

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

BRUNO PENA CARVALHO

**SUPEROVULAÇÃO DE VACAS RED SINDI (*Bos taurus indicus*) COM TRÊS
DIFERENTES DOSES DE FSH**

Campos dos Goytacazes

2009

BRUNO PENA CARVALHO

**SUPEROVULAÇÃO DE VACAS RED SINDI (*Bos taurus indicus*) COM TRÊS
DIFERENTES DOSES DE FSH**

Dissertação de mestrado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal na área de concentração de Melhoramento Animal e Biotecnologia da Reprodução.

Orientador: Angelo José Burla Dias

Co-orientador: Marco Roberto Bourg de Mello

Campos dos Goytacazes

2009

BRUNO PENA CARVALHO

**SUPEROVULAÇÃO DE VACAS RED SINDI (*Bos taurus indicus*) COM TRÊS
DIFERENTES DOSES DE FSH**

Dissertação de mestrado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal na área de concentração de Melhoramento Animal e Biotecnologia da Reprodução.

Aprovada em 28 de setembro de 2009.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Angelo José Burla Dias (Doutor, Biociências e Biotecnologia)-UENF
(Orientador)

Prof. Marco Roberto Bourg de Mello (Doutor, Reprodução Animal)-UFRRJ
(Co-orientador)

Prof^a. Maria Clara Caldas Bussiere (Doutora, Ciências-Fisiologia Geral)-UENF

Prof. Reginaldo da Silva Fontes (Doutor, Ciências Veterinárias)-UENF

*À minha família, à minha
namorada Paola e ao meu filho(a)
que está por vir.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter guiado meu caminho estando sempre em meu coração e principalmente por colocar tantas pessoas especiais em minha vida, as quais serão citadas a seguir;

Ao Professor Dr. Angelo José Burla Dias, pela orientação, amizade, pela confiança depositada em mim, permitindo a execução da parte experimental no Campus da UFRRJ e principalmente pelo exemplo de integridade e profissionalismo;

Ao Professor Dr. Marco Roberto Bourg de Mello do DRAA/IZ/UFRRJ pela orientação, amizade, estímulo, conselhos, exemplo, pelas longas conversas e por viabilizar financeiramente o experimento através de projeto aprovado pela FAPERJ sob sua coordenação;

À minha mãe e irmãs por serem fonte de apoio incondicional e por morarem sempre em meu coração. Em especial à minha irmã Sara, por ter me ajudado no início dessa caminhada quando ainda estava sem bolsa de estudo;

À minha amada namorada Paola, por ser fonte de estímulo inesgotável, pelo amor incondicional, por aceitar e compreender os momentos de ausência e minhas variações de humor e por dividir comigo não só os inúmeros momentos felizes, mas também os momentos de angústia e frustrações;

Aos amigos do LRMGA: Bruna, Felipe, Marcus (Highlander), Carla, João, Kelen, Vidal, Márcia, Gilberto, Margareti pelas conversas e ótimo convívio no laboratório. Vocês são como minha família em Campos dos Goytacazes;

Aos amigos e colegas do Curso de Pós-graduação em Ciência Animal/UENF: Héctor Javier Narváez Bedoya e Edgar Maurício Mongollon, pelas longas conversas sobre reprodução, pelos conselhos, incentivos e ótima convivência;

Aos estagiários do Setor de Reprodução Animal da UFRRJ: Pedro, Joaquim, Jader, Raquel, Daniela, Franciane e Leandro pela ajuda na execução do experimento;

Aos amigos da república Birigui: Hugo, Léo, Janella e Nicholas, por me acolherem em sua casa nos longos períodos de realização de experimento na UFRRJ;

Ao grande amigo e Médico Veterinário Gabriel Faller Almeida e à amiga e Médica Veterinária Júlia Maria Baldrighi pela ajuda essencial na execução deste trabalho;

Aos professores do Setor de Reprodução Animal do Instituto de Zootecnia da UFRRJ: M.Sc. José Eugênio Três, Dr. Júlio César Jacob pela contribuição e convívio durante a execução do experimento e de maneira especial à Prof^a. Dra. Vera Lúcia Teixeira de Jesus, que além de ter sido a pessoa que me ensinou os primeiros passos na pesquisa durante a bolsa de iniciação científica, foi quem me indicou e apresentou ao Prof. Angelo, permitindo assim que eu viesse para UENF;

Ao Professor Dr. Reginaldo da Silva Fontes do LRMGA/UENF pela amizade, pelo esclarecimento de dúvidas e sugestões;

Ao Professor Dr. Mirton José Frota Morenz do Departamento de Nutrição Animal do Instituto de Zootecnia da UFRRJ pela análise estatística dos resultados;

Ao amigo Dr. Lincoln da Silva Amorim por passar suas experiências, pelos conselhos e principalmente por ter sido a pessoa que fez com que crescesse em mim a paixão pela reprodução animal durante estágio realizado na EMBRAPA/CNPGL no ano de 2005;

Ao grande amigo e funcionário do Setor de Reprodução Animal do Instituto de Zootecnia da UFRRJ Sr. Zico pela enorme contribuição na execução do experimento com o manejo dos animais;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal, pela oportunidade de realização do curso;

Ao Instituto de Zootecnia da UFRRJ pela disponibilização dos animais e instalações para a realização do experimento;

A Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela concessão de bolsa de estudo e recursos financeiros para a execução deste trabalho;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Muito obrigado!

