.A.M.; BEVERS, M.M.; WILLEMSE, A.H.; DIELEMAN, S.J. Does postponement of preovulatory LH surge affect ovulation rate and embryo yield in superovulated holstein heifers? *Theriogenology*, v.43, p.344, 1995 (abstract).
- XU, Z.; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; HAMILTON, S.A.; YOUNGQUIST, R.S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biology of Reproduction*, v.53, p.951-957, 1995.

- WEBB, R.; NICHOLAS, B.; GONG, J.G.; CAMPBELL, B.K.; GUTIERREZ, C.G.; GARVERICK, H.A.; ARMSTRONG, D.G. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction Supplement*, v.61, p.71-90, 2003.
- WILSON, J.M.; JONES, A.L.; MOORE, K.; LOONEY, C.R.; BONDIOLI, K.R. Superovulation of cattle with a recombinant-DNA bovine follicle stimulating hormone. *Animal Reproduction Science*, v.33, p.71-82, 1993.
- WOLFENSON, D.; INBARA, G.; ROTH, Z.; KAIMB, M.; BLOCHA, A.; BRAW-TAL, R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cow and nulliparous heifers. *Theriogenology*, v.62, p.1042-1055, 2004.
- WOOLUMS, A.R.; PETER, A.T. Cystic ovarian condition in cattle; Part I. Folliculogenesis and ovulation. *Compendium on Continuing of Education for the practicing veterinarian*, v.16, p.935-943, 1994.

11. ANEXO I

Trabalho científico enviado à revista Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.

Eficiência do protocolo superestimulatório P-36, associado à administração de eCG ou LH, em animais da raça Nelore

A. C. S. Oliveira¹, M. C. C. Mattos¹, M. R. Bastos¹, L. A. Trinca², R. Sartori³, Ciro M. Barros^{4a}

¹Departamento de Reprodução Animal - FMVZ, ²Departamento de Bioestatística – IBB, Universidade Estadual Paulista (UNESP), ³Departamento de Ciência Animal, ESALQ, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP, ⁴Departamento de Farmacologia- IBB - UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

annakarollavet@yahoo.com.br, mmary_ccm@yahoo.com.br, michelerbastos@hotmail.com,
ltrinca@ibb.unesp.br, robertosartori@usp.br.

^aAutor para correspondência: Ciro Moraes Barros

Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista
18618-970 Botucatu – São Paulo - Brasil

tel.: +55 14 3811-6253

fax: +55 14 3815-3744

e-mail: cmbarrros@ibb.unesp.br

Abstract

Recent work with P-36 demonstrates that the replacement of the last two doses of FSH by eCG increases embryo yield. However, it is unclear if the positive effect of eCG is related to its FSH-like activity, LH-like activity or both. This study aimed to verify the replacement of eCG by pLH on the last day of superstimulatory treatment. Twenty-five Nelore cows were allocated into four groups: P-36 (control); P-36/eCG; P-36/LH2 and P-36/LH4. All animals underwent four treatments in a crossover design. Control group cows were superstimulated with decreasing doses of pFSH (133 mg, i.m.). In P-36/eCG, P-36/LH2 and P-36/LH4 the last two doses of pFSH were replaced by 2 doses of eCG (200 IU each dose, i.m.) or pLH, (1 and 2 mg each dose, i.m.) respectively. Donors received fixed-time artificial insemination (FTAI) 12 and 24 h after pLH. Embryo flushing was performed on D16. Data were analyzed by ANOVA (Proc Mixed, SAS). There was a trend of decrease in ovulation rate when comparing groups LH2 and eCG ($P=0.06$). However, there was no significant difference in the mean number of viable embryos among groups P-36 (3.3 ± 0.7); P-36/eCG (4.5 ± 0.5); P-36/LH2 (3.7 ± 0.8) and P-36/LH4 (4.2 ± 1.0). We concluded that the replacement of eCG by pLH on the last day of superstimulatory treatment can be performed with no significant variation in the production of viable embryos.

Keywords: LH, eCG, embryo transfer, superovulation, Nelore.

Resumo

Trabalhos recentes com o P-36, mostram que a substituição das últimas duas doses de FSH por eCG melhora a produção de embriões. Entretanto, não é sabido se este efeito benéfico da eCG é devido à sua atividade FSH, LH ou ambas. Objetivou-se com o presente trabalho testar a substituição da eCG pelo pLH, no último dia do tratamento superestimulatório. Vinte e cinco vacas Nelore foram distribuídas em 4 grupos: P-36 (controle), P-36/eCG, P-36/LH2 e P-36/LH4. Todos os animais receberam os quatro tratamentos superovulatórios de forma alternada (“crossover”). No grupo controle, os animais foram superestimulados com FSH (via IM, dose

total = 133 mg) duas vezes ao dia em doses decrescentes do D5 ao D8, enquanto que no grupo P-36/eCG, P-36/LH2 e P-36/LH4 as duas últimas doses de FSH foram substituídas por eCG (totalizando 400 UI via IM) ou LH (totalizando 2 mg e 4 mg, via IM), respectivamente. As doadoras foram inseminadas (IATF) 12 e 24 horas após a aplicação de LH. A coleta de embriões foi realizada no dia 16. Os dados foram analisados por ANOVA (Proc Mixed do SAS). Observou-se tendência de diminuição na taxa de ovulação quando comparados os grupos LH2 e eCG ($p=0,06$). Entretanto, não houve diferença significativa no número médio de embriões viáveis entre os grupos P-36 ($3,3\pm 0,7$), P-36/eCG ($4,5\pm 0,5$), P-36/LH2 ($3,7\pm 0,8$) e P-36/LH4 ($4,2\pm 1,0$). Conclui-se que a substituição da eCG por pLH, no último dia de tratamento superestimulatório, pode ser realizada sem alterar significativamente a produção de embriões viáveis.

