

UNIVERSIDADE JOSÉ ROSÁRIO VELLANO – UNIFENAS

TÉLCIO PARREIRA MINARÉ

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA SUPEROVULAÇÃO EM BOVINOS DA RAÇA
GIR BASEADA NA MOBILIZAÇÃO DA POPULAÇÃO FOLICULAR**

Alfenas

2013

TÉLCIO PARREIRA MINARÉ

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA SUPEROVULAÇÃO EM BOVINOS DA RAÇA
GIR BASEADA NA MOBILIZAÇÃO DA POPULAÇÃO FOLICULAR**

Dissertação apresentada como exigência para
obtenção do grau de Mestre em Medicina
Veterinária da UNIVERSIDADE JOSÉ DO
ROSÁRIO VELANNO - UNIFENAS.

Orientador: Prof. Dr. João Henrique Moreira
Viana

Alfenas - MG

2013

Minaré, Tércio Parreira

Avaliação da eficiência da superovulação em bovinos da raça GIR baseada na mobilização da população folicular /.— Tércio Parreira Minaré.—2013.

57 f.

Orientador : Prof. Dr João Henrique Moreira Viana
Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária –Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, 2013.

1.Crescimento folicular 2. FSH 3.Embriões 4. Zebu
I. Título

CDU : 636.05 (043)



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: "AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA SUPEROVULAÇÃO EM BOVINOS DA RAÇA GIR BASEADA NA MOBILIZAÇÃO DA POPULAÇÃO FOLICULAR".

Autor: Tércio Parreira Minaré

Orientador: Prof. Dr. João Henrique Moreira Viana

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA – REPRODUÇÃO ANIMAL** pela Comissão Examinadora.


Prof. Dr. João Henrique Moreira Viana
Orientador


Prof. Dr. Eduardo Kenji Nunes Arashiro


Profa. Dra. Fernanda da Silva Gonçalves

Alfenas, 16 de maio de 2013.


Prof. Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes
Coordenador do Mestrado em Medicina
Veterinária - Reprodução Animal

Dedico este momento tão importante a DEUS, por estar sempre olhando por mim. A este também dedico a minha MÃE, que batalha todos os dias para que momentos como estes aconteçam, e ao meu PAI, que mesmo ausente, faz parte dessa conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me deu força, coragem e sabedoria.

À UNIFENAS, pela grande oportunidade de me permitir cursar o Mestrado. Serei sempre grato.

À PROSUP/CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro na realização deste trabalho.

Ao Orientador Prof. Dr. João Henrique Moreira Viana pela oportunidade, orientação e paciência.

Ao Prof. Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes, pelo voto de confiança, ensinamentos e auxílio fundamental na execução deste trabalho.

Aos professores da pós-graduação desta Faculdade cujas disciplinas ministradas nos fazem pensar diferente, motivados a seguir neste caminho da ciência.

À EMBRAPA GADO DE LEITE e BIOTRAN LTDA pela disponibilização dos animais para a pesquisa.

Ao colega Arashiro, no grandioso auxílio na parte prática deste trabalho.

A todos os funcionários que me acompanharam no campo, ajudando intensamente na realização desse trabalho.

A toda minha família, em especial à minha Mãe e minha “Vó” Luzia que acompanharam toda minha caminhada.

Aos meus amigos e colegas que sempre apoiaram e estiveram ao meu lado nos momentos bons e ruins.

Aos colegas da pós-graduação Amarildo, Carol, Claudio, Paulo, Thais, que se tornaram grandes amigos.

A todas as pessoas que, de alguma maneira, sempre me apoiaram. Muito obrigado a todos.

Obrigado Senhor e caminhe sempre conosco!

"O Mestre na arte da vida faz pouca distinção entre o seu trabalho e o seu lazer, entre a sua mente e o seu corpo, entre a sua educação e a sua recreação, entre o seu amor e a sua religião. Ele dificilmente sabe distinguir um corpo do outro. Ele simplesmente persegue sua visão de excelência em tudo que faz, deixando para os outros a decisão de saber se está trabalhando ou se divertindo. Ele acha que está sempre fazendo as duas coisas simultaneamente."

(Texto budista)

RESUMO

A maioria dos estudos que objetiva otimizar a técnica de superovulação em bovinos considera como parâmetros de avaliação apenas o número de corpos lúteos (CL) formados e de embriões recuperados. Desse modo, variações na população folicular no início do tratamento e parâmetros de resposta relacionados ao crescimento folicular são frequentemente desconsiderados, gerando vieses de interpretação. O objetivo deste trabalho foi caracterizar as variações individuais na eficiência relativa e absoluta da superovulação, com base na população folicular ovariana. Foram utilizadas vacas não lactantes (n=2) e novilhas (n=15) da raça Gir, mantidas em condições semelhantes de manejo e alimentação. Quatro dias antes do início do tratamento superovulatório, o crescimento folicular foi sincronizado pela inserção de um dispositivo intravaginal de progesterona e aplicação de benzoato de estradiol. As superovulações foram iniciadas no D1 pela administração de 200 UI de FSHp, segundo protocolo convencional. O número e o tamanho dos folículos presentes no dia anterior ao início (D0) e durante a superovulação (D1 a D4), assim como o número de CL presentes no dia da coleta (D12), foram avaliados por ultrassonografia. A população folicular foi classificada em função do tamanho (≤ 4 mm, 5-7 mm, ≥ 8 mm), e nas variações do percentual de folículos entre as classes de tamanho utilizadas para cálculo de eficiência relativa. A eficiência absoluta foi calculada pela razão entre o número de embriões recuperados e de folículos ≤ 4 mm presentes no D1. Os resultados são apresentados como média \pm EPM. Como esperado, observou-se uma grande variação individual de resposta, tanto considerando o número de CL formados (0 a 28, média de 12,6 \pm 2,1; CV=68,2%) quanto de embriões recuperados (0 a 15, média de 5,1 \pm 1,1; CV=92,4%). Não houve aumento (P>0,05) no número total de folículos presentes ao longo do tratamento, e a correlação entre população folicular total e o número de CL ou de embriões permaneceu relativamente constante entre o D1 e o D4 (r=0,56 a 0,65 e r=0,70 a 0,79, respectivamente; P<0,01). O tratamento superovulatório resultou em uma mobilização progressiva (P<0,05), porém parcial, da população de folículos pequenos para classes de tamanho superiores. A eficiência relativa do tratamento estimulatório foi de 41,9 \pm 5,5% (0 a 75,6%), e este foi o indicador parcial com maior correlação (R=0,80; P<0,0001) com a eficiência absoluta do processo (12,2 \pm 2,1%, variando de 0,0 a 25,0%). Em análise retrospectiva, demonstrou-se que doadoras com eficiência relativa acima de 50% apresentavam um número de folículos ≤ 4 mm no D1 semelhante

àquelas com eficiência abaixo de 50% ($41,6 \pm 6,8$ vs. $42,1 \pm 3,1$; $P < 0,001$), mas produziram mais CL e embriões ($17,8 \pm 2,5$ e $7,6 \pm 1,7$ vs. $6,9 \pm 2,1$ e $2,4 \pm 0,9$, respectivamente; $P < 0,001$). Conclui-se que diferenças individuais na população folicular inicial e na resposta ao FSH são importantes fontes de variação na resposta superovulatória, e devem ser consideradas nos delineamentos experimentais. Agradecimentos: FAPEMIG, CAPES, Biotran LTDA.

Palavras-chave: Crescimento folicular, FSH, embriões, zebu

ABSTRACT

Most of the previous studies aiming to improve superovulation evaluated only differences in the number of corpora lutea (CL) observed and of embryos recovered. Therefore, differences in total follicular population before hormonal stimulation and in response parameters associated to follicle growth were frequently neglected, causing bias in the conclusion. The aim of the present study was to characterize individual variation in both relative and absolute efficiency of superovulation, based on ovarian follicular population. Non-lactating Gir breed cows (n=2) and heifers (n=15), kept under the same management, were used. Four days before the start of superovulatory treatment, follicular growth was synchronized by the insertion of an intravaginal device of progesterone and estradiol benzoate application. Superovulations started on D1 with the injection of 200 UI FSHp, following a conventional protocol. The number and diameter of the follicles present before (D0) and during superovulation (D5 to D8), as well as the number of CL at flushing (D12), were evaluated by ultrasonography. Follicular population was ranked according to size (≤ 4 mm, 5-7 mm, ≥ 8 mm), and changes in the percentage of follicles in each size class were used to calculate relative efficiency. The absolute efficiency was determined by the ratio number of embryos recovered : number of follicles ≤ 4 mm on D5. Results are shown as mean \pm SEM. As expected, there was a great individual variation in the superovulation outcomes, both considering the number of CL (0 to 28, mean 12.6 \pm 2.1; CV=68.2%) and embryos collected (0 to 15, mean 5.1 \pm 1.1; CV=92.4%). There was no increase (P>0.05) in total follicular population during treatment, and the correlation between the number of follicles during superovulation and the further number of CL or embryos remained relatively constant between D5 and D8 (r=0.56 to 0.65 and r=0.70 to 0.79, respectively; P<0.01). FSH treatment induced a progressive (P<0.05) but partial mobilization of small follicles to larger size classes. The relative efficiency of the follicle growth stimulation was 41.9 \pm 5.5% (0 to 75.6%), and this was the endpoint with the largest correlation (R=0.80; P<0.0001) with the absolute efficiency of the process (12.2 \pm 2.1%, ranging from 0.0 to 25.0%). Retrospective analysis demonstrated that donors with relative efficiency >50% had a number of follicles ≤ 4 mm on D1 similar to those with efficiency <50% (41.6 \pm 6.8 vs 42.1 \pm 3.1; P<0.001), but produced more CL and embryos (17.8 \pm 2.5 and 7.6 \pm 1.7 vs 6.9 \pm 2.1 and 2.4 \pm 0.9, respectively; P<0.001). In conclusion, individual differences in follicular population and in the follicle response to

FSH are important sources of variation in superovulation results, and shall be taken into account for experimental design. Acknowledgement: FAPEMIG, CAPES, Biotran LTDA.

Keywords: Follicle growth, FSH, embryos, zebu cattle

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema ilustrativo dos procedimentos realizados durante o experimento. A emergência de nova onda de crescimento folicular foi sincronizada pela inserção de um dispositivo liberador de progesterona e injeção de 2mg de benzoato de estradiol (BE) quatro dias antes do início da superestimulação (D1) com FSH em doses decrescentes com intervalos de 12 horas, sendo uma pela manhã (M) e outra à tarde (T). As avaliações ultrassonográficas iniciaram no D0. Análogo de prostaglandina F2 α (PGF2 α) foi administrado no D3 pela tarde e D4 pela manhã. O dispositivo foi removido no D4 pela manhã e a ovulação induzida com análogo sintético de GnRH no início do D5. A IATF aconteceu 12 e 24 horas após a indução da ovulação, e a coleta realizada 7 dias após o tratamento com GnRH.....32.

Figura 2: Imagem ultrassonográfica do ovário esquerdo do animal 9300 no D1 do tratamento, ilustrando população folicular ovariana no início da superestimulação.....34.

Figura 3: Imagem ultrassonográfica do ovário esquerdo do animal 9300 no D4 do tratamento superestimulatório, ilustrando vários folículos com formato não esférico, ocasionados pela compressão por folículos adjacentes.....34.

Figura 4: Participação das doadoras (n=17) no total de embriões produzidos.....36.

Figura 5: Número de folículos (>3mm) presentes durante a superovulação (média \pm EPM) e correlação entre população folicular total e número de corpos lúteos (—) e de embriões (---) observados por ocasião da coleta.....37.

Figura 6: Variação no número de folículos (média \pm EPM) em cada classe de tamanho durante a superovulação. ^{A,B,C} Diferenças na mesma classe de folículos, ao longo dos dias, estão identificadas por letras diferentes (Tukey; P<0,05).....38.

Figura 7: Participação de folículos de diferentes classes de tamanho na composição da população folicular total durante a superovulação.....39.

Figura 8: Variação na correlação entre resposta superovulatória (considerando-se corpos lúteos ou embriões) e o número de folículos ao final da superovulação (D4), considerando-se diferentes tamanhos mínimos de folículos.....41.