"Uma vida dedicada às coisas materiais é morta, um tronco cortado; uma vida moldada por Deus é uma árvore florescente."

Provérbios, 11:28

CARVALHO, Bruno Pena, M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Setembro de 2009. Superovulação de vacas Red Sindi (*Bos taurus indicus*) com três diferentes doses de FSH. Professor orientador: Angelo José Burla Dias. Professor co-orientador: Marco Roberto Bourg de Mello.

Resumo: Pesquisas envolvendo aspectos reprodutivos da raça Red Sindi ainda são escassas, principalmente aquelas referentes às biotécnicas da reprodução, como doses adequadas de FSH para a superovulação e resposta ovariana ao tratamento hormonal. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a resposta superovulatória de vacas da raça Sindi a três diferentes doses de FSH. As vacas foram distribuídas de maneira aleatória nos três grupos experimentais, nos quais receberam 100; 133 e 200 mg de Folltropin-V[®] como tratamento superovulatório, totalizando 16, 13 e 14 superovulações por grupo, respectivamente. A resposta superovulatória foi determinada pelo número de CL presentes em ambos os ovários no sexto dia (D6) após a primeira inseminação, e pelo número de estruturas recuperadas, porcentagem de estruturas recuperadas (estruturas recuperadas/CL) e qualidade embrionária no D7. Foi analisado também o estágio de desenvolvimento das estruturas recuperadas. Foi observado efeito da dose no número de corpos lúteos e número de estruturas recuperadas ($P < 0,05$), sendo que a dose de 200mg apresentou os melhores resultados ($6,4 \pm 0,85$ e $3,5 \pm 0,95$, respectivamente). Quanto ao número de embriões viáveis e o número de embriões congeláveis não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre os três grupos analisados. Foi observada diferença estatística entre os estádios de desenvolvimento embrionário, com um maior número de embriões nos estágios entre mórula compacta e blastocisto ($p < 0,05$). Vacas da raça Sindi mostraram baixa resposta ao protocolo de superovulação utilizado, porém com elevada porcentagem de embriões viáveis e congeláveis.

Palavras-chave: Bovino; Sindi; Superovulação; FSH; desenvolvimento embrionário

CARVALHO, Bruno Pena, M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. September 2009. Superovulation of Red Sindhi cows (*Bos taurus indicus*) with three different doses of FSH. Advisor: Angelo José Burla Dias. Co-supervisor: Marco Roberto Bourg de Mello.

Abstract: Researches involving reproductive aspects of Red Sindhi breed are yet scarce, mainly those related to reproduction, as appropriate doses of FSH for superovulation and ovarian response to hormonal treatment. Therefore, the objective of this study was to evaluate the superovulatory response of Red Sindhi cows to three different doses of FSH. Cows were assigned randomly in three experimental groups, in which they received 100, 133 and 200 mg Folltropin-V® as superovulatory treatment, totaling 16, 13 and 14 superovulation per group, respectively. The superovulatory response was determined by the number of CL present in both ovaries on day six (D6) after first insemination and the number of recovered structures, percentage of recovered structures (recovered structures / CL), viable and freezable embryos collected on D7. The development stage of recovered structures was also examined. It was observed effect of dose on the number of corpora lutea and number of recovered structures ($P < 0.05$), and the dose of 200 mg showed the best results (6.4 ± 0.85 and 3.5 ± 0.95 , respectively). The number of viable embryos and the number of freezable embryos there was no difference ($P > 0.05$) between the three groups. Statistical difference was found between the stages of embryonic development, with a greater number of embryos in the stage between compact morulae and blastocyst ($p < 0.05$). Red Sindhi cows showed low response to the superovulation protocol used, but with a high percentage of viable and freezable embryos.

Key-words: Cattle; Red Sindhi, Superovulation, FSH, embryonic development

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Doadoras Red Sindi do rebanho da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.....31
- Figura 2:** Esquema do protocolo de superovulação das doadoras.....33
- Figura 3:** Número total de corpos lúteos, de estruturas recuperadas e taxa de recuperação em vacas Red Sindi de acordo com a dose de FSH.....37
- Figura 4:** Distribuição dos embriões recuperados segundo estádios de desenvolvimento embrionários de vacas Red Sindi superovuladas. Mórula (MO), mórula compacta (MC), blastocisto inicial (BI), blastocisto (BL) e blastocisto expandido (BX).....37
- Figura 5:** Número de embriões, relação embriões viáveis/total de embriões e embriões congeláveis/total de embriões de número e porcentagem de vacas Red Sindi de acordo com a dose de FSH.....38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores médios de resposta ao tratamento superovulatório de vacas Red Sindi tratadas com três diferentes doses de FSH.....36

Tabela 2: Efeito da dose de FSH sobre a porcentagem de embriões viáveis e porcentagem de embriões congeláveis de vacas Red Sindi.....36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BI – blastocisto inicial