Palavras-chave: LH, eCG, superovulação, transferência de embriões, Nelore.

1. Introdução

Em decorrência da facilidade de adaptação ao ambiente tropical, os zebuínos, predominam em muitos países do hemisfério sul, contrastando com o hemisfério norte, onde prevalecem as raças européias (*Bos taurus*).

A demanda crescente por animais de elevado mérito genético tem impulsionado o uso de técnicas de biotecnologia, notadamente aquelas associadas à reprodução. Nesse contexto, a inseminação artificial e a indução de ovulação múltipla (superovulação) para a produção e transferência de embriões (TE), são biotecnologias amplamente utilizadas para acelerar o melhoramento genético do rebanho^{1,2,3}.

Embora os tratamentos para induzir ovulações múltiplas tenham evoluído de protocolos superestimulatórios que dependem da detecção do estro para sincronizar o crescimento folicular e a ovulação, permitindo a IATF e facilitando o manejo das doadoras, não houve um aumento expressivo na produção de embriões viáveis^{1,2,3,4}.

Dentre os tratamentos superestimulatórios utilizados, Barros e Nogueira² desenvolveram um protocolo no qual a fonte de progesterona é mantida por 36 horas após a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (daí a denominação P-36) e a ovulação é induzida com LH exógeno, administrado 12 horas mais tarde. Graças à administração exógena de LH é possível controlar o momento da ovulação, que ocorre entre 24 e 36 horas após a injeção de LH². Conseqüentemente, a IA é realizada em tempo fixo (IATF) 12 e 24 horas após a aplicação de LH, dispensando a detecção do cio das doadoras.

Uma modificação deste protocolo foi proposta por Barcelos et al.⁵ ao testarem em vacas da raça Nelore, se a substituição do pFSH por eCG (2 doses 200UI), no último dia do tratamento superestimulatório aumentaria a produção de embriões. Este autores esperavam que no último dia do tratamento superestimulatório a maioria dos folículos já teriam adquirido receptores para LH⁶ e a administração de eCG, devido a sua capacidade de estimular receptores de LH e FSH⁷ poderia melhorar a maturação oocitária e conseqüentemente a qualidade embrionária. Tanto o número de folículos com diâmetro superior a 6 mm presentes no momento da administração de pLH, quanto o número de estruturas totais colhidas foram superiores ($p < 0,03$) nos animais que receberam eCG. De forma similar, Mattos et al.⁸ observaram na raça Sindi (*Bos indicus*) aumento na produção de embriões viáveis ao substituírem o FSH por eCG no último dia do protocolo P-36 ($2,6 \pm 0,7$ vs $5,8 \pm 1,3$, $p < 0,05$).

Levando-se em consideração os resultados favoráveis do uso da eCG no protocolo P-36 e a possibilidade do efeito benéfico da eCG ser devido principalmente a sua atividade LH, objetivou-se com o presente trabalho testar a substituição da eCG pelo LH, no último dia do tratamento superestimulatório em vacas da raça Nelore.

2. Material e método

O experimento foi realizado na Fazenda Figueira, no município de Londrina, estado do Paraná (latitude 23°33' S, longitude 50°58' O, altitude 622 m). As doadoras da raça Nelore com escore de condição corporal 3,0 a 4,0 (escala de 1 a 5⁹), foram mantidas em pastagem capim Tanzânia (*Panicum maximum*) e estrela branca (*Cynodon plectostachyus*), sal mineral e água à vontade. Durante o período de Outubro de 2009 a Fevereiro de 2010, (Primavera e Verão no hemisfério Sul).

As vacas (n = 25) foram distribuídas aleatoriamente em 4 grupos: Controle (P-36/FSH), P-36/eCG, P-36/LH2 e P-36/LH4. Posteriormente os animais foram trocados de grupo de maneira que todas as doadoras fossem submetidas aos quatro tratamentos (crossover). Cada período em que a doadora recebeu um tratamento obteve a denominação de rodada.

Em dia aleatório do ciclo estral, denominado dia zero (D0), as 25 vacas foram avaliadas com ultrassom (Mindray DP 3300-Vet, transdutor transretal linear de 7,5 MHz, Mindray Bio-Medical electronics Co.Ltda, Sheuzheu, China) para verificar a condição ovariana (população de folículos, presença de corpo lúteo (CL), ocorrência de cisto folicular), receberam um dispositivo intravaginal contendo progesterona (1 g, Primer[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil) e administração de 2 mg de benzoato de estradiol (BE, via IM, Estrogin[®]; Farmavet, São Paulo, Brasil). Cinco dias mais tarde (D5) foi iniciado o tratamento superestimulatório (FSH, 133 mg, Folltropin-V[®], via IM, NIH-FSH-P1, Folltropin-V[®], IM, Bioniche Animal Health, Ontário, Canadá), 2 vezes ao dia, durante 4 dias consecutivos (40, 30, 20 e 10% da dose total respectivamente).

No dia sete (D7) às 7 h foi administrada uma dose luteolítica de um análogo da PGF_{2α} (0,150 mg de d-cloprostenol, via IM, Prolise[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil). Trinta e seis horas após a aplicação de PGF_{2α} (D8 às 19 h), o dispositivo intravaginal contendo progesterona foi removido. A indução da ovulação foi realizada através da administração de LH (Lutropin[®], 12,5 mg, via IM, Bioniche Animal Health, Ontário, Canadá) no dia nove (D9) às 19 h, ou seja, quarenta e oito horas após a aplicação de PGF_{2α}. Os animais foram inseminados artificialmente

em tempo fixo (IATF), sem a observação de cio, 12 e 24 horas após a aplicação de LH (Figura 1).

