

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO - UNIFENAS
ANA CAROLINA NASCIMENTO TIRAPELLI

PROTÓCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO EM ZEBUÍNOS COM DOSES
CONVENCIONAIS OU SPLIT

Alfenas - MG
2013

ANA CAROLINA NASCIMENTO TIRAPELLI

PROTOCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO EM ZEBUÍNOS COM DOSES
CONVENCIONAIS OU SPLIT

Dissertação apresentada à Supervisão de
Pesquisa e Pós-graduação da Universidade
José do Rosário Vellano - UNIFENAS, como
requisito para obtenção de título de Mestre
em Reprodução Animal

Orientadora: Prof. Dra. Marilú Martins Gioso

Alfenas - MG
2013

Tirapelli, Ana Carolina Nascimento

Protocolos de superovulação em zebuínos em doses convencionais ou split.—Ana Carolina Nascimento Tirapelli.-- 2013.
40 f.

Orientadora: Profª Drª Marilú Martins Gioso

Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária- Reprodução animal -Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, 2013.

Referências: 38-40

1. Superovulação 2. FSH 3. Corpos lúteos 4. Embriões
I. Título

CDU : 636.082(043)



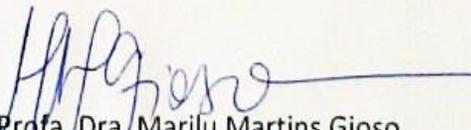
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: "PROTÓCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO EM ZEBUINOS COM DOSES CONVENCIONAIS OU SPLIT".

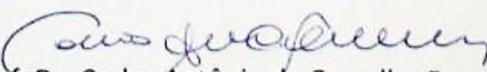
Autor: ANA CAROLINA NASCIMENTO TIRAPELLI

Orientador: Profa. Dra. Marilu Martins Gioso

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



Profa. Dra. Marilu Martins Gioso
Orientadora

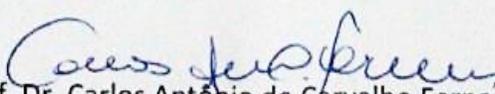


Prof. Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes



Prof. Dr. Walter Octaviano Bernis Filho

Alfenas, 17 de maio de 2013.



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

Dedico este trabalho aos meus amados e queridos pais, pelo apoio incondicional e por depositarem tanta fé na busca incessante de todos os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus e a Nossa Senhora por tantas bênçãos derramadas em minha vida e pela imensa proteção ao longo de toda esta jornada.

À minha avó, meu grande amor.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional e por me estimularem a sempre alcançar objetivos mais altos.

À minha irmã, meu exemplo de garra e dedicação.

À minha orientadora, Prof. Dra. Marilú Martins Gioso, pela imenso apoio, dedicação, carinho, ternura e principalmente pelo grande incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Antônio Carvalho Fernandes, pela oportunidade, auxílio, companheirismo, disponibilidade e dedicação.

Ao Prof. Dr. Miller Pereira Palhão pelo apoio e ajuda no desenvolvimento do projeto.

Aos professores do programa de Pós-graduação da UNIFENAS, pelo carinho durante as aulas.

À CAPES pelo apoio financeiro, na concessão da bolsa de estudos.

Aos queridos amigos do mestrado, pela amizade e pelos divertidos momentos.

"Nos dias de hoje, cada vez mais, acentua-se a necessidade de ser forte. Mas não há uma fórmula mágica que nos faça chegar à força sem que antes tenhamos provado a fraqueza."

Padre Fábio de Melo

RESUMO

TIRAPELLI, Ana Carolina Nascimento. **Protocolos de superovulação em zebuínos com doses convencionais ou split.**

Este experimento teve como objetivo avaliar e comparar resultados de superovulação de fêmeas zebuínas, utilizando um produto a base de FSH/LH num protocolo convencional e com número menor de aplicações e similar dosagem (dose split). Foram realizadas 32 superovulações em 16 fêmeas zebuínas, com idade variando de 17 a 42 meses, com escore de condição corporal 2,5 a 4 (escala de 1-5), arranjadas num delineamento experimental tipo cross-over. Isto é, todas as fêmeas foram superovuladas duas vezes, uma com cada protocolo. Anteriormente ao início dos protocolos, todos os animais passaram por sincronização com: D0- introdução de um implante de progesterona e aplicação de 2mL de benzoato de estradiol. As fêmeas do grupo convencional receberam 250 UI de FSH/LH, num esquema de aplicação por quatro dias e oito doses decrescentes. Desta maneira, administrou-se FSH/LH no D4, D5, D6 e D7 no período da manhã e da tarde, com as respectivas dosagens: 50,0 UI; 37,5 UI; 25,0 UI e 12,5 UI; sendo acrescentado no D7 a aplicação de 2 mL de cloprostenol sódico no período da manhã e remoção do implante de progesterona 12 horas após. No D8 aplicou-se 2mL de um análogo de GnRH e realizou-se a primeira IA 12 horas após e, a segunda IA 12 horas após a primeira. No D15 foi realizada a colheita de embriões. As fêmeas do grupo split também receberam 250 UI de FSH/LH. No D4 administrou-se 62,5 UI de FSH/LH por via intramuscular e 125,0 UI por via subcutânea no período da manhã. Vinte e quatro horas após administrou-se 62,5 UI por via subcutânea e na manhã do D7 removeu-se o implante de progesterona e aplicou-se 2mL de cloprostenol sódico. No D8 aplicou-se 2mL de GnRH e as IAs foram realizadas as 12 horas e 24 horas após. No D15 colheu-se os embriões. Antes do início da superovulação (D0), no primeiro dia (D4), no meio do protocolo (D6) e ao final (D8), foram contabilizados os números de folículos presentes < 3 mm, entre 3 a 8 mm e >8 mm de diâmetro, com auxílio de ultrasson. Os dois grupos foram equivalentes na quantidade de folículos mensurados do dia 4 ao 6. A partir do dia 8, houve diferença ($P < 0,05$) entre o grupo convencional e split para folículos até 3 mm ($2,19 \pm 1,22$ e $4,06 \pm 2,59$, respectivamente) e para folículos > 8 mm ($9,06 \pm 4,54$ e $5,50 \pm 4,59$, respectivamente). Foi realizada a avaliação da resposta superovulatória pela contagem do número de corpos lúteos de cada ovário no dia da colheita (D15) de embriões. Todos os embriões foram colhidos pelo método não cirúrgico e classificados segundo Lindner&Wright (1983). A quantidade de CLs foram: $8,12 \pm 3,26$ para o grupo convencional e $4,69 \pm 3,46$ para o grupo split ($P < 0,05$), e o número de embriões totais coletados foram: $6,69 \pm 3,05$ e $3,37 \pm 2,50$, respectivamente ($P < 0,05$). Também houve diferença ($P < 0,05$) para o número de embriões viáveis: $5,25 \pm 2,29$ (grupo convencional) e $2,37 \pm 1,78$ (grupo split). Conclui-se que o protocolo split com três aplicações de FSH/LH não apresentou equivalência ou superioridade na produção de CLs e no total de embriões produzidos e viáveis, quando comparado com o protocolo de superovulação convencional.

Palavras-chave: Superovulação, FSH, Corpos lúteos, Embriões.