BL – blastocisto

BX – blastocisto expandido

CIDR – dispositivo intravaginal liberador de progesterona

CL – corpo lúteo

IATF – inseminação artificial em tempo fixo

IETS – International embryo transfer society

MC – mórula compacta

MO – mórula

mRNA - Ácido ribonucléico mensageiro

PBS – solução salina fosfatada e tamponada

PGF₂α – prostaglandina F₂α

SOV - superovulação

TE – transferência de embriões

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Histórico e panorama da transferência de embriões.....	15
2.2 Ciclo estral e dinâmica folicular em bovinos	17
2.3 Superovulação em bovinos	19
2.3.1 Fatores que influenciam a resposta superovulatória	20
2.3.2 Controle da dinâmica folicular para superestimulação ovariana.....	22
2.3.3 Inseminação artificial em tempo fixo em doadoras superestimuladas.....	25
2.3.4 Indução da ovulação para transferência de embriões em tempo fixo.....	26
2.3.5 Uso de diferentes doses de FSH para superovulação.....	28
3 OBJETIVOS	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Local do experimento e animais.....	31
4.2 Delineamento experimental.....	32
4.3 Tratamento superovulatório das doadoras.....	32
4.4 Colheita e avaliação dos embriões.....	33
4.5 Análise estatística.....	34
5 RESULTADOS	35
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÕES	44
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1. INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro é composto por aproximadamente 200 milhões de cabeças, das quais cerca de 150 milhões são raças de corte e 50 milhões raças de leite (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2007). Estima-se que aproximadamente 80% do rebanho de corte é composto pelo grupo genético *Bos taurus indicus* (MEIRELLES et al., 1999), composto principalmente pelas raças Brahman, Gir, Guzerá, Indubrasil, Nelore, Tabapuã e Sindi (CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL, 2005).

Dentre estas, atualmente tem se dado destaque à raça Sindi, que tem origem na província paquistanesa de Sindh e apresenta como características principais, a pelagem de cor avermelhada com mucosas escuras, ideal para as regiões tropicais e subtropicais. Os animais são de porte pequeno, apresentam menor consumo absoluto de alimentos, boa eficiência reprodutiva e boa capacidade de produção de leite, tanto em quantidade como em qualidade. Além destas vantagens sobressai a sua excelente adaptabilidade às condições adversas de clima e manejo, principalmente alimentar.

Devido à sua rusticidade e resistência ao calor esta raça está distribuída em muitas partes da Índia e em pelo menos 33 países da Ásia, África, Oceania e Américas (TALPUR et al., 2006).

No Brasil, está bem adaptada às condições do semi-árido da região nordeste, onde é utilizada em pequenas explorações para a produção de leite e carne, sendo produtiva mesmo nas condições adversas do local (EMPRESA ESTADUAL DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DA PARAÍBA S. A., 2009).

Frente a estes atributos e ao desempenho destes animais, torna-se importante a sua difusão e multiplicação como raça pura e em cruzamento com raças taurinas, obtendo-se animais produtivos, resistentes e de pequeno porte, recomendados principalmente para pequenas explorações leiteiras típicas da agricultura familiar.

Nesse sentido, a utilização de biotécnicas reprodutivas pode ser de grande importância para a difusão da genética desses animais em um menor espaço de tempo. De particular importância destaca-se a transferência de embriões, que consiste na utilização de hormônios exógenos para induzir o crescimento de múltiplos folículos, originando assim, múltiplos oócitos capazes de serem fertilizados (SINGH et al., 2004). Com essa técnica é possível conseguir um número superior de embriões, e conseqüentemente prenhez, do que seria possível fisiologicamente, aumentando o número de descendentes de fêmeas com características produtivas superiores (REICHENBACH et al., 2002).

Embora muitas pesquisas venham sendo desenvolvidas com animais da raça red Sindi, tais experimentos se concentram majoritariamente em aspectos produtivos destes animais, como por exemplo a qualidade da carcaça e da carne (COSTA et al., 2007), influência do meio sobre o tamanho corporal, perímetro torácico, altura e comprimento da garupa (COSTA et al., 2007). Pesquisas relacionadas à reprodução, principalmente as referentes às biotécnicas da reprodução, como doses adequadas de FSH para a superovulação e resposta ovariana ao tratamento hormonal, são escassas nesta raça.

Dessa forma, a presente dissertação visa contribuir para o aumento da eficiência da transferência de embriões na raça Sindi, avaliando algumas doses de FSH utilizados em tratamentos superovulatórios dessa raça.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico e panorama da transferência de embriões

A primeira transferência de embriões (TE) realizada com sucesso na espécie bovina ocorreu em 1951, na Universidade de Cornell, Estados Unidos, com o pesquisador WILLETT e colaboradores (HAFEZ e HAFEZ, 2004) e a partir da década de 70 a técnica começou a ser utilizada comercialmente (NELSON e NELSON, 2001). Hoje, a coleta por lavagem uterina através de cateter transcervical é mundialmente difundida, permitindo que o número de descendentes de uma fêmea seja muito superior ao produzido fisiologicamente durante sua vida, gerando com isso uma maior intensidade de seleção nas fêmeas (MARTINS, 2007).

No Brasil, o início da TE se deu no início da década de 70, com o nascimento de um bezerro gerado a partir da importação de embrião criopreservado. Pouco tempo depois ocorreu o primeiro nascimento a partir de embrião produzido no país. Desde então muitas pesquisas foram realizadas, ocasionando profundas modificações e transformando a TE em ferramenta fundamental para programas de melhoramento genético (VIANA e CAMARGO, 2007).