Figura 9: a,b - Exemplos de variação na população folicular em cada classe de tamanho ao longo da superovulação. a) Animal sem resposta ao tratamento; b) Animal com boa resposta ao tratamento.....43.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Matriz de correlações entre o número de folículos de diferentes classes de tamanho e em diferentes dias da superovulação (SOV) e o número de corpos lúteos (CL) e embriões observados no dia da coleta.....40.

Tabela 2: Indicadores de eficiência do processo de produção de embriões bovinos por superovulação.....42.

Tabela 3: Resultados da superovulação (média±EPM) após a estratificação das doadoras de acordo com a eficiência relativa na indução do crescimento folicular.....42.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 HIPÓTESE	16
3 OBJETIVO	17
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
4.1 Dinâmica Folicular Ovariana	20
4.1.1 Recrutamento	21
4.1.2 Seleção.....	22
4.1.3 Dominância.....	23
4.2 Superovulação	25
4.2.1 Protocolos superovulatórios.....	28
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
5.1 Local e Animais.....	31
5.2 Sincronização	31
5.3 Superovulação e coleta de embriões.....	32
5.4 Monitoramento da dinâmica folicular	33
5.5 Parâmetros de avaliação.....	35
5.6 Análises estatísticas	35
6 RESULTADOS	36
7 DISCUSSÃO	44
8. CONCLUSÃO	48
9 REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

As chamadas biotecnologias da reprodução são ferramentas de fundamental importância no melhoramento genético em bovinos, seja pela possibilidade de reduzir o intervalo de gerações, pela formação de grupos contemporâneos e de meio-irmãos para as avaliações de desempenho, como também pela geração de novos modelos experimentais e otimização da reprodução de animais identificados como geneticamente superiores. Essa importância é refletida no largo emprego de técnicas reprodutivas no Brasil. Em 2009, foram comercializadas perto de oito milhões de doses de sêmen e transferidos mais de 280.000 embriões, o que coloca o país em uma posição de destaque no desenvolvimento e aplicação destas tecnologias (VIANA et al., 2010). O Brasil já respondia no ano de 2008 por ¼ do total de transferências e a maior produção de embriões bovinos por fertilização *in vitro* do mundo (THIBIER, 2008).

Apesar do significativo avanço ocorrido na produção e transferência de embriões no Brasil, diversas aplicações potenciais da técnica não vêm sendo efetivamente exploradas, como seu uso em rebanhos leiteiros, que corresponde hoje a menos de 10% do total de transferências (VIANA e CAMARGO, 2007). Essa limitação é decorrente da baixa eficiência e grande variabilidade dos resultados, particularmente na produção *in vivo* de embriões (também conhecida como transferência de embriões convencional). Diversos estudos têm sido realizados visando otimizar os protocolos de sincronização e superovulação em raças taurinas (BO et al., 2008; DRIANCOURT et al., 1991) e zebuínas (BARUSELLI et al., 2006; BARROS e NOGUEIRA, 2005). Contudo, em ambos os casos, os procedimentos apenas permitem explorar o potencial inerente às doadoras, que são a principal fonte de variação no processo.

As limitações inerentes aos procedimentos de superovulação resultaram na gradual substituição dessa técnica pela produção *in vitro* de embriões (PIV), fator evidenciado a partir de 2005 (VIANA et al., 2010). Contudo, a PIV se mostrou bastante eficiente em raças zebuínas, mas não em taurinas, resultando no estabelecimento de estratégias diferentes para a produção de embriões em função do grupamento genético (*Bos taurus* ou *Bos indicus*). Dessa forma, nas raças leiteiras taurinas, a superovulação convencional ainda é a técnica de eleição para a produção de embriões, respondendo por 85% do total de transferências (VIANA et al.,

2010). Contudo, mesmo nessas raças os resultados da TE convencional são caracterizados pela elevada instabilidade dos resultados entre animais e também entre procedimentos.

Na produção *in vitro* de embriões, a possibilidade da avaliação e seleção inicial dos COCs (complexos cumulus oócito) recuperados e, posteriormente, o monitoramento dos resultados parciais nas etapas de maturação, fecundação e cultivo *in vitro*, possibilitam a rápida identificação dos pontos de estrangulamento da técnica, e, conseqüentemente, progressos na adequação dos procedimentos. Já na produção *in vivo*, a avaliação dos resultados geralmente é feita apenas por ocasião da coleta dos embriões quando várias fontes de variação não podem ser mais corretamente identificadas, o que torna o ajuste dos protocolos extremamente empírico e impossibilita uma avaliação da real eficiência relativa da superovulação.

2 HIPÓTESE

A produção de embriões por superovulação não está apenas associada, no início do tratamento, à população folicular, mas também às taxas de mobilização e crescimento dos folículos durante o processo superestimulatório.

3 OBJETIVO

Gerais:

Caracterizar a eficiência da superovulação em bovinos da raça Gir baseada no monitoramento da resposta da população folicular ovariana ao tratamento.

Específicos:

Caracterizar a produção *in vivo* de embriões da raça Gir;

Avaliar a dinâmica da distribuição da população folicular durante a superovulação;

Definir parâmetros de referência relativos às taxas de mobilização, crescimento folicular e ovulação durante a superovulação.

4 REVISÃO DE LITERATURA

No atual contexto de evolução da produtividade na pecuária nacional, associado às evoluções científicas e tecnológicas, várias biotecnologias ligadas à reprodução animal vêm sendo desenvolvidas e aprimoradas com o intuito de aumentar a eficiência reprodutiva, maximizando a produção de animais geneticamente superiores, visando o aproveitamento deste material genético para obtenção do maior número de descendentes em um curto período de tempo. Dentre as principais biotecnologias adotadas e trabalhadas no Brasil, é importante ressaltar, inicialmente, o papel da Inseminação Artificial (IA), sendo a primeira biotecnologia adotada nos sistemas de produção brasileiros, a qual visava à multiplicação genética de touros de alto valor. Com a introdução de esquemas de ovulações múltiplas, recuperação e transferência de embriões (TE), mais conhecida como *Multiple Ovulation and Embryo Transfer* (MOET), junto com a criopreservação de embriões na década de 80, a bovinocultura passou a ter em mãos ferramentas para aumentar o número de gestações provenientes de fêmeas de alto mérito genético (RODRIGUES, 2001).

A transferência de embriões iniciou-se em 1890, quando Walter Heape tentou, sem sucesso, a técnica em cobaias. A técnica foi utilizada pela primeira vez em coelhas. As pesquisas com bovinos tiveram início por volta de 1912, em San Antônio, Texas, EUA. Em 750 coletas de embriões, quatro gestações foram obtidas, porém nenhuma veio a termo. A Universidade de Wiscosin (EUA), em 1951, conseguiu o primeiro bovino nascido de 32 transferências de embrião do mundo, após mais de cinco anos de tentativas frustradas. Somente em 1960, nessa mesma universidade, é que se descobriu a importância da sincronização de estro entre doadoras e receptoras. A TE teve grande expansão a partir da década de 70, com a criação da IETS (Sociedade Internacional de Transferência de Embriões) no Colorado, EUA (revisado por GONÇALVES et al., 2002).

No Brasil, a TE teve início na década de 70, quando foi registrado o primeiro nascimento de um produto gerado por transferência de embrião congelado importado e, pouco depois, o primeiro nascimento a partir de embrião coletado e transferido no país. A atividade apresenta, portanto, quase 40 anos de história no país (RUBIN, 2005). Nesse período, ocorreram profundas modificações na atividade, quer sejam tecnológicas, conceituais, de abrangência ou de impacto econômico para a pecuária.

Somente a partir da década de 80 é que essa técnica foi realmente difundida a nível nacional, principalmente depois da criação, em 1985, da SBTE (Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões), atualmente chamada de Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, o que vem proporcionando, ao longo dos anos, eventos técnico-científicos visando respaldar os profissionais da área (RODRIGUES, 2001).

O paradigma de atividade elitista e desconectada da realidade da pecuária foi substituído pelo de ferramenta amplamente demandada pelo setor produtivo e, hoje, indispensável aos programas de melhoramento animal. De importador de tecnologia, o Brasil tornou-se referência mundial na área. Mas nenhum outro exemplo retrata melhor essa revolução do que a expansão na produção *in vitro* de embriões e a mudança decorrente no mercado observada nos últimos anos (VIANA e CAMARGO, 2007).

A produção *in vivo* foi a primeira tecnologia de embriões com aplicação comercial expressiva. Este procedimento envolve inicialmente a indução hormonal de ovulações múltiplas em espécies que apresentam em condições naturais predominantemente uma (vaca, égua) ou duas (cabras, ovelhas) ovulações por ciclo (BETTERIDGE, 2003).

Os programas de MOET baseiam-se na indução ou sincronização do estro e superovulação das doadoras, seguida da monta natural ou inseminação artificial. Os embriões podem então ser recuperados por técnicas não cirúrgicas e transferidos para receptoras previamente sincronizadas, ou ainda criopreservados. Desse modo considerando que, na natureza, apenas uma pequena fração do potencial genético e reprodutivo dos animais é utilizada, essa alternativa tem representado um avanço substancial na eficiência reprodutiva (REICHENBACH et al., 2002; BETTERIDGE, 2003).

A transferência de embriões abriu um novo horizonte para os programas de seleção e de melhoramento genético, antes limitados ao uso da inseminação artificial (BERGMANN e PENNA, 1999). Se adequadamente orientada, a transferência de embriões pode representar não somente a possibilidade de multiplicação de genótipos superiores, mas, também, a possibilidade de conservação e multiplicação de animais ou raças ameaçadas de extinção. As vantagens da técnica como ferramenta de multiplicação de animais de alto valor foram rapidamente reconhecidas pelo setor produtivo, e um número crescente de criadores passou a adotá-la, resultando em significativa expansão no uso da TE a partir da década de 90 (RUBIN, 2005). Na espécie bovina, programas de seleção genética baseados na transferência de embriões, conhecidos como Núcleos MOET, têm sido implantados concomitantemente ao esquema de teste de progênie. (PENNA et al., 1998; TEODORO et al., 2006). Os resultados

alcançados evidenciaram o potencial desse sistema para acelerar o progresso genético nestes rebanhos (PEIXOTO et al., 2006).

A principal limitação da produção de embriões por superovulação não é a média de estruturas viáveis recuperadas por coleta (THIBIER, 2008), mas a inconstância de resultados. A variável é caracterizada por coeficientes de variação superiores a 100% e, em qualquer população bovina, é possível encontrar animais com resposta alta, média ou baixa. A variabilidade na resposta superovulatória é evidenciada pelos resultados obtidos em animais da mesma idade e condição de manejo, e tratados com hormônios e protocolos similares (DOMINGUEZ, 1995; HANH, 1992), relacionando-se diretamente com a dinâmica folicular ovariana.

4.1 Dinâmica Folicular Ovariana

O processo de crescimento e regressão de folículos antrais, o qual leva ao desenvolvimento do folículo pré-ovulatório no ovário, é conhecido como dinâmica folicular ovariana, que envolve o desenvolvimento sincronizado de um grupo de folículos, com diâmetro de 2 – 4 mm, denominado onda folicular (GINTHER et al., 1989).

Grande atenção foi dada inicialmente à caracterização do padrão de crescimento em ondas e ao processo de divergência e estabelecimento da dominância folicular, não apenas em bovinos, mas em diversas espécies domésticas de interesse zootécnico (GINTHER et al., 2003).

O ciclo estral dos bovinos apresenta, geralmente, duas ou três ondas de crescimento folicular (GINTHER et al., 1996) e, raramente, uma ou quatro ondas. O número de ondas por ciclo estral parece estar associado com o comprimento do ciclo e com a duração da fase luteínica (GINTHER et al., 1989), sendo que diversos fatores influenciam o número de ondas, como nutrição, ordem de partos, condição corporal, lactação, amamentação, idade, raça e ambiente (GINTHER et al., 1996).

Apesar das ondas de crescimento folicular ocorrerem durante o ciclo estral, elas também aparecem em animais pré-púberes, durante a gestação, no período pós-parto e durante a lactação, e em períodos de anestro (AERTS e BOLS, 2010).

Hoje está bem estabelecido que mecanismos autócrinos e parácrinos controlam a ativação de folículos. Os fatores ativadores são originados tanto das células da granulosa que circundam o oócito quanto do próprio oócito. Atualmente se conhece a identidade de alguns fatores oocitários implicados no desenvolvimento folicular inicial, como o *bone morphogenetic protein 15* (BMP15) e o *growth-differentiation factor 9* (GDF9), fatores cuja ausência em animais geneticamente ou (ou experimentalmente) deficientes causa bloqueio nos estágios iniciais da foliculogênese (MCNATTY et al., 2007).