Foi utilizado sêmen de oito touros da raça Nelore e as inseminações foram realizadas por três técnicos experientes. A morfologia e motilidade foram avaliadas¹⁰, em todas as rodadas as doadoras receberam sêmen do mesmo touro.

Os animais do grupo P-36/eCG foram tratados de forma semelhante aos do grupo controle, porém as duas últimas doses de FSH foram substituídas por duas doses de gonadotrofina coriônica equina contendo 200UI cada uma (eCG, totalizando 400 UI via IM, Folligon[®], Intervet International B.V., Holanda). As doadoras do grupo P-36/LH2 e P-36/LH4 receberam tratamento semelhante, exceto que as duas últimas doses de FSH foram substituídas por duas injeções de LH contendo 1,0 e 2,0 mg, respectivamente (dose total = 2,0 e 4,0 mg).

A dose de LH foi previamente determinada em experimento com 20 vacas divididas em quatro grupos experimentais (n = 5 por grupo) de acordo com a dose de LH administrada (12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg) a estes animais quando os folículos ovarianos atingiram diâmetro superior a 10 mm. O tratamento com 1,56 mg não induziu ovulação em nenhum dos 5 animais tratados e as demais doses (12,5; 6,25 e 3,12 mg) induziram, coincidentemente, ovulação em 80% das vacas tratadas¹¹. A partir destes resultados, optou-se por utilizar uma dose total de 2,0 e 4,0 mg de LH para promover o crescimento folicular ovariano, porém, evitando-se a indução da ovulação.

Os exames ultrassonográficos dos ovários (Mindray DP 3300-Vet, transdutor transretal linear de 7,5 MHz, Mindray Bio-Medical electronics Co.Ltda, Sheuzheu, China) foram realizados nos dias 0, 5, 9, 11 e 16 (figuras 1), para avaliar a condição ovariana, a emergência da nova onda folicular, a eficácia do tratamento superestimulatório, a taxa de ovulação após administração do LH e o número de corpos lúteos.

A coleta de embriões foi realizada pelo método não cirúrgico (D16), através de lavagem uterina com 1L de *Dulbecco phosphate buffered saline* (DPBS), por animal. Ao término da lavagem, o útero foi preenchido com DPBS e o cateter foi mantido no local com sua abertura lacrada por uma presilha de filtro de colheita. Posteriormente as doadoras foram liberadas e retornavam ao tronco de contenção 20 a 30 minutos após, para a realização de um novo procedimento de coleta de embriões (recoleta¹²), com um volume adicional de 500 ml de DPBS, a fim de proporcionar uma melhor taxa de recuperação embrionária. Ao final do procedimento de recoleta cada doadora recebeu duas injeções IM de 150 µg de d-clorprostenol, com intervalo de 24 horas entre as aplicações.

Após a classificação morfológica segundo as normas da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões¹³, os mesmos foram mantidos em meio de manutenção (TQC Holding Plus, Bioniche, Pullman, WA) até momento da criopreservação ou inovulação nas receptoras, no caso dos embriões transferidos à fresco.

Os embriões transferidos foram inicialmente alocados em seis grupos experimentais: mórulas frescas, mórulas congeladas, mórulas vitrificadas, blastocistos frescos, blastocistos vitrificados e blastocistos congelados.

Análise Estatística

Todas as doadoras (n = 25) passaram por todos os grupos em um delineamento experimental “crossover”. As variáveis, número de folículos maiores que 6 mm no dia 9, estruturas colhidas, estruturas fertilizadas e não fertilizadas, embriões viáveis e número de CL no dia da coleta foram transformados em raiz quadrada e os dados de porcentagem (taxas de ovulação), foram transformados em arco seno. Todos os resultados foram submetidos à Análise de Variância, cujo modelo incluiu efeito de rodada, tratamento, interação entre rodada e tratamento e efeito de doadora, sendo que este último foi considerado como efeito aleatório. Quando detectada diferença entre tratamentos, realizou-se o teste de Tukey (*a posteriori*) para comparar pares de médias. O programa utilizado para realizar as análises foi o MIXED Procedure do SAS¹⁴.

Para investigar o efeito do tratamento sobre as contagens de embriões em cada uma das classes de embriões viáveis, grau I, II e III (excelente, bom, regular) foi realizada comparação através do teste de Friedman, considerando cada vaca como um bloco. Para os cálculos utilizou-se o RANK Procedure e GLM Procedure do SAS¹⁴.

A análise das taxas de prenhez aos 30 e 60 dias foram efetuadas através do ajuste de um modelo de regressão logística, incluindo o efeito do estágio de desenvolvimento, qualidade e tratamento (embriões frescos, vitrificados e congelados). Para os cálculos foi usado o GLIMMIX Procedure do SAS¹⁴.

A significância foi considerada como sendo forte evidência quando $p < 0,05$ e alguma evidência $0,05 \leq p < 0,10$.

3. Resultados

Os tratamentos P-36/FSH, P-36/eCG, P-36/LH2 e P-36/LH4 não apresentaram diferença quanto ao número de folículos superiores a 6 mm no D9, estruturas colhidas, estruturas fertilizadas, estruturas não fertilizadas, embriões viáveis e taxa de viabilidade ($p > 0,05$; Tabela 1). Entretanto a taxa de ovulação obtida 36 h após a administração de LH tendeu a ser menor ($p = 0,06$) no grupo P-36/LH2, quando comparado ao grupo eCG. Além disso, houve diferença significativa no número de CL ao comparar-se o grupo eCG com os grupos LH2 e LH4 (Tabela 1).