ABSTRACT

TIRAPELLI, Ana Carolina Nascimento. **Superovulation protocol in cows with FSH in split dose.**

This experiment aimed to evaluate and compare result of superovulation of zebu females, using a product based on FSH/LH protocol, and with a smaller number of applications and similar dose (split dose). Were performed 32 superovulations in 16 Zebu females, aged 17-42 months, body condition score 2,5 to 4 (scale 1-5), arranged in a randomized cross-over. That is, all females were superovulated twice, once with each protocol. Before the beginning of the protocol, all animals underwent a synchronization: D0-introduction of a progesterone implant and applying 2 mL of estradiol benzoate. The females of the conventional group received 250 IU of FSH/LH, outline application for four days and eight decreasing doses. So, the administration of FSH/LH in D4, D5, D6 and D7 was in the morning and afternoon, with their respective strengths: 50,0 IU; 37,5 IU; 25,0 IU and 12,5 IU; D7 was added in 2 mL of application of cloprostenol in the morning and removal the implant of progesterone 12 hours after. On D8 was applied 2 mL of a GnRH analogue and held to first AI 12 hours after, and the second AI 12 hours after the first. D15 was performed on the collection of embryos. Female of split group received 250 IU of FSH/LH. D4 was administered 62,5 IU FSH/ LH intramuscular and 125,0 IU subcutaneously in the morning. Twenty-four hours after 62,5 IU was administered subcutaneously in the morning and on D7 was removed progesterone implant and applied 2 ml of cloprostenol sodico. On D8 was applied 2 mL of GnRH and AIs were performed 12 hours and 24 hours after. On D15 the embryos was collected. Before beginning the superovulation (D0) in the first day of superovulation (D4) in the middle of the superovulation protocol (D6) and on the end of the protocol (D8) were counted numbers of follicles present <3mm, between 3 and 8mm >8 mm in diameter, with the aid of ultrasound. The two groups were equivalent in number of follicles measured from day 4-6. From day 8, significant differences ($P < 0,05$) between the conventional group and split up to 3mm follicles ($2,19 \pm 1,22$ and $4,06 \pm 2,59$, respectively) and follicles >8mm ($9,06 \pm 4,54$ and $5,50 \pm 4,59$, respectively). The evaluation of the superovulatory response was done by counting the number of corpora lutea in each ovary at harvest (D15) embryos. All embryos were collected by nonsurgical method and classified according to Lindner & Wright (1983). The amount of CLs were $8,12 \pm 3,26$ for the conventional group and $4,69 \pm 3,46$ for the split group ($P < 0,05$) and total number of embryos were collected: $6,69 \pm 3,05$ e $3,37 \pm 2,50$, respectively ($P < 0,05$). Also significant differences ($P < 0,05$) for the number of viable embryos: $5,25 \pm 2,29$ (conventional group) and $2,37 \pm 1,78$ (split group). From these results, it is concluded that the protocol split with three applications of FSH/ LH showed no equivalence or superiority in production of CLs and in total embryos produced and viable, compared to the conventional protocol superovulation.

Keywords: Superovulation, FSH, CL, Embryos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Imagem ultrassonográfica que elucida a presença de folículos menores que 3 mm de diâmetro.....	26
Figura 2-	Imagem ultrassonográfica que elucida a presença de folículos (F) de 3 a 8 mm de diâmetro.....	27
Figura 3-	Imagem ultrassonográfica que elucida a presença de folículos (F) maiores que 8 mm de diâmetro.....	28
Figura 4-	Imagem ultrassonográfica que elucida a presença de corpos lúteos (CLs).....	29

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Esquema em dias, doses estipuladas e vias de administrações de Pluset para tratamento superovulatório convencional, em 16 vacas doadoras de raças zebuínas, com idade variando entre 17 a 42 meses.....22
- Tabela 2 - Esquema em dias, doses estipuladas e vias de administrações de Pluset para tratamento superovulatório split, em 16 vacas doadoras de raças zebuínas, com idade variando entre 17 a 42 meses.....23
- Tabela 3 - Média do número de folículos mensurados antes do processo de superovulação (D0) e no início da superovulação (D4) das 16 fêmeas bovinas submetidas aos dois grupos experimentais (convencional e split).....33
- Tabela 4 - Média do número de folículos mensurados no meio (D6) e no final (D8) da superovulação das 16 fêmeas bovinas submetidas aos dois grupos experimentais (convencional e split).....34
- Tabela 5 - Média do número de folículos mensurados no dia da colheita de embriões (D15), média dos corpos lúteos formados, média do número de embriões e média dos embriões viáveis das 16 fêmeas bovinas submetidas aos dois grupos experimentais (convencional e split).....35

LISTA DE ABREVIATURAS

CLs - Corpos lúteos

D0- Dia 0

D4- Dia 4

D6- Dia 6

D8- Dia 8

D15- Dia 15

eCG - Gonadotrofina Coriônica Equina

E2 - Estradiol

F- Folículo

FIV - Fecundação in vitro

FSH - Hormônio Folículo Estimulante

GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofinas

hMG - Hormônio da Menopausa Humana

IA - Inseminação Artificial

IATF - Inseminação artificial em tempo fixo

IETS - Sociedade Internacional de Transferência de Embriões

P4 - Progesterona

PGF2 α - Prostaglandina

SAEG - Sistema de análises estatísticas e genéticas

SRF -Fórmula de liberação lenta

SOV - Superovulação

TE - Transferência de Embriões

UI - Unidades Internacionais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	Objetivo geral.....	15
3	JUSTIFICATIVA.....	16
4	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
4.1	Perfil de desenvolvimento folicular em bovinos.....	17
4.2	Técnica de superovulação convencional para a transferência de embriões em bovinos.....	18
4.3	Utilização de doses "split" no protocolo de superovulação em bovinos.....	18
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
5.1	Desenvolvimento do projeto.....	21
5.2	Período e delineamento experimental.....	21
5.3	Protocolos utilizados.....	22
5.4	Imagens ultrassonográficas.....	25
5.5	Colheita de embriões.....	30
6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	32
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
8	CONCLUSÃO.....	36
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

1 INTRODUÇÃO

As descobertas recentes ocorridas em relação aos aspectos da fisiologia da reprodução em bovinos aumentaram as expectativas e possibilidades sobre a capacidade de contribuição das fêmeas no melhoramento genético da espécie. Com estes conhecimentos, novas biotecnologias tiveram sua utilização viabilizada na prática, tanto econômica quando na forma de aplicação (Fortune *et al.*, 1991; Ginther *et al.*, 1997). A transferência de embriões (T.E.) é uma destas tecnologias. Esta técnica desenvolve-se rapidamente na pecuária bovina brasileira. Segundo o IETS (*International Embryo Transfer Society-2004*) o Brasil ocupa o segundo lugar na aplicação desta tecnologia. Predominantemente é aplicada em pecuária de corte (87%). Com ela, o melhoramento genético pode ser efetuado com mais rapidez e eficiência, mesmo em pequenas populações de animais, com a disseminação do material genético de uma fêmea zootecnicamente superior (Christiansen, 1991). Embora a técnica de transferência de embriões em bovinos tenha evoluído consideravelmente no Brasil, nos últimos anos, ainda alcança um percentual pouco expressivo de rebanhos leiteiros e de corte. Segundo Hasler (2003) a aplicação da técnica de transferência de embriões diminuiu nos últimos anos na Europa e América do Norte.

O custo de implantação e manutenção do programa de transferência de embriões é a principal limitação para uma maior difusão desta técnica. Com os custos e resultados atuais, a transferência de embriões somente vai apresentar relação custo-benefício viável em rebanhos cujos animais tenham um grande valor comercial, para que o valor dos produtos possa compensar os custos de produção (Hasler, 2003).

A técnica de superovulação (SOV) é um dos passos fundamentais no programa de TE em bovinos. Tem como objetivo estimular, através de administração de hormônios, o desenvolvimento de um grande número de folículos até o estágio no qual possam ovular. Estes folículos a mais que se tornam ovulatórios, pertencem a uma onda de desenvolvimento, que normalmente sofreriam atresia. Porém, com a indução hormonal, fornece-se também a estes folículos a condição e chance de ovular (Fernandes, 2003).

Os hormônios que constituem a base dos protocolos hormonais de superovulação são: o FSH, a Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) e, em menor utilização, o Hormônio da Menopausa Humana (hMG; Gonsalves, 2001). Como mencionado anteriormente, eles atuam diretamente nos folículos, promovendo o desenvolvimento e crescimento destes em co-dominância, sem que haja formação de apenas um folículo dominante, reduzindo assim o

número de folículos que entrariam no processo de atresia. Desta maneira, o principal objetivo dos tratamentos superestimulatórios em bovinos é induzir um maior número de ovulações que resultará em um grande número de embriões viáveis que levem a aceitáveis taxas de gestação após a transferência (Bóet *al.*, 2002).