Como resultado da ativação, os folículos iniciam crescimento e progridem pelas fases de folículo pré-antral primário e secundário e atingem o estágio de terciário, com a formação do antro folicular. Tal crescimento folicular é caracterizado pela proliferação e diferenciação das células da granulosa, aumento do volume do oócito, e a formação e proliferação das células da teca. Para a evolução a esses estágios, ocorre inicialmente a aquisição de resposta às gonadotrofinas e, posteriormente, a dependência de estímulo gonadotrófico para manter o crescimento até o estágio pré-ovulatório (revisados por MCNATTY et al., 2007; AERTS e BOLS, 2008).

4.1.1 Recrutamento

Recrutamento implica em um “pool” de folículos antrais que escapam da apoptose devido ao aumento dos níveis circulantes de FSH. A Regressão do folículo dominante (FD) durante uma onda de crescimento, ou a ovulação no final de um ciclo estral, provoca uma elevação transitória da circulação do FSH. Com efeito, a perda do FD é acompanhada por diminuição dos níveis de hormônios sintetizados pelo folículo, tais como o estrógeno e a inibina, resultante através de um mecanismo de feedback negativo em um aumento temporário de secreção de FSH pela hipófise. O FSH é o principal responsável para o recrutamento de um novo grupo de folículos antrais para a próxima onda de crescimento (AERTS e BOLS, 2010).

Aproximadamente 20 a 30 folículos emergem em cada onda folicular, e boa parte destes folículos tem o potencial de atingir o estágio pré-ovulatório, fato que pode ser demonstrado pela possibilidade de se estimular o crescimento e a ovulação de vários folículos pela administração de gonadotrofinas (ADAMS, 1994). Segundo Boni et al. (1997), o número

de folículos recrutados por onda de crescimento folicular é uma característica de alta repetibilidade e, por isso, apresenta diferenças entre indivíduos.

Após o recrutamento, os folículos são submetidos a um processo de seleção, em que concentrações decrescentes de FSH já estão disponíveis para aqueles folículos dependentes desta gonadotrofina. A capacidade do folículo dominante continuar o desenvolvimento em níveis basais de FSH é atribuída a uma mudança na dependência de gonadotrofina FSH para LH. O mecanismo de seleção exata do folículo, no entanto, ainda não está completamente compreendido (AERTS e BOLS, 2010).

4.1.2 Seleção

Durante cada onda ciclo estral, os folículos recrutados são submetidos a um processo de seleção, sendo que, nas espécies monovulatórias, como bovinos e equinos, normalmente um único folículo desenvolve em um FD, enquanto os folículos remanescentes regredirão (GINTHER et al., 2003). Os níveis máximos de FSH na onda de crescimento do primeiro ciclo ocorrem 28 horas após o início do estro (MIHM e AUSTIN, 2002). A produção e secreção de estradiol e inibina pelos folículos em crescimento resulta em supressão da liberação de FSH, apesar de que esses folículos são ainda dependentes de FSH para o seu crescimento continuado. Na espécie bovina, estudos têm revelado que os folículos com um diâmetro de 3 mm não suprimem a secreção de FSH, mas adquirem a capacidade de suprimir a FSH quando o folículo alcança um diâmetro de 5 mm (GIBBONS et al. 1999).

A divergência (ou desvio) folicular é definida pela diferença nas taxas de crescimento entre os dois maiores folículos, sendo marcada pela continuidade no desenvolvimento do maior folículo e declínio ou parada no crescimento dos outros (GINTHER et al., 2003).

Em um experimento utilizando novilhas, foi estabelecido que todos os folículos antrais têm o potencial para se tornar FD. Assim, verificou-se que um folículo selecionado aleatoriamente com 5mm de diâmetro se tornou dominante quando todos os folículos remanescentes foram ablacionados (GIBBONS et al. 1999). Em pesquisa semelhante, o maior folículo foi extirpado antes do desvio, e o segundo maior folículo se tornou dominante (GINTHER et al. 1996).

4.1.3 Dominância

O desvio é precedido por uma fase de crescimento comum dos folículos, em que todos apresentam condições de futura dominância, mas ainda sem exercê-la. Este evento se inicia quando os dois maiores folículos alcançam uma média de 8,5 e 7,7 mm de diâmetro nos *Bos taurus* (GINTHER et al., 2003). Em animais *Bos indicus*, existem dois trabalhos com resultados diferentes. Castilho (2003) relata que a divergência folicular ocorre quando o folículo dominante e subordinado apresentam respectivamente, 7,2 e 5,5 mm, ao passo que Sartorelli (2003) descreve o momento do desvio com os seguintes diâmetros: 5,7 mm para o FD e 5,5 mm para o subordinado. Este evento ocorre em torno de 3 dias após o pico de FSH.

O folículo selecionado é, portanto, definido como folículo dominante e suprime ativamente o crescimento dos subordinados pela secreção de estradiol e inibina. Assim, o FD inibe a secreção de FSH, mas é capaz de continuar seu crescimento mesmo com níveis basais de FSH. As baixas concentrações de FSH têm a vantagem de impedir o surgimento de um novo grupo de crescentes folículos. Inicialmente, pensava-se que a diferenciação entre FD e folículos subordinados ocorria de forma gradual, que começou no início da onda de folículos em crescimento. No entanto, novas investigações revelaram que a diferença nos diâmetros dos dois maiores folículos é estabelecida em menos de oito horas, quando então o maior folículo atinge um estágio decisivo de desenvolvimento e o rápido estabelecimento do mecanismo de desvio bloqueia o segundo maior folículo antes dele alcançar diâmetro similar (GINTHER et al., 2000).

O LH desempenha um papel fundamental durante a fase de dominância. Foi relatado presença de receptores de LH nas células da granulosa do futuro FD 8 horas antes do início do desvio. Em folículos bovinos em geral, receptores de LH aparecem quando o folículo adquire um diâmetro de 8 mm. Assume-se que o FD sofre uma transição em gonadotrofina dependência de FSH para LH (MIHM et al., 2006).

Ao contrário dos subordinados, o folículo dominante é capaz de produzir estrógenos mesmo frente a baixas concentrações de gonadotrofinas. Aparentemente, a maior quantidade de IGF-I livre no líquido folicular no momento da divergência é o principal fator que lhe atribui tal capacidade (GINTHER et al., 2003), pois aumentaria sua sensibilidade ao FSH, permitindo a manutenção da esteroidogênese até que possa responder ao LH (SIQUEIRA,

2007). O folículo dominante em bovinos provavelmente será aquele que utilizar com sucesso ações recíprocas entre gonadotrofinas, IGF-I e estradiol, visando estimular o seu crescimento e, concomitantemente, inibir o crescimento dos seus contemporâneos (SIQUEIRA, 2007). Apesar da concentração de IGF-1 total não ter se mostrado diferente no fluido folicular de folículos dominantes em relação a folículos subordinados (DE LA SOTA et al., 1996), a concentração de IGF-1 livre foi maior no fluido folicular do maior folículo comparado ao segundo maior da mesma onda, antes mesmo da observação de diferenças na concentração de estradiol ou no diâmetro (BEG et al., 2002). Entretanto, nesse mesmo período, as concentrações de IGF-1 livre diminuem progressivamente no segundo maior folículo, à medida que a proteína ligante IGFBP-2 aumenta, contribuindo para a redução ou parada de crescimento deste folículo. Portanto, mudanças nos níveis intra-foliculares de IGFBP podem causar alterações na biodisponibilidade de IGF-1 total e livre, e conseqüentemente, aumentar ou diminuir as ações das gonadotrofinas nas células foliculares.

As diferenças na dinâmica folicular entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* são evidentes. Em animais da raça holandesa, predominam-se duas e três ondas de crescimento folicular por ciclo estral, enquanto que, em zebuínos, ocorre maior incidência de 3 e até 4 ondas de crescimento folicular. O número de folículos em cada onda de crescimento folicular é maior em fêmeas *Bos taurus indicus* ($33,4 \pm 3,2$) do que em *Bos taurus taurus* ($25,4 \pm 2,5$), representando uma influência direta na eficiência das técnicas de transferência de embriões e de OPU-PIV e favorecendo as fêmeas zebuínas (BARUSELLI et al., 2007).

No entanto, os diâmetros foliculares de *Bos taurus indicus* são inferiores aos de *Bos taurus taurus*, como também o diâmetro do corpo lúteo. Enquanto o CL de zebuínos apresenta diâmetro de 17 a 21 mm, o de taurinos alcança média de 20 a 30 mm, proporcionando, nas fêmeas zebuínas, menor quantidade de tecido luteínico e, conseqüentemente, menor concentração plasmática de progesterona produzida pelo CL do que nas taurinas (BARUSELLI et al., 2007).

A dinâmica folicular afeta diretamente os resultados da produção de embriões, seja *in vivo* ou *in vitro* (HUMBLLOT et al., 2005). O efeito deletério da presença de folículos dominantes funcionais sobre o número e qualidade de embriões recuperados após a superovulação convencional (BÓ et al., 2008) é bem conhecido. O desenvolvimento de diferentes estratégias de sincronização do crescimento folicular permite hoje estabelecer protocolos que evitem esses efeitos e maximizem a produção de embriões (BARUSELLI et al., 2006). Os protocolos de sincronização de doadoras, contudo, apenas garantem a presença

de folículos com maior viabilidade pelo controle do momento da emergência, não havendo evidências de que afetem o número de folículos na onda, ou ainda, a resposta dos folículos ao tratamento.

Poucos estudos investigaram a dinâmica do crescimento folicular em resposta a superovulação, caracterizando, dia a dia, as alterações na população folicular (VIANA et al., 1999). A disponibilização de novas ferramentas de avaliação da função ovariana, como a possibilidade de coletar amostras do conteúdo folicular por meio de aspiração folicular orientada por ultrassonografia (OPU) e analisar o conteúdo, como também avaliar o fluxo sanguíneo ovariano por Color-Doppler, incentivou novas pesquisas na área. Esses estudos mostraram uma relação direta da vascularização folicular com a composição do fluido folicular e com a tensão de oxigênio, que, por sua vez, afetam o desenvolvimento oocitário (SUTTON et al., 2003). A avaliação do fluxo sanguíneo folicular mostrou ter valor preditivo nos resultados da fertilização *in vitro* em humanos, considerando o potencial de implantação dos embriões e as taxas de gestação (CHUI et al., 1997). Contudo, apenas recentemente, esta tecnologia passou a ser empregada em grandes animais para avaliação da função ovariana (MIYAMOTO et al., 2006).

4.2 Superovulação

O manejo reprodutivo é, sem dúvida, um dos segmentos mais importantes na produção animal. Ele repercute diretamente nos índices de produtividade dos rebanhos, sendo um dos principais enfoques na bovinocultura. Progressos imensos têm sido obtidos nos conhecimentos sobre a regulação endócrina da fertilidade. A identificação e purificação dos hormônios peptídeos e esteroides, bem como o conhecimento de suas ações, têm permitido avanços em terapia endócrina como também nas biotecnologias. Os hormônios sintéticos têm sido amplamente empregados na reprodução animal, apresentando características químicas e atividade semelhante à dos hormônios naturais, interferindo no metabolismo animal e propiciando um melhor desempenho reprodutivo aos indivíduos, quando utilizados corretamente.

O processo superovulatório constitui uma das etapas iniciais dos programas de MOET e tem como princípio o fornecimento de preparações hormonais que estimulam o crescimento

e, subsequente, ovulação de uma série de folículos. Passados mais de 50 anos do nascimento do primeiro bovino oriundo da técnica de TE, pequenas variações, como mudanças nos dias de aplicação, nas doses de um hormônio, ou a adição de um novo hormônio num protocolo já existente, foram realizadas e demonstraram em seus resultados que, se avaliadas individualmente, parecem irrelevantes, entretanto, as diferenças podem ser consideráveis levando-se em conta o tamanho do rebanho e a qualidade genética dos doadores (FERNANDES, 2003).

O impacto da técnica é evidente na multiplicação dos rebanhos, programas de melhoramento genético, zootécnicos e sanitários, bem como no resgate e conservação de germoplasmas animais, nos trâmites comerciais (nacional ou internacionalmente), e no apoio a outras biotécnicas relacionadas (FERNANDES, 2003).