A qualidade dos embriões não foi alterada de forma significativa nos diversos tratamentos (Tabela 2).

As taxas de prenhez aos 30 e 60 dias de gestação dos embriões transferidos foram semelhantes nos 4 grupos experimentais.

4. Discussão

No presente estudo, a substituição de eCG por pLH, no último dia do tratamento superestimulatório, não prejudicou a produção de embriões na raça Nelore.

Embora tenha ocorrido apenas aumento numérico (P-36/eCG) na produção de embriões viáveis nas vacas tratadas com eCG quando comparadas ao controle (P-36), estudos anteriores com o protocolo P-36, têm mostrado que quando as duas últimas doses de FSH são substituídas pela administração de eCG, há um aumento na produção de embriões viáveis^{5,15,8}, possivelmente devido a capacidade da eCG estimular receptores de LH e FSH. Consequentemente, a presença da eCG no protocolo superestimulatório resultaria em aumento na taxa de ovulação e produção de embriões⁴.

No presente trabalho a substituição de eCG por 2,0 ou 4,0 mg de pLH no último dia do protocolo P-36 não alterou significativamente a produção de embriões viáveis, embora tenha ocorrido diminuição na taxa de ovulação das vacas do grupo LH2, quando comparada a do grupo eCG (67,8 50,6 vs 50,6%, respectivamente, $p = 0,06$). No entanto, na raça Angus a substituição de eCG por 2 mg de pLH no último dia do tratamento superestimulatório diminuiu o número de embriões viáveis¹⁶. Dentre as possíveis explicações para estes resultados conflitantes estão as particularidades fisiológicas que diferenciam vacas *Bos indicus* de *Bos taurus*, mais especificamente a necessidade de diferentes doses de gonadotrofinas tanto para superestimular quanto para induzir a ovulação em doadoras taurinas e zebuínas^{17,18}.

Raças de origem indiana têm demonstrado maior sensibilidade a gonadotrofinas exógenas que os bovinos taurinos. Baruselli et al.¹⁹, avaliaram a resposta superovulatória em 23 vacas Nelore utilizando diferentes doses de Folltropin-V (100, 133 e 200 mg). Estes autores concluíram que é possível reduzir a dose de Folltropin-V para 100 mg em um protocolo superovulatório de doadoras da raça Nelore, sem comprometer a resposta superovulatória e a qualidade embrionária. Recentemente, Ree et al.¹⁸ observaram em animais *Bos taurus*, diminuição nas taxas de ovulação (32, 58 e 84%) proporcional a dose de LH utilizada (8, 12,5 e

25 mg, respectivamente), indicando a necessidade do emprego de doses mais elevadas de pLH nas raças européias (25 mg) em comparação com as preconizadas na raça Nelore (12,5 mg).

Considerando que o Folltropin-V tem aproximadamente 16% de contaminação com LH²⁰, as duas últimas doses de pFSH (13,3 mg) no presente trabalho teriam 2,1 mg de pLH (P-36). Quando as duas últimas doses de pFSH foram substituídas por pLH, as doadoras dos grupos P-36/LH2 e P-36/LH4, receberam 2,0 e 4,0 mg de LH, respectivamente. Na raça Angus as duas últimas doses de pFSH (20 mg) teriam aproximadamente 3,2 mg de contaminação, enquanto que Rosa et al.¹⁶ utilizaram apenas 2 mg de pLH no último dia do tratamento superestimulatório de vacas Angus. Consequentemente, é possível que a dose de 2,0 mg de LH seja insuficiente para doadoras Angus, quando comparadas às Nelore, resultando em menor desenvolvimento folicular e baixas taxas de ovulação e de produção de embriões.

Outra possibilidade a ser considerada seria a necessidade de uma pequena quantidade de pFSH no último dia do tratamento superestimulatório. É possível que o FSH estimule o crescimento dos folículos que ainda não atingiram a fase de desvio, de modo a tornarem-se responsivos ao LH administrado no D9. Existe ainda, a possibilidade do FSH favorecer o aumento da expressão de receptores de LH nas células da granulosa, como indicam os resultados obtidos *in vitro* por Nogueira et al.²¹. Estes autores observaram aumento na expressão das isoformas LHR nas células da granulosa de zebuínos cultivadas na presença de FSH, quando comparadas a células cultivadas na ausência desta gonadotrofina.

Recentemente, Rosa et al.¹⁶ relataram, na raça Angus, que a adição de LH às duas últimas doses de FSH, aumentaram significativamente a qualidade dos embriões, quando comparados aos embriões de doadoras que não receberam LH ou foram tratadas apenas com eCG no último dia do tratamento superestimulatório P-36.

5. Conclusão

Conclui-se que a eCG pode ser substituída por pLH, no último dia do tratamento superestimulatório sem prejudicar a produção de embriões viáveis. Novos experimentos estão sendo realizados para verificar se a combinação FSH+LH pode ser benéfica para a produção de embriões na raça Nelore.

Agradecimentos

A Estação Experimental Hildergard G. V. Pritzelwitz (Londrina-PR) pela cessão da infraestrutura utilizada no experimento e à FAPESP pelo auxílio financeiro e pelas bolsas (A.C.S. Oliveira, M.C.C. Mattos e M.R. Bastos).