No entanto, há grande variabilidade na resposta superovulatória e de produção embrionária em vacas doadoras quando submetidas aos tratamentos com gonadotrofinas, sendo que estes hormônios representam um importante fator de custo para a indústria da TE. Em relação ao protocolo padrão de SOV na espécie bovina, o progresso no conhecimento do ciclo estral e os estudos sobre a dinâmica das ondas foliculares demonstraram que melhores respostas superovulatórias são alcançadas quando tratamentos de gonadotrofinas são iniciados no momento da emergência da onda folicular com aplicação de FSH, duas vezes ao dia em doses decrescentes, em um período de quatro dias consecutivos (Bergfelt *et al.*, 1997; Bóet *al.*, 1995; Mapletoft *et al.*, 2002).

Portanto, as administrações repetidas de FSH requerem uma atenção redobrada por parte dos técnicos e funcionários da fazenda, o que aumenta a possibilidade de falhas devido à má gestão além de erros de administração. Além disso, Bóet *al.* (1994) comentaram que os tratamentos com FSH realizados duas vezes por dia podem causar estresse nas vacas doadoras com uma diminuição da resposta superovulatória.

Por estas razões, estudos como os realizados por Bóet *al.* (2010) têm sido utilizados em protocolos mais simplificados (doses split) para a superestimulação do desenvolvimento folicular em bovinos, na tentativa de reduzir a manipulação e manejo das doadoras e permitir mesmo assim que haja pertinentes respostas superestimulatórias e produções embrionárias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste presente projeto foi avaliar e comparar resultados de crescimento folicular, número de corpos lúteos (CLs) e produção de embriões viáveis após a superovulação (SOV) de fêmeas zebuínas, utilizando FSH/LH(Pluset®) num protocolo convencional e com número menor de aplicações e similar dosagem (protocolo split).

3 JUSTIFICATIVA

O Brasil é líder mundial na produção de embriões bovinos. Mais de um terço de todos os embriões desta espécie são produzidos e transferidos em território nacional (Viana, 2009). Embora num volume considerável, dos aproximados de 400.000 embriões produzidos em 2009, apenas 10 a 15% destes são produzidos pela TE, ou "in vivo". Pois, com o surgimento da produção de embriões "in vitro" (FIV), esta metodologia foi escolhida por vários produtores e desde então não se observa evolução numérica significativa na aplicação da TE. São vários os motivos que podem ser apontados, para tal evento, dentre eles, destaca-se a afirmação que a FIV leva a produção de maior número de descendentes de uma fêmea geneticamente superior e ainda possibilita a utilização do sêmen sexado (Christiansen, 1991).

Adicionalmente, como a FIV geralmente apresenta resultados variáveis, a possibilidade da não utilização de todas as receptoras preparadas é inevitável. O problema é que nestes casos não se perde apenas o protocolo de sincronização, mas principalmente leva ao aumento do intervalo de partos, o que é o maior prejuízo. Para contornar esta situação os projetos em biotécnicas da reprodução são elaborados para que sejam produzidos e congelados alguns embriões pela TE e que quando na ausência de embriões de FIV para inovular em todas as receptoras aptas, esses possam ser prontamente utilizados (Fernandes, 2003). Desta maneira, a utilização racional concomitante destas técnicas gera o futuro do crescimento de ambas.

Deste o início da década de 90, quando se descobriu o mecanismo de ondas de desenvolvimento folicular, pouca ou nenhuma evolução significativa houve nos protocolos de SOV. A necessidade de um grande número de aplicações de FSH (Bellows *et al.*, 1969 & Monniaux *et al.*, 1983), leva a dificuldade de manejo e principalmente ao risco de falhas e erros, que sem dúvida comprometem o resultado e a utilização da técnica de TE. O desenvolvimento de protocolos de superovulação mais simples, com menos necessidade de manejo e riscos de erros, além de mais oportuno, seria de grande aceitação por um mercado com possibilidades reais de desenvolvimento.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Perfil de desenvolvimento folicular em bovinos

Segundo SPICER & ECHTERNKAMP (1986) existem períodos determinados do ciclo onde vários pequenos folículos iniciam o crescimento simultaneamente, sendo tal fenômeno chamado de ondas de crescimento folicular. A existência de duas ou três ondas de crescimento folicular, durante o ciclo estral em bovinos, foi postulada por RAJAKOSKI (1960) e confirmada por IRELAND & ROCHE (1983), PIERSON & GINTER (1987), FORTUNE et al. (1988), FORTUNE (1993) e ADAMS (1994).

As ondas de crescimento folicular ocorrem mesmo em períodos em que os níveis de gonadotrofinas estejam basais. Elas surgem nos dias 0 a 1 e dias 9 a 11 nos casos de duas ondas por ciclo, e nos dias 0 a 1, 8 a 9 e 15 a 16 em animais com três ondas por ciclo, existindo porém, uma maior incidência de ciclos com duas ondas foliculares (SIROIS E FORTUNE, 1988; FORTUNE 1993). Na primeira onda folicular, o folículo dominante ou ovulatório, atinge seu desenvolvimento máximo, porém não terá condições de ovular, entrando em atresia em função de não ter suporte hormonal para o processo de ovulação, devido a alta concentração de progesterona produzida pelo corpo lúteo neste período do ciclo estral (HENRICKS et al., 1970; HAFEZ, 1987). Assim, uma nova onda folicular se inicia, e o folículo dominante da onda anterior permanece no ovário por 4 a 5 dias quando então gradativamente desaparece. Na segunda onda de crescimento folicular, que se inicia no meio do ciclo, o folículo dominante, que será selecionado em torno do dia 17 a 18, terá condições de ovular, visto que a partir destes dias, os níveis de progesterona estarão reduzidos, devido ao processo de luteólise.

SIROIS e FORTUNE (1988), indicam correlação negativa entre o tamanho do folículo dominante, no início da regressão do corpo lúteo e o tempo decorrido até o estro. O folículo destinado a ovular seria o maior folículo nos ovários, apenas um dia antes ou no dia do estro (MATTON et al. ,1981; PIERSON & GINTER, 1987a e PIERSON & GINTER, 1987b). A seleção ocorre 3 a 4 dias antes da ovulação, e além do um estímulo ao desenvolvimento no folículo ovulatório, parece existir também um bloqueio no desenvolvimento dos demais, pois a resposta destes, as gonadotrofinas exógenas é menor após a seleção (PIERSON & GINTER, 1987).

4.2 Técnica de superovulação convencional para a transferência de embriões em bovinos

O principal objetivo do tratamento superestimulatório em bovinos é induzir um maior número de ovulações que resultará em um grande número de embriões viáveis e aceitáveis taxas de gestação após a transferência (Bó *et al.*, 2002).

O protocolo hormonal convencional que apresenta como base o FSH, é realizado em duas aplicações diárias, com intervalo de 12 horas entre elas, durante quatro dias no intervalo entre o Dia 9 (D9) até o Dia 14 (D14), tendo Dia 0 (D0) como dia da ovulação. A dose é gradativamente reduzida durante as oito aplicações e a PGF2 α deve ser administrada junto da penúltima injeção de FSH. O estro ocorre entre 36 e 48 h após a PGF2 α , com a ovulação 24 e 36 h depois (Mapletoft *et al.*, 2002). Após a manifestação da sintomatologia de estro, as doadoras são então inseminadas duas vezes com 12 horas de intervalo (Adams, 1994). Em vacas Zebuínas, uma maior sensibilidade ao tratamento com gonadotrofinas se comparadas às vacas européias, permitem a diminuição das dosagens de FSH. Souza (2006) e Visintinet *al.* (1996), trataram três grupos de vacas Nelore utilizando FSH/LH nas doses com 300, 400, e 500 UI. Estes autores concluíram que a dose de 300 UI de FSH/LH apresentou melhor resposta superovulatória, em comparação com as outras doses.