A partir do ano de 2000 o Brasil assumiu papel importante no cenário mundial de embriões, sendo responsável por 13% do total de embriões transferidos no mundo e 82% das transferências realizadas na América Latina. Hoje os números são ainda mais expressivos, atingindo aproximadamente 27% do total de embriões transferidos mundialmente, quando somados embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*. (VIANA e CAMARGO, 2007).

Apesar deste crescimento alguns problemas ainda persistem. A variabilidade na resposta ao tratamento superovulatório com gonadotrofinas exógenas tem sido relatada tanto em *Bos taurus indicus* quanto em *Bos taurus taurus* (MARTINS, 2007), sendo considerada um dos maiores problemas

enfrentados pelos veterinários que atuam na área, pois 20 a 30% das vacas superovuladas não respondem ao tratamento (BARUSELLI et al., 2006).

Muitos esforços têm sido realizados no sentido de investigar os fatores que influenciam a resposta ao tratamento superovulatório em bovinos, entretanto, pouco progresso foi feito, pois inúmeros fatores individuais podem estar envolvidos, como idade, raça, status ovariano, tempo de tratamento e repetidas superovulações (MAPLETOFT et al., 2002).

A variabilidade na resposta também é influenciada pelo fator subespécie. Chebel e et al. (2008) e Hasler (2003) relatam uma média entre 5,0 e 5,5 embriões por coleta por doadora quando se trata de *Bos taurus taurus*, enquanto que, em vacas *Bos taurus indicus* os resultados variam entre 8 e 9 embriões por coleta (BARUSELLI et al., 2006; NOGUEIRA et al. 2007). Segundo Kafi e Mc Gowan (1997), essa variação pode ser influenciada por fatores intrínsecos como idade, raça e variação, devido à presença de folículo dominante, ou extrínseco, como ambiente, nutrição, infecções subclínicas e lactação.

A qualidade embrionária é outro fator que influencia diretamente os resultados da TE. Em estudo recente, Chebel e colaboradores (2008) relataram diferença significativa na taxa de gestação de embriões de diferentes qualidades. Os autores observaram taxas de gestação de 59,4; 53.8 e 35.2 % para embriões grau I, II e III, respectivamente, mostrando que quanto melhor a qualidade do embrião, maior é a taxa de gestação, fato também observado em estudos anteriores (DEMCZUK et al., 1998; HASLER, 2001).

Atualmente, de maneira geral, as taxas de gestação em programas de transferência de embriões variam de 55 a 70 % para embriões transferidos a fresco e 50 a 65% para congelados para taurinos (GRIMES, 2003). Para zebuínos, esses resultados são cerca de 15% menor (NOGUEIRA et al., 2007).

Com o intuito de melhorar os resultados quanto às taxas de gestação e a produção de embriões, estudos que permitam compreender melhor o ciclo estral e a dinâmica folicular em bovinos estão sendo desenvolvidos, sendo importante tanto em doadoras quanto nas receptoras (MAPLETOFT et al., 2009).

2.2 Ciclo estral e dinâmica folicular em bovinos

Ciclo estral define-se como sendo o ritmo funcional dos órgãos femininos que se estabelece a partir da puberdade. Compreende as modificações cíclicas na fisiologia e na morfologia dos órgãos genitais e também no perfil dos hormônios relacionados ocorridos entre dois episódios de estro (ADAMS et al, 2008).

Os bovinos são animais poliéstricos anuais (HAFEZ e HAFEZ, 2004), ou seja, apresentam vários ciclos estrais ao longo do ano. Em fêmeas bovinas o ciclo estral varia de 17 a 25 dias, com intervalos médios de 20 dias para novilhas e 22 dias para vacas (SIROIS e FORTUNE, 1988).

O ciclo estral dos bovinos pode ser dividido em duas fases distintas. A primeira, fase folicular, é caracterizada pelo desenvolvimento do folículo, estrutura no ovário que contém o ovócito, e culmina com a liberação do mesmo (ovulação). A segunda, denominada de fase luteínica, é caracterizada pelo desenvolvimento do corpo lúteo. Esta estrutura, formada após a ruptura do folículo, produz progesterona, que é o hormônio responsável pela manutenção da gestação (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

O ciclo estral é regulado por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos, principalmente por hormônios hipotalâmicos, as gonadotrofinas e os esteróides secretados pelos ovários (HAFEZ & HAFEZ, 2004) e é caracterizado pelo crescimento e regressão de folículos e do CL.

Com o desenvolvimento dos folículos ocorre o aumento nos níveis de estradiol e inibina na circulação, o que provoca a redução do FSH para níveis basais por meio de *feedback* negativo na hipófise (FORTUNE et al., 2004). GINTHER et al. (2001) citam que após a ocorrência do pico de FSH, suas concentrações começam a declinar até que os folículos crescentes atinjam tamanho em torno de 4,0 a 8,5 mm. A partir daí ocorre a chamada divergência folicular, que é o momento da seleção do folículo dominante, que consiste em um mecanismo fisiológico complexo que não está ainda totalmente esclarecido.