Segundo Fernandes (2003), a superovulação (SOV) é a etapa menos previsível dentro da técnica de TE. São vários os fatores que influenciam os resultados e, mesmo quando praticamente não ocorre nenhuma alteração de uma superovulação para outra, em um mesmo animal, os resultados podem ser diferentes.

O inconveniente da técnica é a baixa consistência na produção de embriões viáveis pelas doadoras. Um terço das doadoras tratadas não responde a SOV, por outro lado, um terço produz em média três embriões e somente o terço restante resulta em grande número de embriões transferidos (GALLI et al., 2003).

A variabilidade na resposta superovulatória e o tempo e esforço necessários para o tratamento foram os principais fatores para o uso em larga escala da tecnologia. Dentre os fatores que podem ser responsabilizados por tais variações, podemos citar influências do tipo, o grau de pureza, a dose e o esquema de administração do hormônio, estado nutricional da doadora, histórico reprodutivo, idade, estação do ano, efeito de repetidas superovulações, raça, além da condição folicular no início do tratamento superovulatório que pode estar diretamente relacionada à fase ideal para se iniciar a estimulação hormonal exógena (MAPLETOFT e PIERSON, 1994; BÓ et al., 1995).

O hormônio Folículo Estimulante (FSH) está associado à emergência da onda de crescimento folicular durante o ciclo estral e tem sido demonstrada sua ação em bezerras, durante a prenhez, e no período pós-parto (GINTHER et al., 1996).

A estimulação hormonal com FSH pode ser iniciada antes da emergência da onda folicular ou no dia da emergência, ou seja, antes do estabelecimento da dominância folicular. O início de tratamentos com gonadotrofinas na presença de um folículo dominante resulta em

uma redução da resposta superovulatória. Uma alternativa para se obter uma melhor resposta superovulatória é controlar a dinâmica folicular (BÓ et al., 2000), ou a emergência da nova onda folicular em programas de transferência de embriões. A sincronização da emergência da onda folicular tem como objetivo remover o efeito supressivo do folículo dominante e iniciar uma nova onda (BÓ et al., 1995), situação que ocorre normalmente em animais entre os dias 8 e 12 após a detecção do estro.

Existem diferentes métodos pelos quais se pode controlar a dinâmica folicular em bovinos. Estudos demonstraram que a eliminação do folículo dominante, por métodos físicos ou hormonais, resulta em aumento de FSH e, dessa forma, emergência de uma nova onda folicular num período de tempo conhecido (ADAMS et al., 1992; GINTHER et al., 2000). A possibilidade de utilização de estradiol (BÓ et al., 1995) ou estradiol associado a progestágenos para sincronizar a onda folicular vem sendo muito utilizado em protocolos de superovulação em bovinos. Quando a progesterona é usada associada ao estrógeno, a emergência da nova onda folicular ocorre cerca de 4 ou 5 dias após o tratamento. Bó et al (2000) demonstraram que o início do tratamento com gonadotrofinas 4 dias após o tratamento com progesterona e estradiol resulta em resposta superovulatória semelhante à iniciada na emergência da segunda onda folicular ou entre os dias 8º e 12º do ciclo estral.

Trabalhos utilizando métodos hormonais para sincronizar a onda folicular para início da SOV demonstraram que não há comprometimento da morfologia do embrião ou taxa de gestação, quando comparado ao protocolo padrão, o que elimina a necessidade de observar o cio, permitindo a superovulação de grande número de doadoras em curto período de tempo (OLIVEIRA, et al., 2002; BARUSELLI et al, 2006). No entanto, a abordagem mais comum utilizada para a sincronização da onda folicular, o estradiol, não pode ser usado em muitos países devido à preocupação sobre os efeitos de substâncias estrogênicas na cadeia alimentar.

Além dos métodos hormonais empregados para promover a sincronização da emergência da onda folicular em vacas, o método físico através da aspiração folicular guiada por ultrassonografia transvaginal vem sendo utilizado com sucesso. Bergfelt et al. (1994), realizaram aspiração folicular de todos os folículos maiores ou iguais a 5 mm de diâmetro, em estágio aleatório do ciclo estral, e constataram aumento no nível sérico de FSH em 24 horas e emergência da nova onda folicular em torno de 48 horas após a aspiração folicular. O mesmo foi constatado por trabalhos com aspiração somente do folículo dominante. Apesar da eficácia, é necessário o uso de equipamentos especializados e pessoal técnico treinado, o que se tornou inviável no campo.

Programas atuais de superovulação utilizam a técnica de sincronização da onda folicular para iniciar o tratamento superovulatório no melhor momento possível, isto é, no início do desenvolvimento dos folículos. A redução das variações nas respostas superovulatórias e uma maior eficiência na recuperação de embriões constituem os principais desafios da técnica.

Aplicações de FSH exógeno ou gonadotrofina coriônica equina (eCG) são amplamente utilizados em programas de MOET. Geralmente, injeções subcutâneas ou intra-musculares de eCG ou FSH estimulam o crescimento de folículos adicionais, os quais ovulam espontaneamente sem a necessidade de LH ou hCG. Como o FSH tem uma meia-vida mais curta que o eCG, geralmente é necessário dividir a dose total e injetar com intervalos de 12 horas ao longo de três a quatro dias, tempo necessário para que os níveis séricos dessa gonadotrofina sejam mantidos para permitir a ação superovulatória desejada (JAINUDEEN et al., 2004). Portanto, a superestimulação requer atenção aos detalhes e aumenta a possibilidade de falhas devido a manuseamento incorreto e erros durante os tratamentos.

O desenvolvimento folicular tem sido estudado, principalmente, em fêmeas de genótipos taurinos. Porém, são escassos os estudos deste processo em animais zebuínos, especialmente da raça Gir. Os animais desta raça têm apresentado resultados insatisfatórios nos protocolos clássicos utilizados para superovulação em programas de transferência de embriões.

4.2.1 Protocolos superovulatórios

A superestimulação de doadoras bovinas tem sido amplamente estudada na tentativa de desenvolver protocolos que melhorem a produção de embriões ou facilitem o manejo dos animais (revisado por BARROS et al., 2001; BARUSELLI et al., 2006). A detecção do estro é particularmente difícil no gado zebuíno devido à curta duração do comportamento estral e elevada incidência de estro noturno (PINHEIRO et al., 1998). Para superar este problema, vários tratamentos hormonais foram propostos para controlar o crescimento folicular e o momento da ovulação, a fim de permitir a inseminação artificial em tempo-fixo (BÓ et al., 2003; BARROS e ERENO, 2004; BARUSELLI et al., 2004). De forma similar, o desenvolvimento folicular e a ovulação podem ser manipulados farmacologicamente para

melhorar programas de superestimulação e transferência de embriões bovinos (BARUSELLI et al., 2006).

De acordo com Jainudeen et al. (2004), a sincronização do cio tanto das doadoras quanto das receptoras pode ser obtida através de uma ou duas administrações de prostaglandina F₂ α ou análogos. No caso de duas aplicações, estas devem ser efetuadas a intervalo de 11 – 14 dias em fêmeas que apresentam ciclo estral regular. Porém, Andrade et al (1999) relataram que a vantagem de utilizar dispositivos intravaginais ou implantes auriculares para a sincronização do estro de doadoras e receptoras consiste na possibilidade do tratamento superovulatório ter início, independentemente da fase do ciclo estral.

O uso de uma fonte de progesterona (dispositivos intravaginais), associada à administração intramuscular de estrógeno, promove atresia folicular e origina uma nova onda folicular, cerca de 4 dias após o início dos tratamentos (revisto por BÓ et al., 2003). A fim de evitar a presença de um folículo dominante, o tratamento superestimulatório com FSH começa justamente no início da nova onda folicular, ou seja, 4 dias após a colocação do dispositivo intravaginal e administração de estrógeno. Dois dias após a primeira injeção de FSH, é administrada uma dose luteolítica de PGF₂ α e 12 horas mais tarde o dispositivo intravaginal é removido. As doadoras são inseminadas artificialmente 12 e 24 horas após a detecção do cio. Seis a sete dias mais tarde, os embriões são colhidos, classificados e congelados ou inovulados. Este protocolo apresenta duas vantagens: pode ser iniciado em qualquer dia do ciclo estral e dispensa a observação do cio base. Porém, ainda requer a detecção do estro para a inseminação artificial das doadoras.

Barros e Nogueira (2005) 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. Estes protocolos não aumentaram significativamente o número de embriões viáveis quando comparados a protocolos com detecção do estro. Entretanto, com estes tratamentos hormonais, foi possível controlar o momento da ovulação, permitindo a utilização da IATF. A partir desses experimentos, foi desenvolvido um novo protocolo denominado P-36 (BARROS e NOGUEIRA, 2001; 2005), no qual a fonte de progesterona é mantida por até 36 horas após a aplicação de PGF₂ α (daí a denominação P-36) e a ovulação é induzida com LH exógeno, administrado 12 horas após a remoção da fonte de progesterona (ou seja, 48 horas após a aplicação de PGF₂ α). Uma vez que a ovulação ocorre entre 24 e 36 horas após a administração de LH (NOGUEIRA et al., 2007), a IATF é realizada 12 e 24 h após a injeção de LH, evitando a inconveniência da detecção do estro.

A variação individual e o tipo de hormônio são fatores importantes que interferem na resposta superovulatória. O estado ovariano no momento do tratamento parece ser fator determinante na resposta superovulatória, sendo uma característica constantemente pesquisada para elevar o índice de recuperação de embriões viáveis. Quando há resposta exagerada (formação de muitos CLs por ovário) ou excesso de folículos não ovulados, sugere-se a redução da dosagem ou troca do hormônio. Segundo Cabodevila e Torquatri (2001), os efeitos negativos de altas doses de gonadotrofinas parecem estar relacionados a fenômenos de superestimulação ovárica. Os animais superestimulados geralmente apresentam uma menor taxa de recuperação (oócitos e embriões em função dos corpos lúteos palpados ou observados), possivelmente pelas seguintes razões: retenção de oócitos nos folículos luteinizados e nos corpos lúteos; retenção de oócitos e/ou embriões nos ovidutos; nível muito alto de estrógenos produzidos pelos grandes folículos não ovulados que bloqueariam a capacidade de captação das fímbrias com a conseguinte caída de oócitos na cavidade abdominal; transporte de gametas; taxa de fertilização, entre outros (VIANA et al, 1999; CABODEVILA e TORQUATRI, 2001).

Essas variações mostram que apesar da TE ser uma técnica mundialmente conhecida e do grande avanço ocorrido nos últimos 50 anos, há necessidade de maiores estudos e adequação dos protocolos na sua individualidade para cada animal para obtenção de respostas cada vez melhores.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local e Animais

O presente experimento foi realizado no Campo Experimental José Henrique Bruschi da Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco - MG, e na fazenda da Biotran® LTDA em Alfenas – MG, executado no decorrer do mês de Janeiro de 2013.

Foram utilizadas 17 doadoras, sendo vacas não lactantes (n=2) e novilhas (n=15) da raça Gir (*Bos indicus*) puros de origem (PO), em condições corporais variando de 3 a 4 (escala 1 – 5) ou seja, não utilizando animais magros e nem obesos. Os animais foram submetidos a um exame clínico e ginecológico e somente utilizaram-se aqueles sem alterações clínicas e problemas reprodutivos. Durante o período do experimento, os animais foram mantidos em condições semelhantes em regime de pasto formado com capim Braquiária (*Braquiaria decumbens*), recebendo água e mistura mineral *ad libitum*.

5.2 Sincronização

Inicialmente, a emergência de nova onda de crescimento folicular dos animais foi sincronizada por meio de protocolo convencional, caracterizado pela inserção de um dispositivo intravaginal de progesterona e injeção de 2 mg de benzoato de estradiol. A eficiência dessa associação na sincronização da emergência da onda folicular foi descrita em fêmeas *Bos taurus* (CARVALHO, 2004; BÓ et al., 1995), e *Bos indicus* (CARVALHO, 2004).