Os resultados obtidos pelos protocolos hormonais convencionais de superovulação, sofrem também variações causadas por outros fatores. Esses fatores podem ser as variações individuais isto é, um animal pode responder à SOV de maneira diferente de outro com o mesmo tratamento superovulatório; idade e histórico reprodutivo, ou ainda, inerente ao ambiente como a época do ano, ambiente de permanência do animal, manejo nutricional e status ovariano no momento do tratamento (Mapletoft *et al.*, 2002).

4.3 Utilização de doses "split" no protocolo de superovulação em bovinos

Embora a técnica de transferência de embriões em bovinos tenha evoluído consideravelmente no Brasil, nos últimos anos, alcançou um percentual pouco expressivo de rebanhos leiteiros e de corte. Isto porque a variabilidade na resposta aos protocolos de superovulação e o manejo requerido para administração do FSH tem afetado a aplicação da

técnica de TE nos programas de melhoramento genético. Desta maneira, tem-se pesquisado a possibilidade de protocolos mais simples para a superovulação, utilizando uma ou duas administrações de FSH como uma alternativa para o tradicional protocolo que trabalha com oito injeções de FSH administrados duas vezes ao dia (Bóet *al.*, 2010).

Como apresentado anteriormente, o tradicional tratamento superovulatório consiste na administração de extratos de pituitária contendo FSH por quatro ou cinco dias (Adams, 1994). Isto se dá por que o FSH apresenta meia vida curta na vaca (por volta de 5 horas; Demoustier *et al.*, 1988) e portanto requer a administração frequente para que haja a superovulação (Monniaux *et al.*, 1983). Estas duas administrações diárias tem resultado uma melhor resposta superovulatória do que quando administrado apenas uma vez ao dia (Walsh *et al.*, 1993).

Porém, a necessidade destas duas injeções diárias requer frequentes atenções de manejo e aumentam as possibilidades de falhas na administração dos produtos. Adicionalmente, estes tratamentos podem causar estresse nas doadoras com um subsequente decréscimo da resposta superovulatória (Bóet *al.*, 1994) e ainda pode alterar o momento do pico de LH (Stoebel & Moberg, 1982). Por estas razões, protocolos simplificados de superovulação devem ser estudados na tentativa de reduzir a manipulação das doadoras e melhorar a resposta superovulatória.

Em outro estudo, com vacas Holandesas, uma única injeção subcutânea de 75% da dose de FSH foi administrado no dia inicial e, posteriormente, 25% da dose foi administrada 48 horas após, quando a PGF2 α foi aplicada (Lovie *et al.*, 1994). A resposta superovulatória foi intermediária entre o protocolo original e apenas uma única injeção de FSH (que obteve a pior resposta).

Já, Kelly *et al.* (1997) trabalharam com múltiplas injeções (protocolo padrão) ou injeções únicas (intramuscular) para superovulação com a utilização dos hormônios Folltropin-V ou Pluset. Múltiplas injeções de Folltropin-V ou Pluset resultaram em maior número de estruturas transferíveis ($2,68 \pm 0,9$ e $2,7 \pm 0,9$, respectivamente) que injeções únicas ($2,6 \pm 0,8$ embriões para FSH e $1,3 \pm 0,4$ embriões para FSH/LH; $P < 0,05$).

O objetivo do estudo de Alvarez *et al.* (2010) foi avaliar se uma injeção adicional intramuscular de Pluset aumentaria a produção de embriões de vacas zebuínas superovuladas com uma única injeção subcutânea da mesma droga. Vinte e uma vacas Nelore foram tratadas com implante vaginal de progesterona e injetados 2,5mg de benzoato de estradiol. Quatro dias após, o grupo A recebeu 400UI de Pluset via subcutânea, o grupo B recebeu 320UI via subcutânea e 80UI via intramuscular dois dias após a primeira administração. O grupo C

recebeu 400UI em protocolo padrão. O número de embriões transferíveis dos grupos A e B ($2,4\pm 0,7$ e $1,7\pm 0,6$, respectivamente) foi menor que o grupo C ($4,6\pm 1,2$, $P<0,05$). A menor produção de embriões do grupo B foi relacionado à menor taxa de recuperação (46,4%), quando comparados aos grupos A e C (65,1 e 81,7%, respectivamente. $P<0,05$). Neste experimento, concluiu-se que a administração intramuscular adicional de subdose (grupo B) não melhorou a produção de embriões em vacas zebuínas.

Uma alternativa para estes resultados acima descritos seria a administração do FSH adicionado aos polímeros de liberação lenta. Sob estas condições, Callejaset *al.*, (2002) não induziram uma resposta satisfatória. Já Tribulo *et al.*, (2010) administraram uma única injeção intramuscular de Folltropin-V diluído em uma formulação de liberação lenta. Vinte e nove animais Red Angus receberam este tratamento em contraste aos outros 29 que receberam o tratamento superovulatório convencional. A média do número de embriões transferíveis não diferiram entre os grupos tradicional e única injeção ($4,9\pm 0,8$ e $6,4\pm 1,3$; respectivamente; $P>0,4$).

Experimentos adicionais foram conduzidos em diversas raças de doadoras para confirmar a efetividade da injeção única de FSH no dia inicial do protocolo (Tribulo *et al.*, 2010). Em doadoras Angus (138 superovulações), o número de embriões transferíveis não diferiram entre 300mg ou 400mg de Folltropin V ($6,1\pm 0,7$ versus $6,5\pm 0,7$), mas foram resultados superiores quando administrado apenas 200mg ($5,2\pm 0,8$, $P<0,1$).

Como visto na revisão de literatura, uma ou duas aplicações (uma intramuscular e uma subcutânea), não foram tão equivalentes ao protocolo convencional. Assim, deseja-se estudar uma terceira dose além das já conhecidas nos protocolos "split", na tentativa de alcançar boas margens de resposta na SOV.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Desenvolvimento do projeto

Para o desenvolvimento deste projeto foram utilizadas doadoras de raças zebuínas hospedadas na Central Biotran. Foram utilizados 02 protocolos de superovulação em 16 doadoras. Todas as doadoras foram superovuladas duas vezes, uma em cada protocolo (split e convencional). Os animais selecionados apresentaram peso corporal acima de 350 kg e idade variando de 17 a 42 meses e todas as fêmeas passaram por avaliação ginecológica completa, utilizando-se dos métodos de palpação transretal, ultrassonografia e vaginoscopia, afim de detectar qualquer alteração a qual impossibilitaria a execução do projeto com êxito. Para a realização dos procedimentos com os animais, estes foram mantidos em um tronco de contenção, para facilitar a realização e como forma de segurança para o operador.

Uma vez selecionadas, estas fêmeas receberam a mesma dieta durante todo o período experimental, visando um balanço energético positivo e houve a manutenção de escore corporal de 3 a 4, numa escala de 1 a 5, segundo Ferreira (1990). A dieta baseou-se no fornecimento de volumoso a base de silagem de milho, sendo fornecido um total aproximado de 20 kg por animal e um concentrado comercial (3 kg por animal, aproximadamente) 1 vez ao dia. Este tipo de alimentação é fornecido na época da seca. Já na época das águas, as vacas são mantidas apenas no pasto. A mineralização foi administrada de forma *ad libitum* durante o ano todo.

5.2 Período e delineamento experimental

O período experimental iniciou-se dia 29 de Maio de 2012 e estendeu-se ate o dia 06 de Outubro de 2012, em um delineamento tipo cross-over.

5.3 Protocolos utilizados

Houve a realização de dois protocolos, sendo o protocolo 1 o grupo convencional e o protocolo 2 o grupo "split". As fêmeas foram distribuídas por sorteio para iniciarem os protocolos nos tratamentos 1 ou 2. Todos os animais passaram pelos dois grupos experimentais em um delineamento tipo cross-over.