Referências

- [1] MAPLETOFT, R.J., PIERSON, R.A. Factors affecting superovulation in the cow: practical considerations. **IETS Embryo Transfer Newsl.** v. 11, p. 14-24, 1993.
- [2] BARROS, C.M., NOGUEIRA, M.F.G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1483-1496, 2001.
- [3] BARUSELLI, P.S., SÁ FILHO, M.F., MARTINS, C.M., NASSER, L.F., NOGUEIRA, M.F.G., BARROS, C.M., BÓ G.A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 65, p. 77-88, 2006.
- [4] BARROS, C.M., ERENO, R.L., SIMÕES, R.A.L., FERNANDES, P., BURATINI, J., NOGUEIRA, M.F.G. The use of knowledge regarding LH receptors to improve superstimulatory treatment in cattle. **Reprod. Fertil. Develop.** v. 22, p. 132-137, 2010.
- [5] BARCELOS, A.C.Z., GOUVÊA, L.M., MENEGUEL, M., BARCELOS, D.S., BARCELOS, L.N., TRINCA, L.A., BARROS, C.M. Efeito benéfico da substituição das

- duas últimas doses de pFSH por eCG no protocolo superestimulatório P-36, em vacas Nelore. **Acta Sci. Vet.** v. 35, p. 1260 (resumo), 2007.
- [6] FERNANDES, P. **Expressão dos transcritos do receptor de LH em células da granulosa de fêmeas Nelore submetidas ou não à superestimulação ovariana.** 2008, 71f. Botucatu, SP. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.
- [7] MURPHY B.D.; MARTINUK S.D. Equine chorionic gonadotrophin. **Endocrine Reviews.** v. 12, p. 27-44, 1991.
- [8] MATTOS, M.C.C., BASTOS, M.R., GUARDIEIRO, M.M., CARVALHO, J.O., MOURÃO, G.B., BARROS, C.M., SARTORI, R. Improvement of embryo quality by the replacement of the last two doses of porcine follicle-stimulating hormone by equine gonadotropin in superstimulated Sindhi donors. **Reprod. Fertil. Develop.** v. 22, p. 364 (abstract), 2011.
- [9] LOWMAN, B.G.; SOMERVILLE, S.H. **Condition Scoring of Cattle.** Edinburgh: College of Agriculture. v. 6, p. 1-31, 1976.
- [10] BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa.** Iowa State University Press, 1989.
- [11] SIMÕES, R.A.L., SATRAPA, R.A., ROSA, F.S., PIAGENTINI, M., CASTILHO, A.C.S., ERENO, R.L., NOGUEIRA, M.F.G., BURATINI, J., BARROS, C.M. Follicular diameter, ovulation rate, and LH receptor gene expression in Nelore cows. **Reprod. Fertil. Develop.** v. 22, p. 270 (abstract), 2010.
- [12] NETO, A.S., SANCHES, B.V., BINELLI, M., SENEDA, M.M., PERRI, S.H., GARCIA, J.F. Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. **Theriogenology**, v. 63, p. 1249-1255, 2005.

- [13] SARTORI, R., SARTOR-BERGFELT, R., MERTENS, S.A., GUENTHER, J.N., PARRISH, J.J., WILTBANK, M.C. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **J. Dairy Science**, v. 85, p. 2803-2812, 2002.
- [14] SAS Institute Inc. SAS/STAT Software, Release 9.2. Cary: **SAS Institute Inc.**, 2002-2008.
- [15] REANO, I., CARBALLO, D., TRIBULO, A., TRIBULO, P., BALLA, E., BÓ, G.A., 2009. Efecto de la adición de eCG a los tratamientos superovulatorios con Folltropin-V en la producción de embriones de donantes de embriones. In: **Anais VIII SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCION ANIMAL**, Cd, Córdoba, Argentina, 2009.
- [16] ROSA, F.S., BONOTTO, A.L.M.; TRINCA, L.A.; NOGUEIRA, M.F.G., BARROS, C.M. Eficiência do protocolo supervovulatório P-36, associado à administração eCG ou LH em doadoras da raça Angus. **Acta Sci. Vet.**, v. 38, p. 711 (resumo), 2010.
- [17] BÓ, G.A., BARUSELLI, P.S., CHESTA, P.M., MARTINS, C.M. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. **Theriogenology**, v. 65, p. 89-101, 2006.
- [18] REE, T.O., COLAZO, M.G., LAMONT, A.G., KASTELIC, J.P., DYCK, M.K., MAPLETOFT, R.J., AMETAJ, B.N., AMBROSE, D.J. The effect of porcine luteinizing hormone in the synchronization of ovulation and corpus luteum development in nonlactating cows. **Theriogenology**, v. 72, p. 120-128, 2009.
- [19] BARUSELLI, P.S., MARQUES, M.O., REIS, E.L., NASSER, L.F.T., SILVA, R.C.P., MENEGATTI, J.A., VALENTIN, R., SANTOS, I.C.C. Adequação da dose de FSH (Folltropin-v) em protocolos de superovulação de vacas Nelore (*Bos indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo (SOTF). **Acta Sci. Vet.** v. 31, p. 244-245, 2003.

- [20] MAPLETOFT, R.J., STEWARD, K.B., ADAMS, G.P. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod. Nutr. Develop.*, v. 42, p. 601-611, 2002.
- [21] NOGUEIRA, M.F.G., BURATINI, J. JR., PRICE, C.A., CASTILHO, A.C., PINTO, M.G., BARROS, C.M. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. ***Mol. Reprod. Develop.***, v.74, p. 680-686, 2007.