5.3 Superovulação e coleta de embriões

As superovulações foram realizadas pela indução exógena do crescimento folicular por meio de oito aplicações decrescentes de FSHp (Pluset®, Calier), realizadas a cada 12 h, numa dose total de 200UI, na presença de um dispositivo intravaginal de progesterona, conforme protocolo convencional utilizado em zebuínos (BARUSELLI et al., 2006). A luteólise foi induzida com 0,500 mg de cloprostenol (Ciosin®, MSD), administrada meia dose no D3 à tarde e o restante no D4 pela manhã, juntamente com a retirada do dispositivo intravaginal. Após 24h da última aplicação de FSH, as ovulações foram induzidas pela administração de análogo sintético de GnRH (Sincroforte®, Ouro Fino). As doadoras foram inseminadas 12 e 24 h após a indução da ovulação, com sêmen de touros da mesma raça. A coleta de embriões foi realizada pela técnica não cirúrgica, no sétimo dia após a inseminação. Resumidamente, o útero foi cateterizado e infundido com solução de DPBS, o lavado então recuperado em filtro com malha de 80 µm e encaminhado ao laboratório para identificação e classificação morfológica das estruturas produzidas. Os procedimentos da coleta e classificação dos embriões foram realizados por um mesmo profissional.

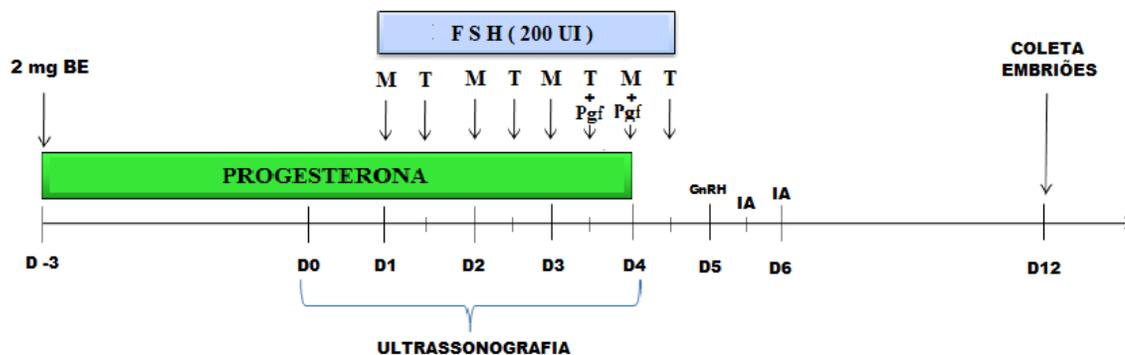


FIGURA 1 – Esquema ilustrativo dos procedimentos realizados durante o experimento. A emergência de nova onda de crescimento folicular foi sincronizada pela inserção de um dispositivo liberador de progesterona e injeção de 2mg de benzoato de estradiol (BE) quatro dias antes do início da superestimulação (D1) com FSH em doses decrescentes com intervalos de 12 horas, sendo uma pela manhã (M) e outra à tarde (T). As avaliações ultrassonográficas iniciaram no D0. Análogo de prostaglandina F2α (PGF2α) foi administrado no D3 pela tarde e D4 pela manhã. O dispositivo foi removido no D4 pela manhã e a ovulação induzida com análogo sintético de GnRH no início do D5. A IATF aconteceu 12 e 24 horas após a indução da ovulação, e a coleta realizada 7 dias após o tratamento com GnRH.

A partir dos dados encontrados, foi avaliada a relação entre o número de estruturas e de embriões viáveis recuperados com o padrão de mobilização folicular em resposta à superovulação (percentual de folículos que mudaram de classe de tamanho por dia de tratamento e percentual total de folículos que atingiram diâmetro compatível com ovulação) e taxa de crescimento folicular.

5.4 Monitoramento da dinâmica folicular

Os exames ultrassonográficos foram realizados com um aparelho portátil de ultrassonografia equipado com um transdutor linear retal de 8,0 MHz (MyLab 30 Gold, Esaote, Genova). Cada animal foi devidamente contido em um brete apropriado, as fezes presentes no reto foram retiradas e o transdutor do aparelho ultrassonográfico inserido e posicionado manualmente pelo operador. O D0 neste experimento foi definido como o dia anterior ao início do tratamento superovulatório, no qual teve início a avaliação ultrassonográfica a fim de identificar a população folicular presente nos ovários (FIGURA 2). As outras avaliações ocorreram com intervalos de 24 h durante os quatro dias da superestimulação. Após a identificação dos ovários, foram feitos vídeos de ambos os ovários de cada animal e salvos em arquivo no próprio aparelho. Após o término das avaliações, as imagens eram analisadas e o número e diâmetro dos folículos presentes foi mensurado e registrado em planilhas individuais. Os folículos, então, foram categorizados conforme seu diâmetro. Quando a imagem do folículo analisado não era esférica (FIGURA 3), o diâmetro foi estimado pela média entre a maior e menor medida transversal. Avaliou-se a resposta ovariana à superestimulação pela contagem do número de CL por ultrassonografia no dia da coleta.



FIGURA 2 - Imagem ultrassonográfica do ovário esquerdo do animal 9300 no D1 do tratamento, ilustrando população folicular ovariana no início da superestimulação.



FIGURA 3 - Imagem ultrassonográfica do ovário esquerdo do animal 9300 no D4 do tratamento superestimulatório, ilustrando vários folículos com formato não esférico, ocasionados pela compressão por folículos adjacentes.

5.5 Parâmetros de avaliação

Eficiência relativa: indicadores parciais de eficiência do processo superovulatório:

a) Taxa de superestimulação: número de folículos > 7 mm no D4 em relação ao número de folículos < 4 mm no D1;

b) Taxa de ovulação: número de corpos lúteos na coleta em relação ao número de folículos > 7 mm no D4;

c) Taxa de recuperação: número de embriões em relação ao número de corpos lúteos na coleta;

Eficiência absoluta: indicador de eficiência global do processo, baseada na razão do número de embriões em relação ao número de folículos < 4 mm no D1.

5.6 Análises estatísticas

Os resultados referentes ao número de corpos lúteos formados e de embriões totais e viáveis recuperados foram demonstrados por análise estatística descritiva. Para efeito de classificação de resposta, foram consideradas, arbitrariamente, produções de 0 a 2 embriões (resposta ruim), 3 a 4 embriões (resposta intermediária), e acima de 8 embriões (resposta boa). A relação entre o número de folículos totais e em cada classe de tamanho, ao longo da superovulação, e o número de corpos lúteos formados e de embriões recuperados foi determinada pelo método das correlações de Pearson. A relação entre estágio de desenvolvimento folicular e probabilidade de ovulação foi avaliada por análise de regressão, utilizando-se um modelo polinomial de 3ª ordem. O número de folículos em cada classe de tamanho ao longo da superovulação foi submetido à análise de variância e diferenças entre médias comparadas pelo teste de Tukey. As doadoras foram ranqueadas em função da eficiência da superestimulação ovariana, e diferenças entre o número de folículos >7mm, corpos lúteos, embriões e eficiência global foram comparados pelo teste de Wilcoxon. Os dados foram analisados com auxílio do software SAEG (Euclides, 1982). O nível de significância adotado foi de 5%. Os dados foram apresentados como média \pm EPM ou percentuais.

6 RESULTADOS

As doadoras utilizadas no presente experimento apresentaram 215 corpos lúteos por ocasião da coleta, na qual foram recuperados 87 estruturas totais e 30 embriões viáveis ($12,6 \pm 2,1$; $5,1 \pm 1,1$ e $1,8 \pm 0,6$ por doadora, respectivamente). Como esperado, observou-se uma grande variação na resposta entre doadoras (0 a 28 CL e 0 a 15 embriões, CV de 68,2 e 92,4%; respectivamente). Aproximadamente 35% das doadoras (6/17) produziram 75% dos embriões recuperados (Figura 4).

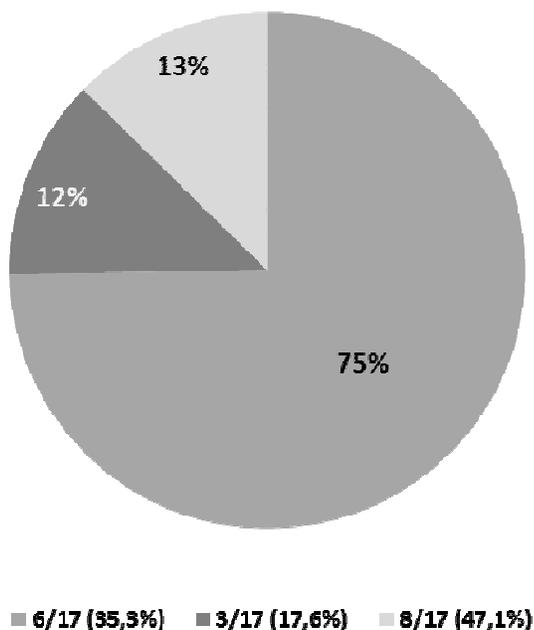


FIGURA 4 - Participação das doadoras (n=17) no total de embriões produzidos.

A análise retrospectiva da população folicular ovariana durante a superovulação demonstrou não haver aumento ($P > 0,05$) no número total de folículos presentes ao longo do tratamento estimulatório (Figura 5). Da mesma forma, a correlação entre população folicular total e o número de corpos lúteos formados ou de embriões recuperados permaneceu relativamente constante entre o D1 e o D4 ($r = 0,56$ a $0,65$; $P < 0,01$ e $r = 0,70$ a $0,79$; $P < 0,01$ para CL e embriões, respectivamente).

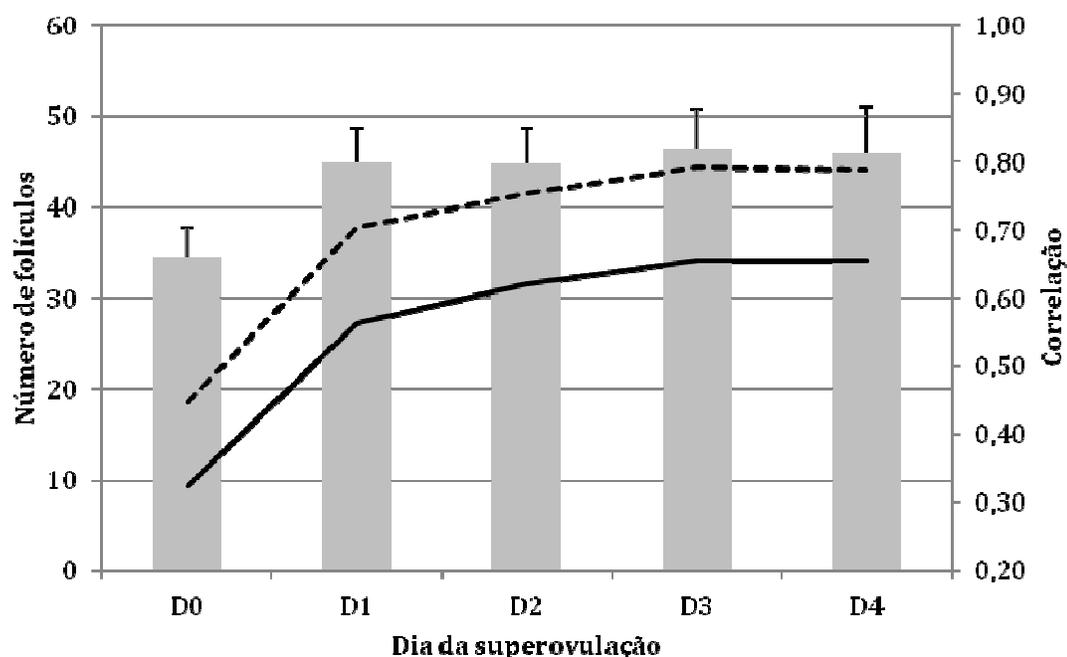


FIGURA 5 - Número de folículos (>3mm) presentes durante a superovulação (média±EPM) e correlação entre população folicular total e número de corpos lúteos (—) e de embriões (---) observados por ocasião da coleta.

A análise da variação na população folicular, quando classificada por tamanho, demonstrou que o tratamento superovulatório resultou em uma redução progressiva ($P < 0,05$) no número de folículos pequenos, em um aumento ($P < 0,05$) transitório (até o D3) no número de folículos médios, e em um aumento ($P < 0,05$) no número de folículos grandes no D4 (Figura 6).