No protocolo 1: Grupo Convencional, utilizou-se dose total de 250 UI de Pluset/doadora, num esquema de aplicação de oito doses decrescentes, conforme descrito na tabela 1. Esta dose de Pluset foi diluída em 20 mL de solução fisiológica. As aplicações foram feitas com intervalos exatos de 12 horas.

Tabela 1- Esquema em dias, doses estipuladas e vias de administrações de Pluset para tratamento superovulatório convencional, em 16 vacas doadoras de raças zebuínas, com idade variando entre 17 a 42 meses.

Dia	Manhã	Tarde
D0	Administração do implante de progesterona e aplicação de 2 mL de Benzoato HC®	
D4	4 mL (50 UI Pluset®)	4 mL (50 UI Pluset®)
D5	3 mL (37,5 UI Pluset®)	3 mL (37,5 UI Pluset®)
D6	2 mL (25,0 UI Pluset®)	2 mL (25,0 UI Pluset®)
D7	1mL (12,5 UI Pluset®)	1mL (12,5 UI Pluset®)
	Aplicação de 2 mL de Veteglan®	Remover implante de progesterona/Primer®
D8	Aplicação de 2 mL de Gestran®	1 ^a inseminação
D9	2 ^a inseminação	
D16	Colheita dos embriões	2 mL de Veteglan®

- Benzoato HC®- HertapeCalier Saúde Animal - 1 mg de Benzoato de Estradiol/mL;
- Veteglan®-HertapeCalier Saúde Animal -0,75 mg de D (+)Cloprostenol /mL;

- GnRH-Gestran®- Tecnopec - 2,5 mg de Acetato de Gonadorelina/100 mL;
- FSH/LH- Pluset®- HertapeCalier Saúde Animal - 500 UI de FSH e de LH/20 mL;
- Implante de progesterona: Primer®-Tecnopec

No protocolo 2: Grupo Split, utilizou-se também dose de 250 UI Pluset/doadora, num esquema de aplicação conforme descrito na tabela 2. Esta dose de Pluset foi diluída em 10 mL de solução fisiológica esterilizada para facilitar as aplicações.

Tabela 2- Esquema em dias, doses estipuladas e vias de administrações de Pluset para tratamento superovulatório split, em 16 vacas doadoras de raças zebuínas, com idade variando entre 17 a 42 meses.

Dia	Manhã	Tarde
D0	Administração do implante de progesterona e aplicação de 2 mL de Benzoato HC®	
D4	2,5 mL (62,5 UI Pluset®) -Intramuscular 5,0 mL (125,0 UI Pluset®)-Subcutâneo	
D6	2,5 mL (62,5 UI Pluset®) - Subcutâneo	
D7	Remover implante de progesterona. Aplicação de 2 mL de Veteglan®	
D8	Aplicação de 2 mL de Gestran®	1ª inseminação
D9	2ª inseminação	
D15	Colheita dos embriões	2 mL de Veteglan®

Todas as aplicações intramusculares foram realizadas na região da musculatura glútea, com seringas descartáveis de 5ml e agulhas 40x8. As aplicações subcutâneas foram feitas com seringas descartáveis de 5ml e agulhas 25x8. As aplicações subcutâneas foram feitas na cavidade ao redor da inserção da cauda, pelo maior depósito de tecido adiposo neste local.

As doadoras foram inseminadas com o touro holandês Garisson, utilizando sêmen convencional e todas as doses foram da mesma partida.

Durante a coleta de embriões, as doadoras receberam anestesia peridural baixa, com 4 mL de lidocaína a 2% sem vasoconstritor (Dorfin® – HertapeCalier).

5.4 Imagens ultrassonográficas

Foram realizadas avaliações, de folículos ovarianos com auxílio do aparelho de ultrassonMindray M5 VET, tanto do grupo convencional quanto do grupo split, antes da superovulação (D0), no início da superovulação (D4), no meio da superovulação (D6) e no final da superovulação (D8). No dia da coleta (D15) foram realizadas imagens de corpos lúteos. Estes folículos foram contabilizados em cada ovário de acordo com as seguintes mensurações: até 3 mm de diâmetro, de 3 a 8 mm de diâmetro e > 8 mm de diâmetro (figuras 1, 2 e 3). Além disso, no dia 15 dos protocolos, contabilizou-se o número de CLs presentes em cada ovário (Figura 4).

As imagens foram gravadas com auxílio de uma câmera de vídeo e, posteriormente, estas imagens foram transferidas para o computador para realizar as análises em programa específico, as quais foram feitas com o objetivo de mensurar os folículos presentes, utilizando como proporção para as mensurações a escala de graduação do próprio aparelho de ultrasson. Este aparelho possui na lateral uma graduação que representa a distância de 1 cm entre cada ponto situado na lateral direita da tela.

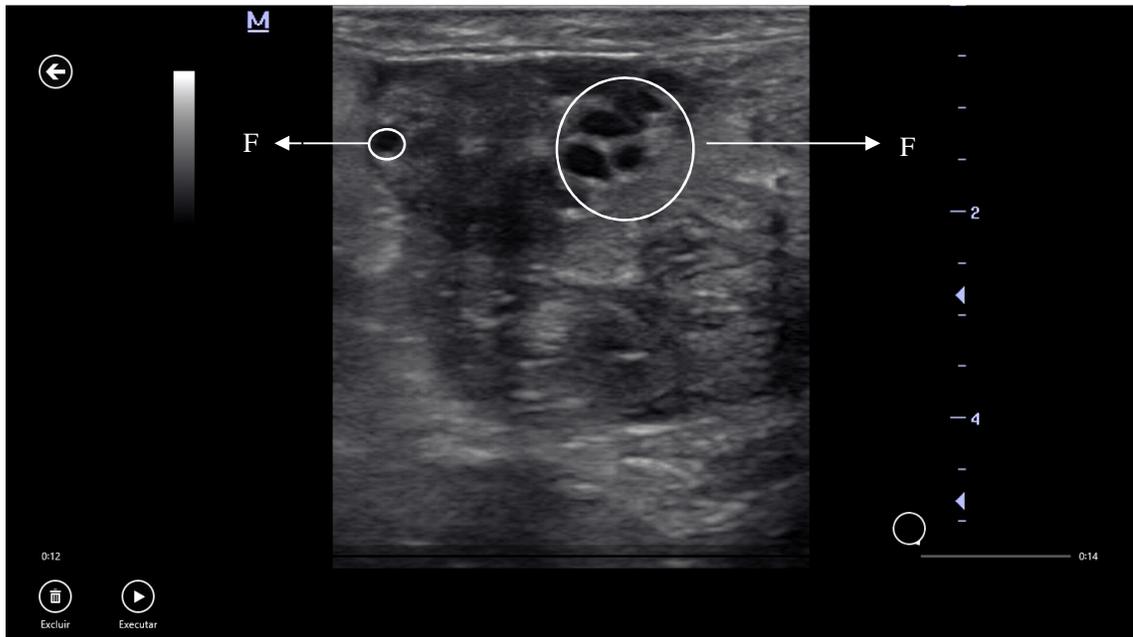


FIGURA 1- Imagem ultrassonográfica que elucida a presença de folículos menores que 3 mm de diâmetro