Na supressão final de FSH (quando está alcançando níveis basais) ocorre um desvio nas taxas de crescimento entre folículos subordinados e folículo dominante,

sendo que o folículo dominante passa a ser dependente de LH e os outros entram em atresia, pois são dependentes de FSH (GINTHER et al., 1996). De acordo com FORTUNE et al. (2004), os folículos dominantes possuem maior quantidade de mRNA para receptor de LH nas células da granulosa e da teca quando comparados com folículos subordinados, mas os níveis de mRNA para os receptores de FSH nas células da granulosa não são diferentes.

Segundo Sartori e colaboradores (2001), o folículo dominante adquire capacidade ovulatória logo após o início da divergência e esta capacidade não ocorre antes da divergência e em folículos subordinados. Os autores concluíram, portanto que a divergência é um importante componente que permite que o folículo dominante continue crescendo sob o efeito de LH.

Entre uma ovulação e outra o desenvolvimento folicular se apresenta como uma seqüência dinâmica de eventos fisiológicos que envolvem o desenvolvimento e atresia de folículos antrais que se assemelham a ondas (PIERSON e GINTHER 1984).

Com a técnica da ultra-sonografia, pesquisadores comprovaram a teoria de que o crescimento dos folículos se dava em forma de ondas e verificaram a ocorrência de duas a quatro ondas em cada ciclo (GINTHER et al. 1989). Com essa técnica foi possível avaliar o surgimento das estruturas ovarianas e correlacioná-las com os eventos endócrinos em tempo real no decorrer do ciclo estral.

Cada onda de crescimento folicular é dividida em quatro fases: emergência, seleção, dominância e atresia ou ovulação (REIS, 2004). A emergência de uma onda é caracterizada por um crescimento de mais de 20 folículos pequenos que são estimulados pelo FSH e destes folículos, apenas um continua seu desenvolvimento, enquanto os outros sofrem decréscimo de tamanho, estabelecendo-se então, o fenômeno da divergência folicular (BARUSELLI et al., 2006).

Na maioria das fêmeas bovinas a emergência da primeira onda folicular ocorre no dia da ovulação (dia 0), independente do número de ondas durante todo o ciclo. A emergência da segunda onda ocorre no dia 9 ou 10 em animais com ciclos de duas ondas, e no dia 8 ou 9 em animais com ciclos de três ondas. Em ciclos de três ondas, a terceira emerge no dia 15 ou 16. Sob a influência da alta concentração sérica de progesterona (diestro), os folículos dominantes de ondas sucessivas entram em atresia. O folículo dominante originado da onda onde já ocorreu o início

da luteólise transforma-se em folículo ovulatório, e essa culmina com a ovulação. O CL começa a regressão mais cedo em ciclos de duas ondas (dia 16) do que ciclos com três (dia 19), tendo como resultado um ciclo estral mais curto (19-20 dias contra 22-23 dias). Assim, o chamado ciclo estral de 21 dias em bovinos existe somente como uma média entre ciclos de duas e três ondas (ADAMS et al., 2008).

A dinâmica folicular em animais zebuínos tem se mostrado diferente daquela de bovinos de raças européias, sendo que o diâmetro dos folículos dominantes e a área do corpo lúteo são menores nas fêmeas zebuínas (BORGES et al., 2004). Outros relatos referentes aos dois grupos genéticos é que há maior incidência de três ondas em zebuínos, sendo descrita a presença de até quatro ondas de crescimento folicular por ciclo estral em vacas desse grupo genético (BARUSELLI et al., 2006).

O processo de crescimento e a atresia folicular continuam enquanto houver um corpo lúteo funcional, ocorrendo mesmo durante a gestação (THATCHER et al., 2001).

2.3 Superovulação em bovinos

O objetivo da superovulação é permitir que folículos subordinados, que naturalmente entrariam em atresia devido ao efeito do folículo dominante, continuem crescendo até o estágio no qual possam ovular (MAPLETOFT et al., 2002).

Diferentes fontes hormonais têm sido utilizadas para a superovulação em bovinos, entre estas estão o FSH e a eCG (BARUSELLI et al., 2008). A eCG possui uma meia-vida longa (em torno de 40 h) e por isso é normalmente administrada em uma única injeção. Devido à sua longa meia-vida pode ocorrer um estímulo ovariano contínuo e com isso ocasionar um maior número de folículos anovulatórios, perfil endócrino anormal e redução na qualidade embrionária. Por outro lado, o FSH, por possuir uma meia-vida curta, usualmente é administrado por 4 a 5 dias em duas

doses diárias com intervalo de 12 h. Desta maneira consegue-se resposta superovulatória e recuperação embrionária satisfatória (Revisado por MAPLETOFT et al., 2002).

Os principais produtos à base de FSH comercializados atualmente são o Folltropin-V® (Bioniche Animal Health) e o Pluset® (Hertape-Calier). O primeiro é considerado FSH purificado, pois não contém LH em sua composição. Já o segundo contém a mesma concentração de LH/FSH (KELLY et al. 1997).

A bioatividade das gonadotrofinas varia entre os produtos disponíveis, mesmo entre produtos dentro de cada partida, ou seja, cada formulação de FSH tem sua própria dose ótima. Nas formulações não purificadas uma determinada concentração de LH pode ser tolerada, pois este não exerce um efeito negativo na resposta superovulatória (SCHERZER et al., 2008).