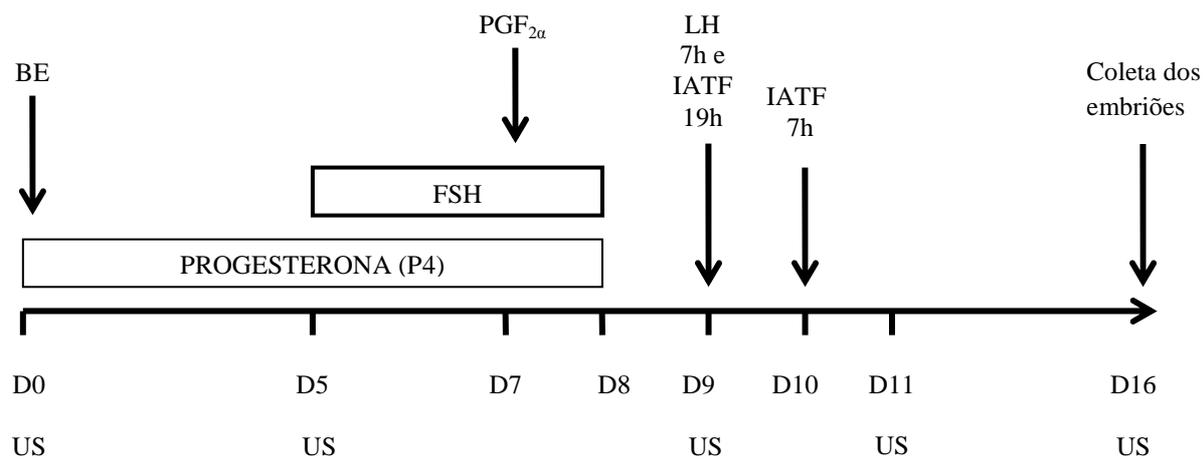


Figura 1: Tratamento superestimulatório P-36 utilizado nas vacas Nelore do Grupo P-36 (controle).

BE = benzoato de estradiol; US = ultrassom; FSH = hormônio folículo estimulante; PGF_{2α} = prostaglandina; eCG = gonadotrofina coriônica equina; LH = hormônio luteinizante; IATF = inseminação artificial em tempo fixo.

Tabela 1. Média (\pm EPM) do número de folículos maiores que 6 mm presentes no D9 do protocolo superestimulatório, taxa de ovulação 48 horas após a administração de LH (D11), número de corpos lúteos no momento da coleta de embriões, estruturas colhidas, embriões viáveis, taxa de viabilidade e número total de embriões viáveis em vacas Nelore (n = 25) tratadas com os protocolos P-36 (controle), P-36/eCG, P-36/LH2 e P-36/LH4.

	P-36	P-36/eCG	P-36/LH2	P-36/LH4
Folículos > 6 mm (D9)	30,2 \pm 2,6	28,3 \pm 2,6	28,6 \pm 2,5	26,3 \pm 2,6
Taxa de ovulação (D11,%)	60,7	67,8	50,6 ⁺	55,4
Corpos lúteos	16,8 \pm 2,1	19,2 \pm 2,4 [*]	12,7 \pm 2,0	12,3 \pm 1,5
Estruturas colhidas	8,6 \pm 1,6	9,6 \pm 1,5	6,9 \pm 1,4	7,4 \pm 1,3
Embriões viáveis	3,3 \pm 0,7	4,5 \pm 0,5	3,7 \pm 0,8	4,2 \pm 1,0
Estruturas não fertilizadas	2,8 \pm 0,7	2,0 \pm 0,5	1,2 \pm 0,5	0,5 \pm 0,2
Taxa de viabilidade	35,5	42,4	41,7	44,2
Total de embriões viáveis	83	112	87	106

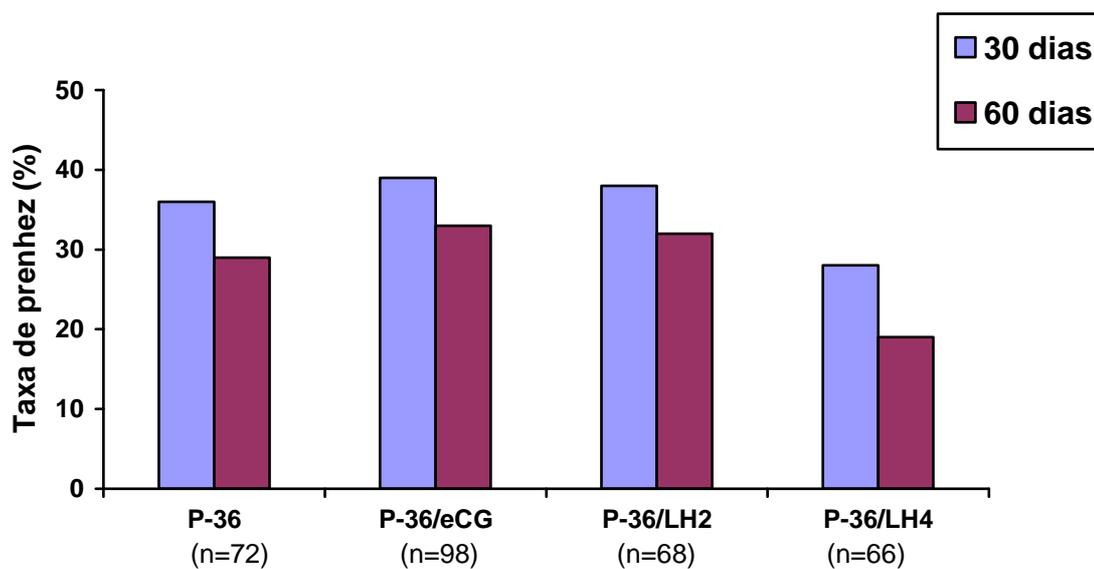
^{*} Significativamente diferente ($p < 0,05$) quando comparados aos grupos LH2 e LH4.