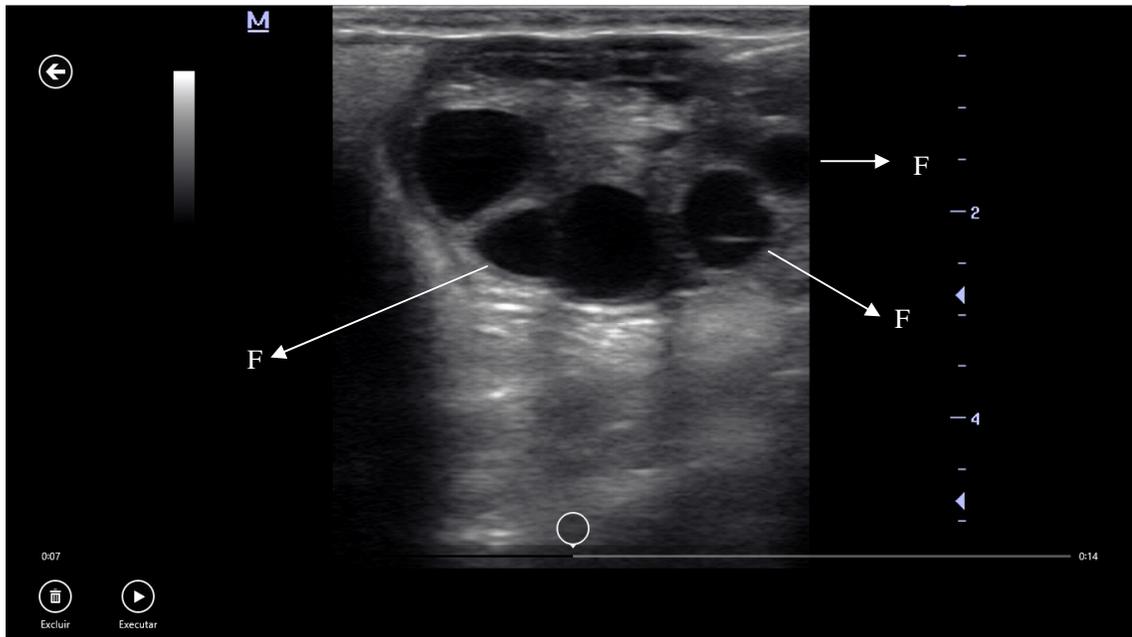


FIGURA 2- Imagem ultrassonográfica que elucida a presença de folículos (F) de 3 a 8 mm de diâmetro.

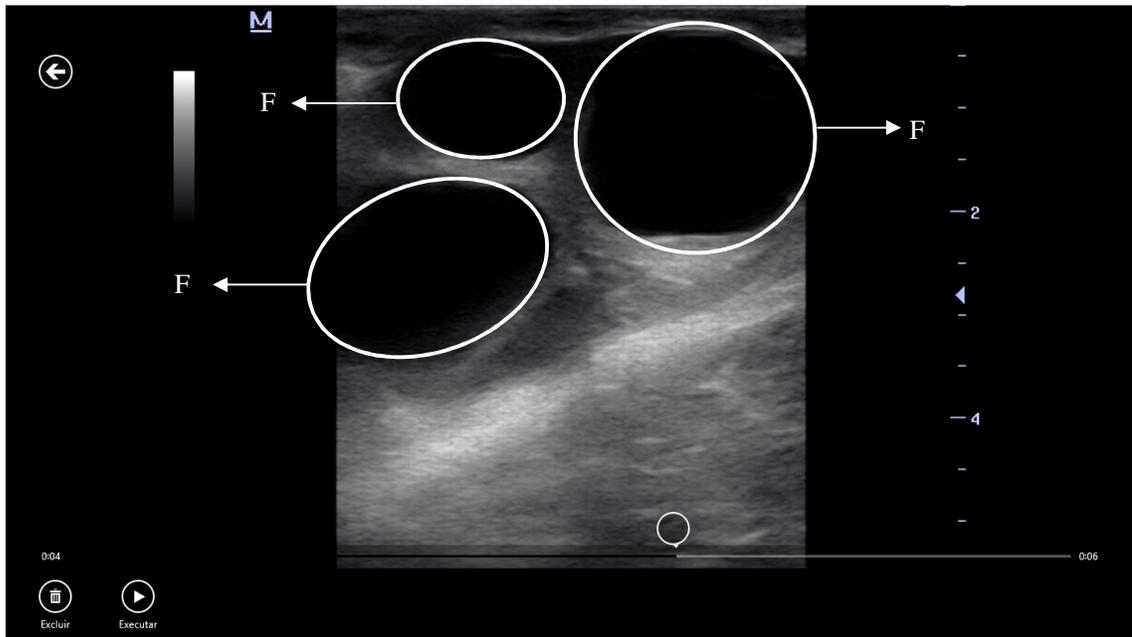


FIGURA 3- Imagem ultrassonográfica que elucida a presença de folículos (F) maiores que 8 mm de diâmetro.

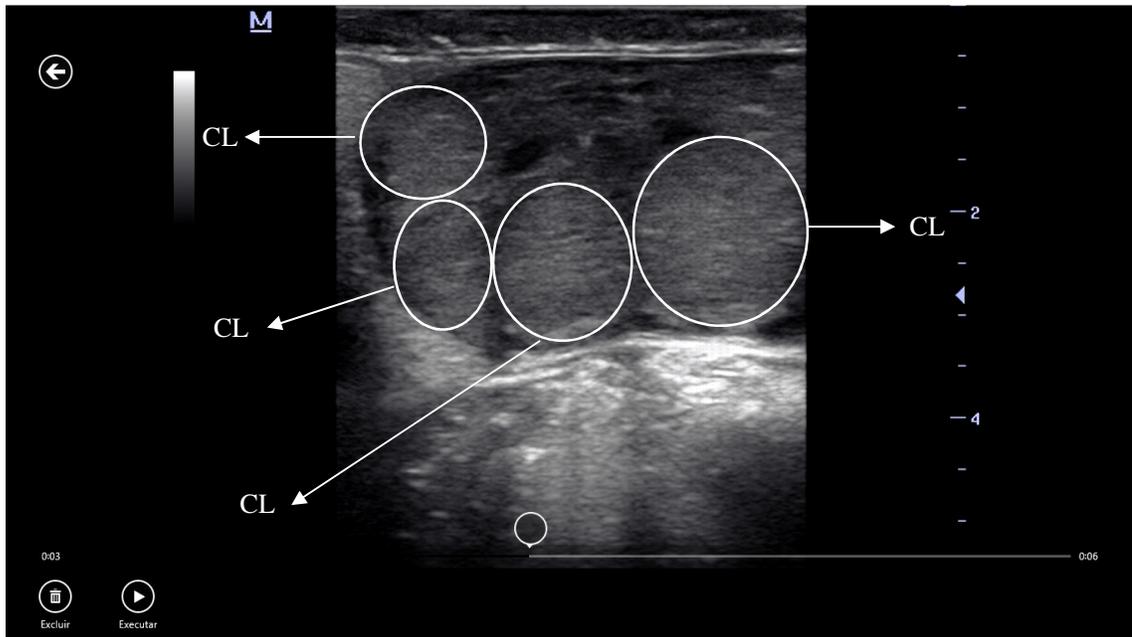


FIGURA 4- Imagem ultrassonográfica que elucida a presença de corpos lúteos (CLs).

5.5 Colheita de embriões

Os embriões foram colhidos pelo método não cirúrgico, sete dias após a primeira inseminação artificial, conforme descrito por Fernandes (1994). Após a limpeza do reto foi feita a avaliação da resposta superovulatória pela contagem, via transretal e ultrassonografia, do número de corpos lúteos de cada ovário (Figura 4). Feita a análise e mensuração da resposta ovariana e a anestesia, toda a região perivulvar foi lavada com sabão neutro e posteriormente foi seca e desinfetada com álcool-iodado. Pronta a antisepsia, em alguns animais, o dilatador cervical, previamente esterilizado foi usado a fim de facilitar a passagem do cateter de colheita e evitar danos ao mesmo. Transposta a cérvix, o dilatador foi retirado e introduziu-se o cateter de colheita (cateter de Foley nº 16 ou 18 - AB Technology - EUA) com um mandril de aço inoxidável em seu interior, dirigindo-o sempre para o corno ipsilateral ao ovário que apresentasse melhor resposta à superovulação. Com a extremidade do cateter posicionado no terço médio do corno uterino, o balonete do mesmo foi inflado com certa quantidade do líquido de colheita, suficiente para este se fixar no local e evitar refluxo e perda de líquido durante a colheita. O mandril foi cuidadosamente retirado, segurando-se a porção do corno uterino imediatamente caudal ao balonete.