Kelly et al. (1997) mostraram ser possível obter um número satisfatório de embriões na superovulação de novilhas mestiças usando tanto Folltropin-V®, quanto Pluset®. No entanto, apesar de apresentar um maior número total de estruturas, o grupo superovulado com Pluset apresentou uma maior quantidade de estruturas não fertilizadas.

2.3.1 Fatores que influenciam a resposta superovulatória

A grande variação na resposta superovulatória continua sendo o maior obstáculo para a rotina de produção de embriões bovinos pelos métodos de superovulação em larga escala (SCHERZER et al., 2008). Por isso o entendimento dos fatores que influenciam a resposta superovulatória torna-se ponto chave quando se pretende minimizar esses efeitos. Hasler (1992) reportou uma média de cinco embriões por superovulação em vacas holandesas, mas com uma variação de 0 a 50 embriões.

Nas últimas duas décadas enormes esforços têm sido realizados com o intuito de se pesquisar os fatores que influenciam a resposta superovulatória em

bovinos. No entanto, pouco avanço foi feito na redução da variação entre doadoras (BARROS e NOGUEIRA, 2004).

Mapletoft et al. (2002) citam que a gonadotrofina utilizada, a dose total, duração e momento do início do tratamento e o uso de hormônios adicionais no esquema de superovulação são as principais causas de variabilidade na resposta ovariana. Contudo, os autores afirmam que outros fatores inerentes ao animal e ao ambiente podem ser as mais importantes fontes de variabilidade.

Já Kafi e McGowan (1997) dividem os fatores de variabilidade na resposta superovulatória em duas classes: os intrínsecos e os extrínsecos. O primeiro trata-se de fatores como idade, raça e variação causada pela presença de folículo dominante no início do tratamento. Já o segundo engloba fatores como estação do ano, ambiente, nutrição, infecções subclínicas, lactação e o uso de preparações de FSH não purificadas.

Dentro dos fatores intrínsecos a raça pode influenciar de maneira significativa na resposta superovulatória. Esse fator está diretamente ligado ao número de ondas foliculares, pois, dependendo do número de ondas que o animal apresente durante o ciclo estral (2, 3 ou 4) a emergência de uma onda folicular ocorrerá em momentos diferentes, assim, o início do tratamento deve ser sincronizado com o início de uma destas ondas para melhor resposta (MAPLETOFT et al., 2002).

O status ovariano no início do tratamento influencia na resposta superovulatória, sendo este também considerado um fator intrínseco. Adams et al. (1994a) e Mapletoft et al. (2002) afirmam que a ausência de folículo dominante no início do tratamento com gonadotrofinas aumenta a eficiência dos programas de superestimulação ovariana, no entanto, não reduzem a variabilidade na resposta ao tratamento, pois trata-se de um fator inerente ao animal.

O grupo genético também influencia na resposta ao tratamento superovulatório. Geralmente, vacas *Bos taurus indicus* apresentam maior resposta ao tratamento quando comparado com vacas *Bos taurus taurus* (BARUSELLI, et al., 2006; De FEU et al., 2008; HASLER, 2003; NOGUEIRA et al., 2007). Esta diferença pode estar associada aos níveis de IGF-I plasmático, que nos zebuínos é mais elevado, gerando o recrutamento de um maior número de folículos por onda e uma

maior responsividade às gonadotrofinas exógenas neste grupo genético (ALVEREZ et al., 2000; SIMPSON et al., 1997).

No entanto, apesar de vacas zebuínas possuírem uma maior população folicular no momento de recrutamento e maior responsividade às gonadotrofinas exógenas, também é relatado nesse grupo uma grande variabilidade individual. Baruselli et al.(2003), citado por Martins (2007), concluíram que a doadora foi a principal fonte de variação na resposta ao tratamento superovulatório, sendo observado efeito individual no número de corpos lúteos, na taxa de recuperação, no total de estruturas recuperadas e no número de embriões transferíveis e congeláveis.

2.3.2 Controle da dinâmica folicular para superestimulação ovariana

Nos últimos 10 anos estudos têm sido realizados para avaliar métodos para a manipulação do ciclo estral bovino com o intuito de sincronizar a emergência de uma nova onda folicular, pois, pesquisas têm mostrado que a resposta superovulatória é maior quando o tratamento é iniciado precisamente no momento da emergência da onda folicular ao invés de um ou dois dias depois (ADAMS et al., 1994b; NASSER et al., 1993). Para tanto, têm sido utilizados diferentes métodos, como remoção mecânica do folículo dominante (BERGFELT et al., 1997) e métodos farmacológicos como o uso de GnRH (PURSLEY et al., 1995) e a utilização de estrógeno associado a progestágenos (BÓ et al., 1995a).