⁺ Quando comparado ao Grupo eCG ($p = 0,06$)

Tabela 2. Número total de embriões classificados como G I, G II, G III de acordo com suas características morfológicas, obtidos em vacas Nelore tratadas com P-36 (controle), P-36/eCG, P-36/LH2 e P-36/LH4.

Classificação	Controle	eCG	LH2	LH4
GI	21	46	33	39
GII	28	32	28	30
GIII	34	34	26	37

Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos.



Não houve diferença significativa entre os tratamentos

Figura 2. Taxas de prenhez obtidas após a transferência de embriões frescos, vitrificados e congelados produzidos em vacas Nelore tratadas com P-36 (controle), P-36/eCG, P-36/LH2 e P-36/LH4.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Normas editoriais

O periódico *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* é publicado bimestralmente pela Fundação de Medicina veterinária (FUMVET) e destina-se a publicar trabalhos científicos sobre medicina veterinária e ciências afins. Os trabalhos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Comissão Editorial, com assessoria de especialistas da área (*peer review*). A lista de colaboradores (relatores) é publicada no último fascículo/ano de cada volume. Os trabalhos cujos textos necessitem de revisões ou correções que não puderem ser feitas pelos editores serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade dessa revista. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. No momento da submissão do trabalho à revista é obrigatório apresentar a aprovação do protocolo experimental por Comitê de Ética. Qualquer que seja o tipo do trabalho deverá ser inédito e destinar-se exclusivamente a esse periódico, sendo obrigatório anexar declaração assinada por todos os autores expressando concordância no pagamento de tarifa como condicionante à sua publicação. Os trabalhos para publicação deverão ser encaminhados a: Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science Setor de Publicação Av. Prof. Dr. Orlando de Marques Paiva, 87 Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" CEP 05508-270 – São Paulo – SP – Brasil Telephone: 0055 11 3091 1472/ 3091 7636 Fax: 0055 11 3091 7636 e-mail: bjvras@fumvet.com.br

Artigo completo

1 - Limitar-se ao máximo de dez páginas digitadas, dentro da estrutura do item cinco, não sendo contadas as páginas onde constem tabelas e ilustrações. **2** - Ser escrito em língua portuguesa ou em língua inglesa. **3** - Usar somente nomenclaturas oficiais e abreviaturas consagradas, não empregando abreviaturas no título do artigo. **4** – Ser estruturado dentro dos seguintes itens: a) Introdução; b) Materiais e Métodos; c) Resultados; d) Discussão; e) Conclusões; f) Referências; g) Resumo/Palavras-chave; Abstract/Key-words. **5** - Apresentar, obrigatoriamente, dois resumos, nos idiomas inglês e português, não devendo ultrapassar 250 (duzentas e cinquenta) palavras, seguidos das palavras-chave, limitadas a cinco, que correspondem a palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo.

Nota prévia

1 - Limitar-se ao máximo de três páginas digitadas. **2** - Ser escrita em língua portuguesa ou em língua inglesa. **3** – Usar somente nomenclaturas oficiais e abreviaturas consagradas, não empregando abreviaturas no título do artigo. **4** - Não devem ser subdivididos em seções separadas (Introdução, Materiais e Métodos etc.), mas devem apresentar, obrigatoriamente, dois resumos, com palavras-chave, conforme descrito na apresentação de Artigo completo, além de referências.

Artigos de revisão

Só poderão ser publicados por especialistas de renome a convite da Comissão Editorial. Não devem ser subdivididos em seções separadas (Introdução, Materiais e Métodos etc.), mas devem apresentar, obrigatoriamente, dois resumos, com palavras-chave, conforme descrito na apresentação de Artigo completo, além de referências.

Apresentação dos trabalhos

1 - Digitação: original em CD, devidamente identificado com o título do artigo e nome do(s) autor(es) e três cópias impressas, inclusive suas tabelas e referências; deve ser digitado, obrigatoriamente, em formato A4 (21,0 x 29,7cm), espaço duplo, em uma só face de papel, margens de 2,5cm, fonte Times New Roman tamanho 10 e numeração consecutiva das páginas. Ilustrações e legendas devem ser relacionadas em folhas separadas. O texto dos artigos deve ser apresentado utilizando-se o editor de texto Microsoft Word. **2 - Página de rosto:** elemento obrigatório, onde deve conter o título do artigo, nome(s) do(s) autor(es) e instituição de origem. **Observar que unicamente nesta página conste a identificação dos autores, para o devido sigilo e imparcialidade.** No rodapé da página deve-se mencionar o endereço completo (inclusive e-mail) do autor para correspondência. Se o artigo for subvencionado, mencionar a instituição que o patrocinou, assim como os agradecimentos; **3 - Tabelas:** devem ser numeradas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, seguido de local e data. Na montagem das tabelas seguir: IBGE. **Normas de apresentação tabular.** 3. ed. Rio de Janeiro: IBGE, 1993. 61 p. O limite de tabelas por trabalho é de cinco. Em casos excepcionais, conhecida a opinião da Comissão Editorial, este número poderá ser ultrapassado. No texto devem ser indicadas pela palavra Tabela (por extenso). **4 - Ilustrações** (fotografias, gráficos, quadros, desenhos ou esquemas): devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e citadas como figuras no texto. As fotografias devem ser identificadas somente com o título do artigo, além de conter no verso a indicação de seu correto posicionamento. Fotos fornecidas em papel fotográfico devem ter ótima resolução, em CD com a extensão .TIF e resolução mínima de 300 dpi's. As legendas de ilustrações coloridas devem estar referenciadas somente por setas, símbolos e pontos quando publicadas em preto e branco. Gráficos, desenhos ou esquemas devem ser fornecidos no CD, impressos em folha à parte identificada somente com o título do artigo, além das respectivas legendas. Todas as ilustrações devem ser fornecidas em três