Para a lavagem uterina, o recipiente com o líquido de colheita (DPBS® – Nutricell – Brasil) foi posicionado cerca de 50cm acima do dorso da doadora, de forma que o líquido poderia fluir para o útero por gravidade. Utilizou-se como circuito de colheita um aparato composto de mangueiras de borracha siliconizadas com presilhas para interrupção de fluxo, acopladas. Uma extremidade do circuito foi conectada ao frasco contendo o líquido de colheita, a outra à extremidade do cateter e a terceira ao filtro destinado a receber as estruturas de origem uterina. Com o útero identificado por via retal, procedeu-se ao fluxo de líquido para o interior do mesmo. Uma vez repleto o corno uterino, a entrada de líquido foi interrompida e o corno levemente massageado. Após a massagem procurou-se segurar a extremidade deste corno quando então permitiu-se o esvaziamento do mesmo. Foram feitas de 5 a 6 lavagens em cada corno. Terminado o procedimento em um corno, o balonete foi desinflado e retirou-se o cateter. Fora do animal, o mandril de aço foi novamente acoplado ao cateter e este reintroduzido no animal, sendo agora dirigido para o outro corno uterino, onde se realizou o mesmo procedimento. Foi utilizado para as lavagens de ambos os cornos uterinos aproximadamente 800mL de DPBS®.

O líquido recuperado das lavagens uterinas, executadas em circuito fechado, foi passado por um filtro apropriado (Coletor de embriões - Millipore®) com diâmetro dos poros de 80 micra (0,08mm) onde os embriões ficaram retidos. Tomou-se sempre o cuidado de manter uma certa quantidade de líquido de colheita dentro do filtro para evitar o ressecamento dos embriões.

O conteúdo do filtro de colheita foi passado para uma placa de petri tamanho 100x20mm (Corning™ - EUA), com fundo quadriculado. Utilizou-se um pequeno volume adicional de DPBS para lavar o filtro e evitar a permanência de algum embrião no mesmo. Após passagem do líquido do filtro de colheita para a placa esta foi deixada em repouso por um período de 5 minutos para a decantação dos embriões. Na placa de petri as estruturas presentes foram rastreadas e identificadas.

As estruturas coletadas presentes na placa de petri, foram rastreadas com o auxílio de um microscópio estereoscópicotrinocular (Carton SCZ-T4™ – Carton – Japão), num aumento de 15x, e uma vez identificadas, foram transportadas para uma outra placa contendo solução de manipulação (TQC Holding Solution™ AB Technology).

6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram digitados em planilhas eletrônicas e, posteriormente, todas as variáveis foram submetidas ao teste T de Student para amostras pareadas, utilizando o programa SAEG (Sistema de análises estatísticas e genéticas), segundo Ribeiro Junior (2001). Para todas as análises considerou-se nível de significância a 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como demonstrado na tabela 3, os dados avaliados entre o grupo convencional e o grupo split, durante o dia 0 do protocolo não diferiram entre os grupos com folículos até 3 mm de diâmetro e o de 3 a 8 mm de diâmetro ($P>0,05$). Já se tratando de folículos maiores que 8 mm de diâmetro, houve diferença ($P<0,05$), onde visualiza-se um número maior de estruturas do grupo convencional ($1,50\pm 0,89$) que no gruposplit ($0,87\pm 0,72$). Porém, todos os animais foram sincronizados antes do início dos protocolos justamente para que haja uma organização de emergência de onda e "zerar" esta possível diferença de número de folículos entre os animais dos dois grupos.

Ainda como exposto na tabela 3, durante o início da superovulação (D4) os folículos de até 3 mm de diâmetro tanto do grupo convencional quanto o do grupo split não apresentaram diferenças estatísticas ($P>0,05$). No início do protocolo de superovulação é o momento onde estes folículos estão em maiores quantidades, uma vez que a onda de crescimento folicular está sendo iniciada. Este fato demonstra que o protocolo de sincronização com P4 e E2 foi eficiente em "zerar" as ondas foliculares anteriores e promover uma quantidade equivalente de folículos em emergência folicular.

Tabela 3- Média do número de folículos mensurados antes do processo de superovulação (D0) e no início da superovulação (D4) das 16 fêmeas bovinas submetidas aos dois grupos experimentais (convencional e split).

TRATAMENTO	N	D0			Início SOV D4		
		até 3 mm	3 a 8 mm	> 8 mm*	até 3 mm	3 a 8 mm	> 8 mm
CONVENCIONAL	16	7,75±3,41	5,12±2,75	1,50±0,89	9,50±3,81	4,00±2,92	1,125±0,50
SPLIT	16	7,625±3,86	5,50±3,97	0,87±0,72	9,375±3,63	4,31±2,96	1,25±0,77
TOTAL	32	7,69±3,59	5,31±3,36	1,19±0,86	9,44±3,66	4,16±2,90	1,1±0,64

*: Dados a mesma coluna diferem pelo teste T de Student ($P<0,05$)

De acordo com a tabela 4, no meio do protocolo de superovulação (D6), não houve diferenças estatísticas entre o grupo convencional e o split quando comparou-se a quantidade de folículos ($P >0,05$), o que demonstra que até a metade do tempo decorrido dos

dois protocolos, os tratamentos foram equivalentes em promover o crescimento folicular no processo da SOV. Os folículos maiores que 8 mm de diâmetro presentes nesta etapa, provavelmente devem ser folículos em regressão da onda anterior à sincronização (Guinther *et al.*, 1997).

No final da SOV (D8), espera-se maiores quantidades de folículos maiores que 8 mm de diâmetro. Neste experimento, ficou claro, de acordo com a tabela 4, que o protocolo split não foi eficiente em promover tal efeito quando comparado ao tratamento convencional ($P < 0,05$). Isto demonstrou que do dia 6 para o dia 8 dos tratamentos, os folículos do protocolo SOV convencional receberam doses de 50 e 25 UI de pluset segregados pelos dias 6 e 7, porém, já o SOV split receberam 62,5 UI de pluset numa única aplicação apenas no dia 6. Nota-se portanto, que esta dose única no dia 6 não foi eficiente em promover o desenvolvimento final dos folículos em crescimento, pois a meia vida do FSH é pequena, como já descrito por Laster (1972) e Demoustier *et al.*, (1988). Demonstra-se, portanto, que uma administração de FSH a mais no dia 7 é necessária para a efetividade do tratamento de SOV.

Estes resultados do número de folículos > 8 mm de diâmetro no dia 8, refletirá em quantidades de CLs no dia da coleta embrionária (tabela 5).

Tabela 4- Média no número de folículos mensurados no meio (D6) e no final (D8) da superovulação das 16 fêmeas bovinas submetidas aos dois grupos experimentais (convencional e split).

TRATAMENTO	N	Meio SOV			Final SOV		
			D6		D8		
		até 3 mm	3 a 8 mm	> 8 mm	até 3 mm*	3 a 8 mm	> 8 mm*
CONVENCIONAL	16	3,12±1,86	8,25±3,84	4,44±2,58	2,19±1,22	3,62±2,093	9,06±4,54
SPLIT	16	3,62±2,80	7,25±3,43	4,19±3,08	4,06±2,59	4,56±2,13	5,50±4,59
TOTAL	32	3,37±2,35	7,75±3,62	4,31±2,80	3,12±2,20	4,09±2,13	7,28±4,84

*: Dados a mesma coluna diferem pelo teste T de Student ($P < 0,05$)

Como demonstrado na tabela 5, no dia da colheita de embriões (D15), houve diferença estatística entre o grupo convencional e o split ($P < 0,05$), para os folículos maiores que 8 mm de diâmetro. Isto sugere que no dia da colheita de embriões (D15), já havia um maior número de CLs no grupo convencional que no grupo split, o que indica que o processo

de SOV para este grupo convencional foi mais eficiente. Já o grupo split ainda mantinha maior número de folículos superiores a 8 mm de diâmetro, uma vez que poucos folículos conseguiram atingir diâmetro ideal para serem ovulatórios, demonstrando que houve ausência de crescimento folicular, que pode ser devido à ausência da administração de FSH no dia 7.