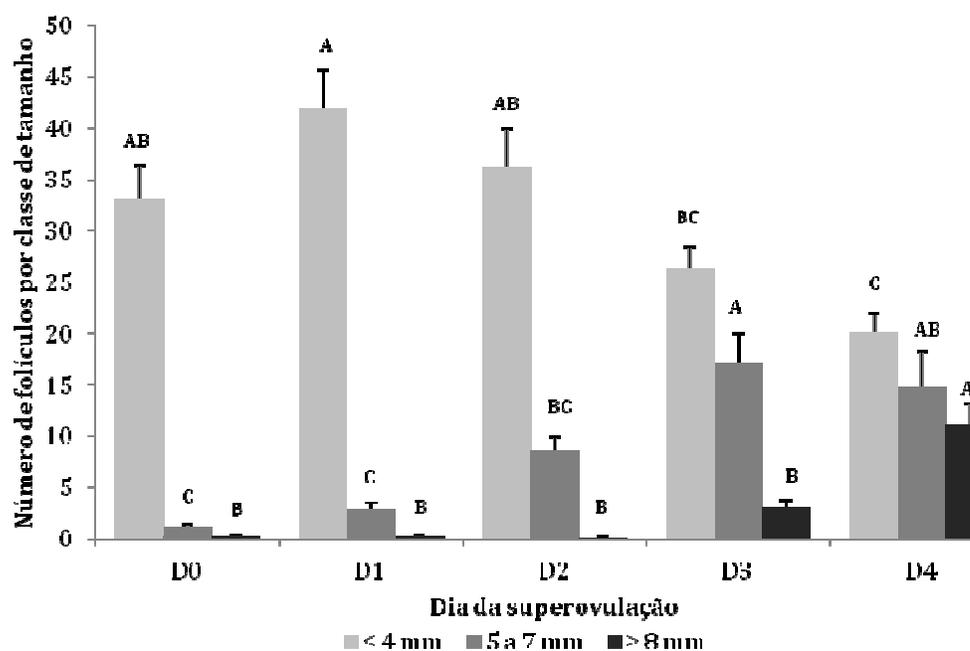


FIGURA 6 - Variação no número de folículos (média±EPM) em cada classe de tamanho durante a superovulação. ^{A,B,C} Diferenças na mesma classe de folículos, ao longo dos dias, estão identificadas por letras diferentes (Tukey; P<0,05).

A mobilização de folículos para classes de tamanho superiores, contudo, não foi completa. A Figura 7 demonstra que, na média, apenas aproximadamente 50% dos folículos pequenos cresceu em resposta ao FSH.

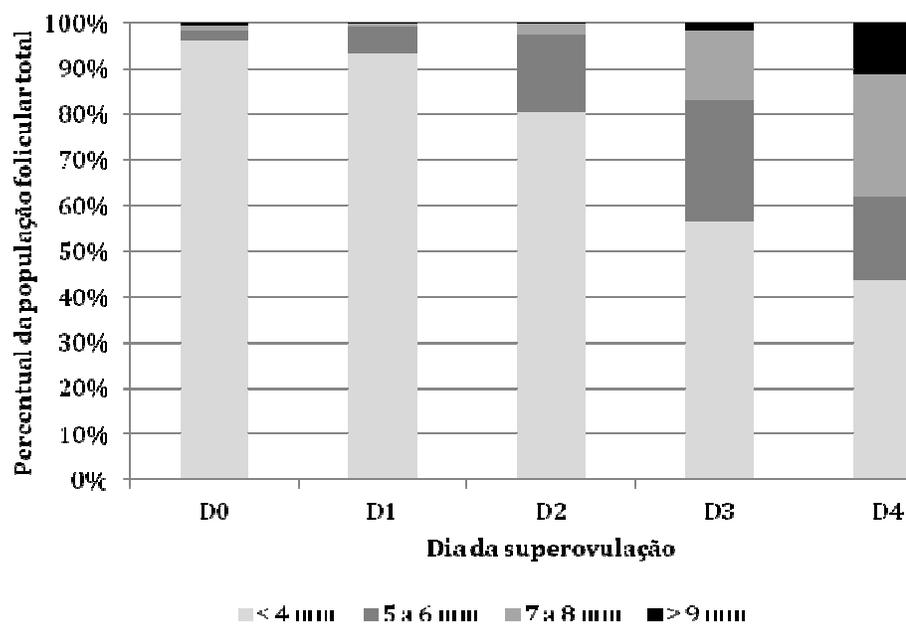


FIGURA 7 - Participação de folículos de diferentes classes de tamanho na composição da população folicular total durante a superovulação.

As correlações entre o número de folículos de diferentes classes de tamanho nos diferentes dias da superovulação e o número de CL observado e embriões recuperados no dia da coleta estão demonstradas na Tabela 1. A magnitude e a significância das correlações variaram de maneira coerente com a mudança de classe de tamanho dos folículos induzida pelo tratamento.

TABELA 1 - Matriz de correlações entre o número de folículos de diferentes classes de tamanho e em diferentes dias da superovulação (SOV) e o número de corpos lúteos (CL) e embriões observados no dia da coleta.

Dia da SOV	Classe	CL		Embriões	
		R	P	R	P
D0	>4mm	0.33	n.s.	0,44	0,05
	5 a 7 mm	0.26	n.s.	0,35	n.s.
	>8mm	-0.44	0.05	-0,33	n.s.
	Total	0.32	n.s.	0,45	0,05
D1	>4mm	0.48	0,05	0,65	0,01
	5 a 7 mm	0.54	0,05	0,33	n.s.
	>8mm	-0.29	n.s.	-0,26	n.s.
	Total	0.56	0,01	0,70	0,001
D2	>4mm	0.40	n.s.	0,60	0,01
	5 a 7 mm	0.67	0,01	0,50	0,05
	>8mm	-0.31	n.s.	-0,18	n.s.
	Total	0.62	0,01	0,75	0,001
D3	>4mm	0.23	n.s.	0,46	0,05
	5 a 7 mm	0,70	0,001	0,75	0,001
	>8mm	0,52	0,05	0,50	0,05
	Total	0,66	0,01	0,79	0,0001
D4	>4mm	-0,10	n.s.	0,07	n.s.
	5 a 7 mm	0,52	0,05	0,65	0,01
	>8mm	0,85	0,0001	0,80	0,0001
	Total	0,65	0,01	0,79	0,0001

Para a avaliação da eficiência relativa, realizou-se a análise da relação entre estágio de desenvolvimento folicular e probabilidade de ovulação, pela correlação entre o número de folículos acima de um determinado diâmetro e o número de CL e embriões recuperados na coleta. Em ambos os casos, as correlações significativas ($P < 0,0001$) mais elevadas foram observadas quando foram considerados folículos ≥ 7 mm no D4 (Figura 8).

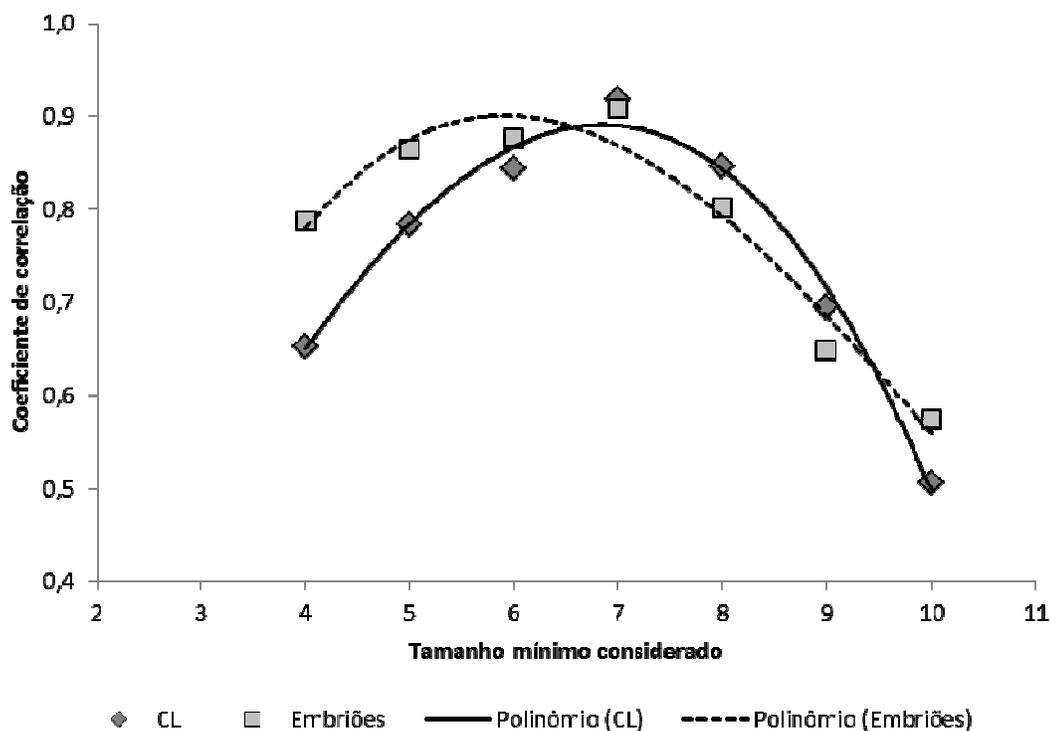


FIGURA 8 - Variação na correlação entre resposta superovulatória (considerando-se corpos lúteos ou embriões) e o número de folículos ao final da superestimulação (D4), considerando-se diferentes tamanhos mínimos de folículos.

A análise dos indicadores de eficiência do processo demonstrou grande variação individual no desempenho das doadoras na superovulação (Tabela 2). A resposta à estimulação exógena do crescimento folicular foi o principal componente da eficiência absoluta do processo, respondendo por 80% da variação no número de embriões recuperados, e o único indicador parcial com correlação significativa com a eficiência absoluta.

TABELA 2 - Indicadores de eficiência do processo de produção de embriões bovinos por superovulação.

Parâmetro	Média	Varição	r ⁵	P
Taxa de superestimulação ¹	41,9%	0 – 75,6%	0,80	<0,0001
Taxa de ovulação ²	72,6%	0 – 100,0%	0,19	n.s.
Taxa de recuperação ³	41,9%	9,1 – 100,0%	0,28	n.s.
Eficiência absoluta ⁴	12,2%	0 – 25,0%	--	--

¹ Número de folículos > 7 mm no D4 / Número de folículos < 4 mm no D1

² Número de corpos lúteos na coleta / Número de folículos > 7 mm no D4

³ Número de embriões / Número de corpos lúteos na coleta

⁴ Número de embriões / Número de folículos < 4 mm no D1

⁵ Coeficiente de correlação com eficiência absoluta.

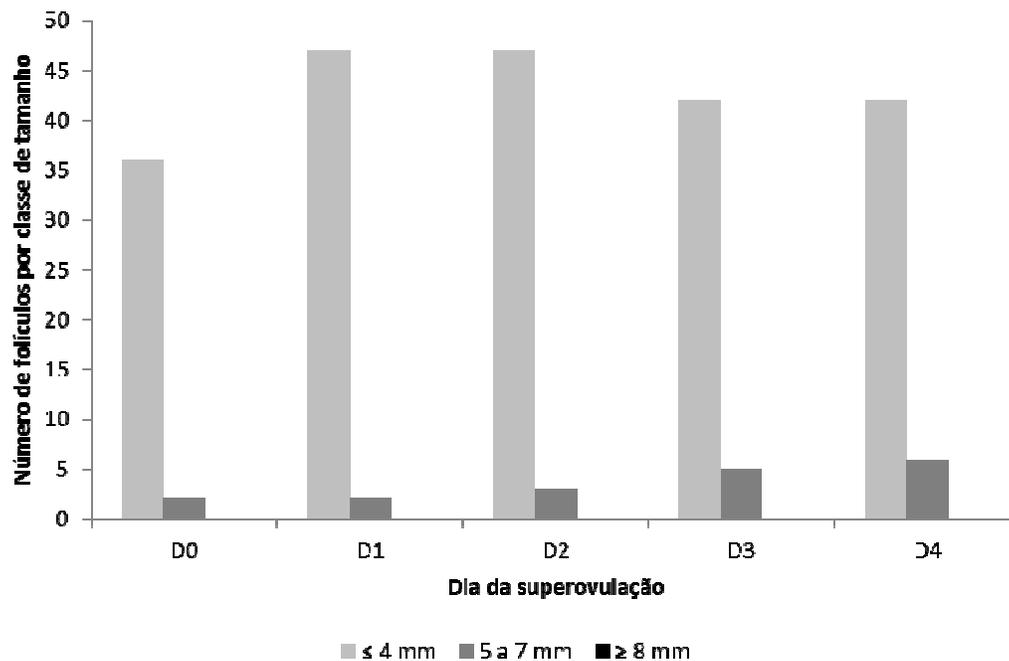
Os resultados da superovulação em doadoras com diferentes respostas ao estímulo exógeno pelo FSH estão demonstrados na Tabela 3. Apesar de terem a mesma população folicular total no início da superovulação, as doadoras com maior eficiência na estimulação do crescimento folicular produziram mais CL e embriões que as demais. A representação gráfica da distribuição da população folicular em doadoras com diferentes perfis de resposta está ilustrada na Figura 9.