Tradicionalmente o protocolo de superovulação tem sido iniciado no meio do ciclo estral (entre os dias 8 e 12 após o estro), que corresponde ao período de emergência da segunda onda folicular em animais que apresentam ciclos de duas ou três ondas (BÓ et al., 1994). No entanto, os métodos de manipulação do ciclo estral têm se mostrado eficientes e, apesar de não reduzir a variabilidade individual na resposta ao tratamento, contribuíram de forma significativa para a adoção mais intensa da transferência de embriões, pois permitiu sua utilização em períodos pré-

determinados. Assim, a possibilidade de sincronizar a emergência da onda folicular permite o início da superovulação a qualquer momento e elimina a necessidade de detecção do estro e a espera de 8 a 12 dias para o início do tratamento com gonadotrofinas (BÓ et al., 2008).

Em vacas zebuínas o tratamento eletivo para sincronização da emergência da onda folicular tem sido a associação de estrógeno e progesterona (Martins, 2007). Este protocolo tem sido estudado também em *Bos taurus taurus* por diversos autores (BÓ et al., 1994; 1995b; COLAZO et al., 2003, 2005; MARTINEZ et al., 2000). Em estudo avaliando a emergência folicular após tratamento associando Benzoato de estradiol e progesterona em animais zebuínos, taurino e zebuino x taurino, Carvalho (2004) não encontrou diferença no intervalo entre o início de tratamento e a emergência da onda folicular, mostrando que esse protocolo pode ser utilizado em animais dos grupos genéticos, bem como em seus cruzamentos.

Diversos ésteres de estradiol estão atualmente disponíveis comercialmente, entre eles o Benzoato de estradiol, o Valerato de estradiol e o Cipionato de estradiol. Esses medicamentos possuem a capacidade de promover a regressão de folículos antrais quando administrados em momento em que a concentração de progesterona plasmática se encontra elevada (BÓ, 1995b). A principal diferença apresentada entre os ésteres citados é a meia-vida de cada produto, sendo que o Valerato e o Cipionato apresentam uma meia-vida mais longa, gerando assim uma menor sincronia da onda folicular e início mais tardio quando comparado com o Benzoato (COLAZO, 2005).

Visando melhorar a sincronia do início de uma nova onda, Martins et al. (2005) avaliaram a administração intramuscular de progesterona no mesmo dia da colocação do implante e a aplicação de benzoato de estradiol e constataram que dessa maneira houve um atraso no início da nova onda ($4,2^a \pm 0,1^y$ dias) e uma maior sincronia quando comparado com o grupo sem a administração de progesterona ($2,8^b \pm 0,2^x$ dias). Estes dados sugerem que o uso de progesterona intramuscular juntamente com a colocação do implante e a administração de benzoato de estradiol permite que um maior número de doadoras inicie a onda em um mesmo momento, trazendo benefício quando se trabalha com grupo de doadoras.

Outros hormônios também têm sido utilizados como alternativa para a sincronização da emergência da onda folicular. Tem sido descrito que a administração de GnRH induz a ovulação ou a luteinização de folículos grandes no momento da aplicação (MACMILLAN e THATCHER, 1991), com a emergência da onda aproximadamente dois dias após. No entanto, de acordo com Martinez et al. (1999), os resultados com este tratamento não possuem grande variação, pois a emergência de uma nova onda ocorre somente nos animais que possuíam folículo capaz de ovular e mais de 40% das fêmeas não ovularam.

O hormônio luteinizante também tem sido testado na sincronização do ciclo estral em bovinos. Martinez et al. (1999) mostraram que a administração de LH foi mais eficiente do que o GnRH na indução da ovulação, pois apresentou uma falha na ovulação de 22%, contra 44% nos animais tratados com GnRH. Esse dados corroboram os encontrados recentemente por Colazo et al. (2009), que, comparando o GnRH e LH na indução da ovulação em vacas holandesas verificaram que 62,4% e 44,2% das vacas ovularam com a administração de LH e GnRH, respectivamente ($P < 0,01$). Os autores encontraram ainda uma maior diferença no grupo de vacas acíclicas (61,6 % x 38,3%).

Segundo Bó et al.(2008), uma opção para diminuir a variabilidade da resposta em termos de emergência de uma nova onda folicular após a administração de GnRH ou LH é garantir que um folículo dominante viável esteja presente no momento do tratamento. Contudo, a superovulação iniciada após a sincronização utilizando GnRH ou LH não tem sido estudada.

Em bovinos a primeira onda de crescimento folicular se inicia após a ovulação (ou um dia depois da manifestação do estro) (GINTHER et al., 1989). Nasser (2006) mostrou que é possível obter resultados semelhantes quanto à produção de embriões utilizando a primeira onda de crescimento folicular, com suplementação exógena de progesterona ou utilizando uma onda induzida pela administração de benzoato de estradiol + progesterona. Resultados semelhantes foram descritos por Adams et al. (1994b), que não observaram diferença na resposta superovulatória de vacas superestimuladas na primeira ou segunda onda folicular.

2.3.3 Inseminação artificial em tempo fixo em doadoras superestimuladas

Mesmo com a utilização de estratégias para a manipulação do ciclo estral, com o intuito de iniciar uma nova onda folicular para o início do tratamento superovulatório, o momento da inseminação artificial depende da detecção do estro (Martins, 2007).

Em *Bos taurus indicus* a detecção do estro é dificultada pelas características comportamentais e fisiológicas desses animais, pois apresentam curto período de aceitação da monta e alta incidência de cios noturnos (Bó, 2003). Assim, a programação da coleta de embriões é dificultada e aumenta a chance de erros na detecção do estro. Neste sentido, estudos têm sido realizados com o intuito de permitir as inseminações artificiais de doadoras zebuínas em tempo predeterminado (BARUSELLI et al., 2006; BÓ et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2002).