O número de corpos lúteos formados foram maiores ($P < 0,05$) no grupo convencional ($8,12 \pm 3,26$) que no grupo split ($4,69 \pm 3,46$), sendo justificado portanto que no grupo convencional houve um maior número de ovulações que no grupo split, como já discutido anteriormente.

Além disso, o número total de embriões e embriões viáveis foi maior ($P < 0,05$) no grupo convencional ($6,69 \pm 3,05$; $5,25 \pm 2,29$, respectivamente) que no grupo split ($3,37 \pm 2,50$; $2,37 \pm 1,78$, respectivamente), também refletindo o resultado do número final de CLs.

Tabela 5- Média no número de folículos mensurados no dia da colheita de embriões (D15), média dos corpos lúteos formados, média do número de embriões e média dos embriões viáveis das 16 fêmeas bovinas submetidas aos dois grupos experimentais (convencional e split).

TRATAMENTO	N	Colheita					
		D15			Total	Embriões	
		até 3 mm	3 a 8 mm	> 8 mm*	CLs*	Embriões*	Viáveis*
CONVENCIONAL	16	$1,94 \pm 0,77$	$1,37 \pm 0,50$	$0,81 \pm 0,98$	$8,12 \pm 3,26$	$6,69 \pm 3,05$	$5,25 \pm 2,29$
SPLIT	16	$2,31 \pm 1,81$	$1,37 \pm 1,36$	$1,81 \pm 0,83$	$4,69 \pm 3,46$	$3,37 \pm 2,50$	$2,37 \pm 1,78$
TOTAL	32	$2,125 \pm 1,38$	$1,375 \pm 1,01$	$1,31 \pm 1,03$	$6,406 \pm 3,74$	$5,03 \pm 3,22$	$3,81 \pm 2,49$

*: Dados a mesma coluna diferem pelo teste T de Student ($P < 0,05$)

De acordo com a tabela 5, no dia da colheita dos embriões (D15), a quantidade de folículos maiores que 8 mm de diâmetro foi superior para o grupo split ($P < 0,05$). Isto pode ser explicado visto que estes folículos não alcançaram diâmetros satisfatórios para a ovulação, e portanto, permaneceram em quantidade superior ao grupo convencional, uma vez que neste grupo o que predominava nos ovários era a presença de CLs, como resultado de um processo de superovulação bem sucedido.

8 CONCLUSÃO

Conclui-se que doses split para superovulação em fêmeas zebuínas foram menos eficientes em promover resultados satisfatórios em produção de embriões quando comparado ao protocolo de superovulação convencional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ R.H; MARTINEZ A.C; PIRES R.M.L. Superovulatory Response of Zebu Cows Treated with pFSH in a Single Subcutaneous Injection Followed by an Additional Intramuscular Sub-Dose 48 h Later. **Reprod Dom Anim.**, Estados Unidos, v. 45, n. 3, p.421–424, jun. 2010.

BÓ, G.A., et al. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Folltropin-V in beef cattle. **Theriogenology**, Alemanha, v. 42, n. 6, p. 963-975, nov.1994.

BÓ, G.A., et al. Simplification of superovulation protocols in cattle. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 38 n. 2, p.278–286, abr. 2010.

CALLEJAS S.S., et al. Ovarian stimulation with FSH-p in single dose in polyvinylpyrrolidone or the combination of a reduced dose of FSH-p and ECG. **Theriogenology**, Alemanha. v. 57, n. 1, p.763-764, jan.2002.

CHRISTIANSEN, L.G. Use of embryo transfer in future cattle breeding schemes. **Theriogenology**, Alemanha. v.35, n.1, p.141-149, jan.1991.

COLAZO M.G.Effect of route of administration of dinoprost on pregnancy rate using different protocols for fixed-time artificial insemination, **Theriogenology**, Alemanha, v. 55, n.1, p. 243-244, jan. 2001.

DEMOUSTIER J.M. et al. Determination of porcine plasma Folltropin-V levels during superovulation treatment in cows. **Theriogenology**, v. 30, s.n., p. 379-386, jul/dez. 1988.

FERNANDES, C.A.C. **Efeito do Tratamento com FSH Sobre a Taxa de Geração de Novilhas Mestiças Usadas Como Receptoras de Embrião.**1994. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1994.

FERNANDES, C.A.C. **Imunização ativa com líquido folicular suíno, alterações na fisiologia reprodutiva e resultados de superovulação em vacas e novilhas.** 2000.134 f. Tese (Doutorado) - FMVZ - UNESP, São Paulo, 2000.

FERNANDES, C. A. C. **Superovulação em bovinos**. Alfenas-MG, 2003. Disponível em: <www.beefpoint.com.br> Acesso em: 25 set. 2006

FERNANDES, C.A.C.; FERREIRA A.M., FIGUEIREDO, A.C.S. Sincronização de Estro em Bovinos de Acordo com a Fase do Ciclo Estral. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, São Paulo, v.5,[s.n., p.39-41], jan/jul. 1998.

FERNANDES, C.A.C.; VELASQUEZ, L.F.U. Características do corpo lúteo e taxa de gestação em receptoras de embrião. **Archivos de ReproduccionAnimal** ,Espanha, Madrid, v.1, n.2, p.28-31, jan. 1997.

FERREIRA, A.M. **Efeito da amamentação e do nível nutricional na atividade ovariana de vacas mestiças leiteiras**. 1990. 134 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1990.

FORTUNE, J.E. et al. Follicle selection in domestic ruminants. **Journal of Reproduction Fertility**. Estados Unidos. v.43, p. 187-198, jul/dez.1991.Suplemento.

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

GONSALVES, P.B.D., FIGUEREDO, J.R., FREITAS, V.J. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, 2001

HOCKLEY, D.K., et al. Superovulation with a single subcutaneous injection of Folltropin in the cow: Effect of dose and site of injection.**Theriogenology**, Alemanha,v.37, n.1, p. 224, jan.1992.

KELLY, P., et al. Superovulation in cattle: effect. of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. **Animal Reproduction Science**, Estados Unidos,v.46, n. 1-2, p 1-14, mar. 1997.

LINDER, G.M.; WRIGHT, R.W.Jr. Bovine embryo morphology and evaluation.**Theriogenology**, Alemanha, v.20, n. 4, p.407-416, out.1983.

LOVIE M., et al. The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to follitropin in Holstein cows. **Theriogenology**, Alemanha, v. 41, n.1, p. 241, jan. 1994.

MAPLETOFT, R.J. et al. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reprod. Nutr. Dev.**, França, v 42, n.6, p 601 – 611, dez. 2002.

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

RIBEIRO JUNIOR, J.I. **Análises Estatísticas no SAEG**. Viçosa: UFV, 301f, 2001.

SOUZA, A.H. **Novas estratégias de superovulação em Zebuínos**: parte 1. 2006. Disponível em: < www.beefpoint.com.br > Acesso em: 20 ago. 2006.

STOEBEL, D.P., MOBERG, G.P. Repeated acute stress during the follicular phase and luteinizing hormone surge of dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, Estados Unidos. v. 65, n.1, p. 92-96, jan. 1982

TRIBULO, A., et al. Superovulation of angus donors with a single intramuscular injection of Follitropin-V. **Reproduction, Fertility and Development**, Austrália. v. 22, n.1, p. 367, dez. 2010.

VIANA, J.H.M. Mudanças e tendências no mercado de embriões bovinos no Brasil. **O embrião**. São Paulo, v.42, s.n., p.5-7, jul/ago. 2009.

WALSH, J.H., et al. The effects of once or twice daily injections of p-FSH on superovulatory response in heifers. **Theriogenology**. Alemanha. v. 40, n.2, p. 313-321, ago. 1993.