vias. Os gráficos devem trazer sempre os valores numéricos que lhes deram origem. Desenhos e esquemas devem apresentar boa qualidade técnica e artística. Aceitar-se-á um número máximo de nove ilustrações por artigo, sugerindo-se a seguinte distribuição: três fotografias, três gráficos e três desenhos/esquemas. Acima deste limite, as despesas com reprodução correrão por conta do autor. Ilustrações coloridas, independentemente do número, serão cobradas. No texto devem ser indicadas pela palavra Figura (por extenso). Indicar junto ao título da ilustração o local e data. **5 - Referências:** devem ser numeradas, ao final do artigo, de forma consecutiva de acordo com a ordem em que forem sendo citadas no texto. Os títulos de periódicos devem ser mencionados de maneira uniforme, de preferência todos por extenso. As referências seguem a normalização da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 6023, que deve ser consultada para outros tipos de documentos aqui não exemplificados. **Exemplos de Apresentação dos Autores nas Referências:** BONAGURA, J. D. (**um autor**) SANTOS, J. A.; MELLO, M. R. (**dois autores**) BENNETT, B. T.; ABEE, C. R.; HENRICKSON, R. (**três autores**) VILELA, D.; MARTINS, C. E.; BRESSAN, M.; CARVALHO, L. A. [...] (**quatro autores ou mais**) ou VILELA, D. et al. (sem itálico).

Exemplo de periódico

1 KOTZEKIDOV, P.; BLOUKAS, J. G. Effect of protective cultures and packaging film permeability on shelflife of sliced vacuum-pocked cooked ham. **Meat Science**, v. 42, n. 3, p. 333-345, 1996.

Exemplo de livro

2 HALLIWELL, R. E. W.; GORMAN, N. T. **Veterinary clinical immunology**. London: W. B. Saunders, 1989. 548 p.

Exemplo de autor diferente para o livro e capítulo

3 FENNER, W. R. Avaliação neurológica dos pacientes. In: ETTINGER, S. J. **Tratado de medicina interna veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 577-606.

Exemplo de mesmo autor para o livro e capítulo

4 THORTON, H. Deleterius changes in meat. In: THORTON, H. **Aspects of meat inspection**. London: Thindall & Cassel, 1973. p. 63-72.

Exemplo de tese

5 BIRGEL, E. H. **Estudo do quadro eritrocitário de caprinos (Capra hircus, L.) normais criados no Estado de São Paulo:** influências de fatores raciais, sexuais, etários e alimentares. 1973. 92 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1973.

Exemplo de evento

6 OLIVEIRA, C. A. Hormonoterapia em cadelas e gatas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9., 1991, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1991. p. 100-111.

Exemplo de livro eletrônico

7 POORE, M. H. **Alternative feeds for beef cattle**. North Carolina: North Carolina Corporative Extension Service,

1994. Disponível em: <<http://www.ces.ncsu.edu/drought/dro-28.html>>. Acesso em: 23 abr. 2007.

Exemplos de artigos de periódicos eletrônicos

8 MENDONÇA JR., C. X.; MARTINS, A. P.; MORI, A. V.; SILVA, A. B.; MORI, C. S. Efeito da adição de óleo de peixe à dieta sobre o desempenho e níveis de lipídeos plasmáticos e de colesterol no ovo de galinhas poedeiras. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 1, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/cgi_bin/wxis.exe/iach/scielo>. Acesso em: 31 jan. 2001

6 - Citações: utilizar o Sistema Numérico. As citações devem ser feitas por numeração única e consecutiva em sobrescrito, utilizando-se algarismos arábicos, remetendo à lista de referências na mesma ordem em que aparecem no texto. Quando indispensável para a compreensão do texto, combinar o(s) sobrenome(s) do(s) autor(es) com a indicação do número. Neste caso, a citação será pelo sobrenome de cada autor ou pelo nome da entidade responsável que aparece na respectiva referência. Quando se tratar de três autores, todos devem ser citados. No caso de mais de três autores, a citação deve ser acompanhada pelo sobrenome do primeiro autor seguido da expressão et al. (sem itálico). Se a citação estiver inserida no texto utilizar letras maiúsculas e minúsculas; se estiver entre parênteses utilizar somente letras maiúsculas.

Exemplos:

Um autor

Segundo Yanaguita⁹ ou
(YANAGUITA⁹)

Dois autores

Soares e Alves¹³ ou (SOARES; ALVES¹³)

Três autores

Bennett, Abee e Henrickson¹² ou (BENNETT; ABEE; HENRICKSON¹²)

Quatro ou mais autores

Vilela, Martins, Bressan e Carvalho²⁶ ou Vilela et al.²⁶ (VILELA; MARTINS; BRESSAN; CARVALHO²⁶) OU (VILELA et al. 26)

Tarifa de publicação: A tarifa de publicação de R\$ 40,00, por página impressa, será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. Se houver necessidade de impressão em cores, as despesas correrão por conta dos autores.