TABELA 3 - Resultados da superovulação (média±EPM) após a classificação das doadoras de acordo com a eficiência relativa na indução do crescimento folicular.

Parâmetro	Eficiência na estimulação do crescimento folicular	
	média±EPM	
	Acima de 50%	Abaixo de 50%
	N=9	N=8
Folículos <4mm no D1	41,6±6,8 ^a	42,1±3,1 ^a
Folículos >7mm no D4	24,6±3,8 ^a	9,6±2,4 ^b
Corpos lúteos	17,8±2,5 ^a	6,9±2,1 ^b
Embriões	7,6±1,7 ^a	2,4±0,9 ^b
Eficiência absoluta	16,9±2,3 ^a	5,5±2,0 ^b

^{a,b} Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem (Wilcoxon, P<0,01)

a)



b)

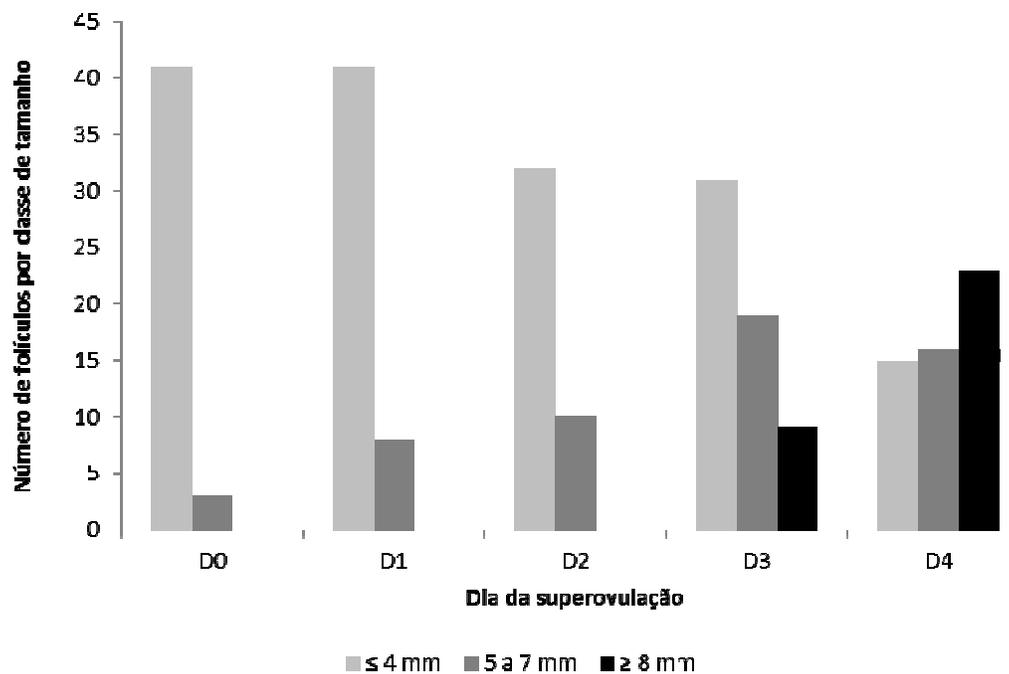


FIGURA 9 - Exemplos de variação na população folicular em cada classe de tamanho ao longo da superovulação. a) Animal sem resposta ao tratamento; b) Animal com boa resposta ao tratamento.

7 DISCUSSÃO

A raça Gir é uma alternativa para a produção de leite e também para a formação dos rebanhos mestiços devido à sua rusticidade e adaptação ao clima predominantemente tropical no Brasil. Existe uma grande demanda pela multiplicação de genótipos superiores nesta raça e, conseqüentemente, pelo desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas, como a transferência de embriões.

Esse estudo buscou caracterizar variações individuais de resposta ao tratamento superestimulatório com FSH. O diferencial do presente estudo foi considerar na avaliação não apenas o número de corpos lúteos formados e de embriões recuperados, mas também parâmetros relativos à população folicular ovariana e ao crescimento folicular em resposta ao tratamento exógeno.

No presente estudo com vacas da raça Gir, a média de produção de embriões foi semelhante às relatadas por Fonseca et al. (2001) e Prado e Toniollo (2007), tendo médias de 2,29 e 2,92 embriões viáveis respectivamente em doadoras Gir, não diferindo da média geral para esta raça.

O baixo número de estruturas recuperadas não significa que a técnica do lavado não foi adequada. Diversos fatores podem influenciar, reduzindo o número de embriões esperados, tais como, estado nutricional da doadora, histórico reprodutivo, idade, estação do ano, condição folicular no início do tratamento, entre outros (MAPLETOFT e PIERSON, 1994; BÓ et al., 1995). Contudo, como os animais foram mantidos nas mesmas condições de manejo e alimentação, e foram superovulados na mesma época e com a mesma partida de hormônio, estes fatores possivelmente tiveram pouco efeito sobre a variação individual de resposta.

A resposta superovulatória foi avaliada, inicialmente, pela contagem de corpos lúteos no dia da coleta de embriões. Observou-se variação significativa no número de estruturas recuperadas entre animais, incluindo doadoras com resposta nula ao tratamento, não respondendo à estimulação exógena com FSH, o que foi relatado também por Martins (2005). Aproximadamente 35% das doadoras produziram 75% das estruturas recuperadas. Esses resultados evidenciam um dos principais fatores limitantes da técnica: a alta variabilidade individual após o tratamento superovulatório. Essa variação individual ao tratamento

superovulatório foi relatada tanto em vacas Nelore (*Bos indicus*; Baruselli et al. 2003), quanto em vacas Holandesas de alta produção (*Bos taurus*; Martins, 2005).

Analisando o número de folículos ao decorrer da SOV (Figura 4), encontramos uma correlação média positiva a partir do D1 no número de folículos durante o tratamento superestimulatório com o número de corpos lúteos e embriões encontrados no dia da coleta. Esta correlação possivelmente está mais relacionada à limitação na produção de embriões em animais com população folicular pequena (ROMERO et al., 1991) que à garantia de resposta em animais com grande número de folículos em crescimento.

Quando se avalia o número de folículos por classe de tamanho no decorrer da superestimulação, é observado um aumento não significativo, mas visual, no número de folículos pequenos entre o D0 e D1. Esse aumento pode estar relacionado à progressão da emergência da onda de crescimento folicular, já que todos os animais foram previamente sincronizados. A aplicação de benzoato de estradiol ocasiona a atresia dos folículos presentes e a emergência de uma nova onda em $3,1 \pm 0,0$ dias (BARUSELLI et al, 2006). Como a superovulação foi iniciada no 5º dia após a sincronização, objetivando justamente coincidir com o início da onda de crescimento, é possível que alguns folículos pequenos ainda estivessem sendo mobilizados pela elevação do FSH endógeno. Os resultados mostraram não haver aumento no número total de folículos presentes ao longo do tratamento. Assim, após o período inicial de mobilização dos folículos, o estabelecimento da dominância bloqueia o crescimento de novos folículos (GUILBAULT et al., 1991; GINTHER et al., 2000). Apesar do tratamento superovulatório envolver a administração de FSH, propiciando o crescimento de vários folículos, é possível que a elevação na produção de estrógeno e inibina interfira indiretamente na mobilização de novos folículos ao longo da superovulação (GINTHER et al., 1997).

A modificação no número de folículos por classe de tamanho aconteceu conforme o esperado. Ocorreu uma redução progressiva no número de folículos pequenos entre o D1 e D4, um aumento transitório no número de folículos médios, e um aumento no número de folículos grandes no D4, conforme previamente descrito em outras raças (VIANA et al., 1999). Essa mobilização de folículos para classes de tamanho superiores, contudo, não foi completa, e apenas cerca de 50% dos folículos efetivamente cresceram em resposta ao FSH.

As correlações encontradas entre o número de folículos de diferentes classes de tamanho, durante a superestimulação, com o número de CL formados e de embriões recuperados, foi coerente com a dinâmica do crescimento folicular. Essas correlações

demonstram a possibilidade da avaliação parcial do progresso da SOV pelo monitoramento ultrassonográfico. Para cada dia ao longo da SOV, o número de folículos de uma determinada classe de tamanho pode ser utilizado para prever o resultado do processo superovulatório.

Ireland et al (2008), demonstraram que a ultrassonografia representa um método simples e confiável para quantificar os folículos presentes no ovário, na qual essa análise já foi utilizada para monitorar a população folicular e prever a resposta da OPU.

Para estabelecer um critério para cálculo de eficiência relativa, foi avaliada a correlação entre o número de folículos acima de diferentes diâmetros no D4 e o número de CL e embriões. O ponto de corte estabelecido (≥ 7 mm) é similar ao diâmetro mínimo para aquisição de capacidade ovulatória relatado em raças zebuínas por Baruselli et al. (2006). Esses autores observaram que em *Bos indicus*, apenas 30% dos folículos de 7 – 8,4 mm ovularam em resposta ao LH exógeno, contra 80% em folículos de 8,5 – 10 mm, e 90% em folículos > 10 mm. A aparente discrepância quanto ao diâmetro observado no presente trabalho e no relatado por Baruselli et al. (2006) se deve ao fato de que a última avaliação foi feita por ocasião do término do tratamento com FSH, mas no protocolo adotado, os animais foram inseminados apenas 24h após. O período entre o final da superovulação e a ovulação estimada (36 a 48h) possivelmente possibilitou que folículos que apresentavam pelo menos 7 mm atingissem diâmetro compatível com ovulação, considerando-se uma taxa de crescimento média de 1 – 2 mm por dia (VIANA et al., 1999; COUTINHO et al., 2007).

Adicionalmente, o espaço físico dos ovários, particularmente em animais *Bos indicus*, que fisiologicamente apresentam diâmetros foliculares menores que os *Bos taurus* (FIGUEIREDO et al., 1997, VIANA et al., 2000), pode ter contribuído para o menor diâmetro folicular observado nos ovários superovulados.

A taxa de superestimulação foi um indicador de eficiência do processo de produção de embriões bovinos por superovulação com maior participação na eficiência global que as taxas de ovulação ou recuperação. De fato, o chamado “sistema fechado” de lavagem uterina é uma técnica relativamente simples e eficiente. Por outro lado, são relatadas variações na taxa de recuperação embrionária (FRICKE et al., 1994), ou seja, a não correspondência entre o número de folículos ovulados e as estruturas recuperadas no lavado uterino no sétimo dia após a inseminação, da ordem de 20 a 80% (SARTORI et al., 2003).

Quando separadas as doadoras com menor ou maior eficiência na estimulação do crescimento folicular, notou-se que o número de folículos no início do tratamento não foi responsável por uma resposta ou não ao tratamento superestimulatório, visto que os dois

grupos tinham número similar de folículos < 4 mm no D1. Alguns animais como, por exemplo, o 0303, tinham mais de 30 folículos pequenos, e que não cresceram em resposta ao FSH exógeno.

Observou-se também um caso de animal que, apesar de ter sua emergência de onda folicular sincronizada, possuía em um dos ovários um folículo > 10 mm, no dia do início do tratamento com FSH. Os efeitos deletérios da presença de um folículo dominante no início do tratamento superestimulatório sobre a produção de embriões são bem conhecidos, e a superestimulação com FSH iniciada na ausência de um folículo dominante tem resultado em melhoras taxas de recrutamento folicular, ovulação e produção de embriões (GUIBAULT et al., 1991). Assim sendo, o animal em questão sequer apresentou ovulações.

Os animais com boa resposta ao tratamento tiveram maior número de corpos lúteos e embriões recuperados no dia da coleta. De fato, a eficiência total é limitada pela diferença de potencial natural de desenvolvimento dos folículos, e atresia folicular é observada em todas as etapas da foliculogênese. Desse modo, uma eficiência abaixo de 100% é previsível em qualquer processo de manipulação exógena do crescimento folicular.

8 CONCLUSÃO

A população folicular inicial pode ser utilizada como parâmetro para estimar a produção de embriões por superovulação, mas não para prever a eficiência da estimulação exógena pelo FSH;

É possível avaliar a eficiência parcial da superestimulação a qualquer momento do tratamento através da ultrassonografia, considerando a distribuição da população por classe de tamanho;

Na raça Gir, o tamanho mínimo ao final da superestimulação necessário para que os folículos tenham capacidade ovulatória é de 7mm;

Diferenças de respostas ao FSH exógeno são a principal fonte de variação na superovulação.

9 REFERÊNCIAS

ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; GINTHER, O.J. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergencies of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, Great Britain, v. 96, n 1, p 627-640, nov. 1992.

ADAMS, G.P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implication for synchronization and superstimulation. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 19-24, jan. 1994.

AERTS, J.M; BOLS, P.E. Ovarian follicular dynamics: A review with emphasis on the bovine species. Part I: folliculogenesis and pre-antral follicle development. **Reproduction in Domestic Animals**, [s.l], v 45, n 1, p 171-179, dez. 2008.

AERTS, J.M.J.; BOLS, P.E.J. Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II; antral development, exogenous influence and future prospects. **Reproduction in Domestic Animals**, [s.l], v. 45, n 1, p. 180–187, fev. 2010.

ANDRADE, J.C.O. et al. Diferentes protocolos de superovulação em vacas Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 23, n.3, p. 317-18, jan.1999.

BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, Amsterdam, v.56, n 9, p.1483-1496, dec. 2001.

BARROS, C.M.; ERENO, R.L. Recent advances in hormonal treatments used for fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.32, p.23-34, ago.2004.

BARROS, C.M; NOGUEIRA, M.F.G. Superovulation in zebu cattle: protocol P-36. **Embryo Transfer Newsletter**, Champaign, v.23, p.5-9, jun. 2005.

BARUSELLI, O.S. et al. Adequação da dose de FSH em protocolos de superovulação de vacas nelore (*Bos indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 31, n. S1, p.244-245, fev. 2003.

BARUSELLI, P.S. et al. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, Philadelphia, v 82-83, p 479-486, jul. 2004.

BARUSELLI, P.S. et al. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 65, n 1, p. 77-88, jan. 2006.

BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 2, p. 205-211, abr/jun. 2007.

BEG, M.A. et al. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. **Biology of Reproduction**, Madison, v.66, n 1, p.120-126, jan. 2002.

BERGFELT, D.R.; LIGHTFOOT, K.C.; ADAMS, G.P. Ovarian dynamics following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. **Theriogenology**, Amsterdam, v 42, n .6, p 895-907, nov. 1994.

BERGMANN, J.A.G.; PENNA, V.M. O impacto de novas biotécnicas em programas de melhoramento animal. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Campos do Jordão, v.27, n 1, p.110-132, ago. 1999.

BETTERIDGE, K.J. A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. **Animal Reproduction Science**, Philadelphia, v.79, n 3-4, p.203-244, dez. 2003.

BO, G.A.; et al. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, Philadelphia, v .39, n .3, p. 139-204, ago. 1995.

BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J. Dinámica Folicular Ovariana en el Bovino. In: SIMPÓSIO SOBRE CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES, 2000, São Paulo. **Anais**. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2000. p 12-34.

BÓ, GA; BARUSELLI, OS; MARTINEZ, MF. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, Philadelphia, v.78, n 3-4, p 307-326, out. 2003.

BÓ, G.A., GUERRERO, D.C., ADAMS, G.P. Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. **Theriogenology**, Amsterdam, v 69, n.1, p 81-87, jan. 2008.

BONI, R. et al Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology**, Amsterdam, v .48, n. 2, p 277-289, jul. 1997.

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

CARVALHO, J.B.P. **Sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR) em novilhas *B. indicus*, *B. indicus* x *B. taurus* e *B. taurus***. 2004. 122 f. Tese (Doutorado)- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

CASTILHO, C. **Divergência no crescimento folicular e sua influência sobre competência oocitária para o desenvolvimento embrionário in vitro em novilhas da raça nelore**. 2003. 90 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UEP, Jaboticabal, 2003.

CHUI, D.K.C. et al. Follicular vascularity – the predictive value of transvaginal power doppler ultrasonography in an in vitro fertilization programme: a preliminary study. **Human Reproduction**, Reino Unido, v.12, n 1, p 191-196, nov. 1997.

COUTINHO, G.T.R.M. et al. Avaliação ultra-sonográfica da dinâmica folicular e lútea em vacas da raça Guzerá. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.59, n.5, p.1089-1096, out. 2007.

DE LA SOTA, R.L. et al. Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. **Biology of Reproduction**, Estados Unidos, v.55, n 4, p 803-812, out. 1996.

DOMÍNGUEZ, M.M. Effects of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. **Theriogenology**, Amsterdam, v .48, n. 8, p 1405-1418, jun. 1995.

DRIANCOURT, M.A. et al. Dynamics of ovarian follicular development in cattle during the estrous cycle, early pregnancy and in response to PMSG. **Domestic Animal Endocrinology**, Amsterdam, v 8, n 2, p 209-221, abr. 1991.

FERNANDES, C.A.C. **Superovulação em bovinos**. 2003. Disponível em: <http://www.beefpoint.com.br>. Acesso em: 28 nov. 2012.

FIGUEIREDO, R.A. et al. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 47, n. 8, p 1489-1505, jun. 1997.

FONSECA, J.F. et al. Superovulated zebu cows embryonic developmental stages. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n .6, p 671-676, dez. 2001.

FRICKE, P.M. et al. Studies of FSH-p induced follicular growth in cows. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 43-53, abr. 1994.

GALLI, C. et al. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, Amsterdam, v 59, n 2, p 599-616, jan. 2003.

GIBBONS, J.R.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Relationship between follicular development and the decline in the follicle-stimulating hormone surge in heifers. **Biology of Reproduction**, Estados Unidos, v. 60, n. 1, jan. 1999.

GINTHER, O.J.; KNOFF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, Reino Unido, v.87, n 1, p.223-230, set. 1989.

GINTHER, O.J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, Estados Unidos, v 55, n 1, p 1187-1194, ago. 1996.

GINTHER, O.J. et al. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, Amsterdam, v 48, n. 1, p 75–87, jul. 1997

GINTHER, O.J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between folliclestimulating hormone and the follicles. **Biology of Reproduction**, Estados Unidos, v. 62, n. 4, p 920–927, abr. 2000.

GINTHER, O.J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. **Biology of Reproduction**, Estados Unidos, v. 63, n. 2, p. 383–389, ago. 2000.

GINTHER, O.J. et al. Association and independent comparisons between the two largest follicles preceding follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction**, Estados Unidos, v. 68, n. 2, p 524-529, fev. 2003.

GINTHER, O.J. et al. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, Estados Unidos, v. 78, n. 3-4, p 239-257, out. 2003.

GONÇALVES, P.A.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. In: REICHENBACH, H.D. et al. **Transferência e criopreservação de embriões bovinos**. São Paulo: Varela, 2002. p 127-177.

GUILBAULT, L.A., et al. Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. **Journal of Reproduction and Fertility**, Reino Unido, v .91, n. 1, p 81–89, jan. 1991.

HAHN, J. Attempts to explain and reduce variability of superovulation. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 38, n. 2, p 269-275, ago. 1992.

HUMBLLOT, P. et al. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 63, n.4, p1146-1166, mar. 2005.

IRELAND, J.L. et al. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction**, Estados Unidos, v. 79, n. 6, p 1219-1225, dez. 2008.

JAINUDEEN, M.R.; WAHID, H.; HAFEZ, E.S. E. Indução, ovulação, produção e transferência de embriões. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. Cap. 29, p.409- 434.

MAPLETOFT, R.J.; PIERSON, R.A. **Recruitment of Follicles for Superovulation**. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian, Estados Unidos, v .16, n. 1, p 127-141, 1994.

MARTINS, C.M et al. Produção embrionária de vacas holandesas a diferentes protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v .33, n. 1, p 227, ago. 2005 [Resumo].

McNATTY, K.P. et al. The effects of immunizing sheep with different BMP15 or GDF9 peptide sequences on ovarian follicular activity and ovulation rate. **Biology of Reproduction**, Estados Unidos, v.76, n .4, p.552-560, abr. 2007.

MIHM, M.; AUSTIN, E.J. The final stages of dominant follicle selection in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, Estados Unidos, v. 23, n .1-2, p 155– 166, jul. 2002

MIHM, M. et al. Molecular evidence that growth of dominant follicles involves a reduction in follicle-stimulating hormone dependence and an increase in luteinizing hormone dependence in cattle. **Biology of Reproduction**, Estados Unidos, v. 74, n. 6, p. 1051–1059, fev. 2006.

MIYAMOTO, A. et al. A potential use of color ultrasound as a tool for reproductive management: new observations using color ultrasound scanning that were not possible with imaging only in black and white. **Journal of Reproduction and Development**, Tóquio, v. 52, n. 1, p.153-160, fev. 2006.

NOGUEIRA, M.F.G. et al. The effect of type of vaginal insert and dose of pLH on embryo production, following fixed-time AI in a progestin-based superestimulatory protocol in Nelore cattle. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 67, n. 4, p. 655-660, mar. 2007.

OLIVEIRA, M.A.L. et al. Influência da idade sobre a resposta superovulatória de doadoras Nelore. Resultados preliminares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p 246-248, jul/set. 2002.

PEIXOTO, M.G.C.D.; VERNEQUE, R.S.; TEODORO, R.L. Genetic trend for milk yield in Guzerat herds participating in progeny testing and MOET nucleus schemes. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.5, n 3, p.454-465, jul. 2006.

PENNA, V.M.; MADALENA, F.E.; ALVIM, M.T.T. Open MOET nucleus of selection in Guzerá. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 6, 1998, Armidale, Austrália. **Proceedings**. Armidale: WCGALP, 1998. CD-ROM.

PINHEIRO, O.L. et al. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F_{2α} or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 49, n. 3, p 667-681, fev.1998.

PRADO, F.R.A.; TONIOLLO, G.H.; OLIVEIRA, J.A. Superestimulação ovariana em vacas da raça gir leiteiro com uso de diferentes concentrações de FSH. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v .23, n .3, p 172-177, set/dez. 2007.

REICHENBACH, H.D. et al. **Transferência e criopreservação de embriões bovinos**. São Paulo: Varela, 2002. p 127-177.

RODRIGUES, J. L. Transferencia de Embriões Bovinos - Historico e Perspectivas Atuais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.25, n. 2, p 102-107, abr/jun. 2001.

ROMERO, A. et al. Numbers of small follicles in ovaries affect superovulation response in cattle. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p 265, jan. 1991.

RUBIN, M.I.B. Histórico dos 20 anos da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v 33, n 1, p 35-54, ago. 2005. Suplemento.

SARTORELLI, E. S. **Caracterização da fase de desvio folicular em novilhas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*)**. 2003. 63f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

SARTORI, R., et al. Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. **Theriogenology**, Amsterdam, v .60, n. 7, p 1319-1330, out. 2003.

SIQUEIRA, L.C. **Esteróides no controle da regressão de folículos de diferentes diâmetros para uso em sistemas de inseminação artificial em tempo fixo de vacas de corte no pós-parto**. 2007. 76 f. Dissertação (Mestrado) -Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2007.

SUTTON, M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Effects of in vivo and in vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Human Reproduction Update**, Reino Unido, v. 9, n. 1, p 35-48, jan. 2003.

TEODORO, R.L.; VERNEQUE, R.S.; MARTINEZ, M.L. **Programa Nacional de Melhoramento do Guzerá para Leite: resultados do Teste de Progênie, do Arquivo Nacional e do Núcleo Moet**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2006. 24p.

THIBIER, M. The worldwide activity in farm animals embryo transfer. **Embryo Transfer Newsletter**, Champaign, v 26, n 4, p 4-9, abr. 2008.

VIANA, J.H.M. et al. Ovarian follicular population and superovulatory response in beef cattle. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, Salvador, v. 16, n .2, p 175-179, fev. 1999.

VIANA, J.H.M. et al. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, Brasília, v .35, n. 12, p 2501-2509, dez. 2000.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.35, n. 3, p 915-919, set/dez. 2007.

VIANA, J.H.M. et al. Evolução no uso das técnicas de fertilização *in vitro* na última década e impacto na indústria de embriões bovinos e produção animal no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto de Galinhas, v, 38, n, 2, p 661-674, ago. 2010. Suplemento.