Atualmente o protocolo denominado P-36 é o que apresenta melhores resultados e conseqüentemente o mais utilizado (BARROS e NOGUEIRA, 2001; BARROS e NOGUEIRA, 2004; BARUSELLI et al., 2005; NOGUEIRA et al., 2002; NOGUEIRA et al., 2007; ZANENGA et al., 2003). Este protocolo consiste em manter a fonte exógena de progesterona por 36 horas após a aplicação de análogo da prostaglandina e a ovulação é induzida com LH exógeno, administrado 12 h após a remoção da fonte de progesterona, ou seja, 48 horas após a aplicação da prostaglandina. Como a ovulação ocorre entre 24 e 36 horas após a aplicação de LH, as inseminações artificiais em tempo fixo são realizadas 12 e 24 horas após a injeção de LH, evitando assim a inconveniência da detecção do estro (BARUSELLI et al., 2008)

O protocolo P-36 tem se mostrado eficaz em animais da raça Nelore (NOGUEIRA e BARROS, 2001; BARUSELLI et al., 2006, NOGUEIRA et al. 2007). Nogueira et al. (2007) reportaram uma média de $13,3 \pm 0,75$ estruturas totais e $9,4 \pm 0,63$ embriões viáveis, com 71,0% (1279/1807) de viabilidade após a superovulação de 136 doadoras da raça Nelore tratadas com o protocolo P-36.

No entanto a utilização do P36 para superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em animais taurinos promoveu uma redução no número de embriões recuperados comparado com o protocolo com observação de estro. Estes

resultados podem estar ligados às diferenças no desenvolvimento folicular entre zebuínos e taurinos (MARTINS, 2007; CHESTA et al., 2007).

O esquema mais utilizado, para inseminar doadoras superestimuladas tem sido uma inseminação 12 e outra 24 h após a indução da ovulação (NOGUEIRA et al., 2002; BARROS e NOGUEIRA 2005; BARUSELLI et al., 2006). No entanto, estudos têm mostrado ser possível realizar apenas uma inseminação artificial em tempo fixo (IATF). A utilização de uma única inseminação artificial não mostrou diferença significativa na taxa de viabilidade embrionária quando a IATF foi realizada 16 h ou 24 h após a administração de LH, no protocolo P-36, comparado com a utilização de duas inseminações artificiais (Baruselli et al., 2006). Estes resultados mostram que é possível uma redução significativa nos custos de programas de transferência de embriões, visto que, o custo com sêmen, dependendo do reprodutor, representa um investimento significativo. Entretanto, deve-se tomar especial cuidado com a qualidade e quantidade de sêmen a ser utilizado em uma única IATF em vacas superovuladas, a fim de evitar queda na produção de embriões.

2.3.4 Indução da ovulação para transferência de embriões em tempo fixo

Diferenças fisiológicas entre animais zebuínos e taurinos têm sido relatadas, principalmente no tamanho do folículo no momento da divergência folicular (BARUSELLI et al., 2006) Em vacas Nelore, no momento da divergência os folículos apresentam diâmetro de 6,0 (SARTORELLI et al., 2005) a 6,3 mm (GIMENES et al., 2005). Por outro lado o diâmetro folicular em vacas holandesas no momento da divergência é aproximadamente de 8,5 mm (GINTHER et al., 1997). No entanto, nem todos os folículos que adquirem esse diâmetro possuem a capacidade ovulatória. Gimenes et al. (2005) avaliaram a resposta de folículos de diferentes tamanhos à indução da ovulação com LH em novilhas Nelore. Os autores classificaram os folículos em três categorias: 7 – 8,4; 8,5 – 10; > 10 mm e encontraram uma taxa de ovulação de 33,3%, 80% e 90%, respectivamente,

mostrando um aumento linear em função do tamanho do folículo. Estes resultados são discordantes dos encontrados em vacas Holandesas. Sartori et al. (2001), relataram que depois que os folículos de animais desta raça passam pela divergência, estes já possuem a capacidade de ovular caso seja realizada a indução com LH.

Frente a essas diferenças fisiológicas, diversos estudos têm sido realizados em zebuínos e taurinos com intuito de avaliar o melhor momento de indução da ovulação em protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo (BARUSELLI et al, 2006; BÓ et al, 2006; CHESTA et al., 2007; NOGUEIRA et al., 2002; NOGUEIRA et al., 2007).

Nogueira et al. (2002) testaram dois momentos de indução da ovulação em vacas Nelore superestimuladas (LH 48 ou 60 h após a PGF2 α) com inseminação 10 e 20 h após o LH. Não foi observada diferença significativa quanto ao número total de estruturas, embriões fertilizados, embriões transferíveis e taxa de prenhez entre os grupos analisados.

Por outro lado, em estudo semelhante, Martins et al. (2007) verificaram que, quando a indução da ovulação foi atrasada de 12 (LH 48 h após PGF2 α) para 24 h (LH 60 h após PGF2 α), utilizando o protocolo P-36 em vacas Nelore, houve diferença significativa na produção de embriões. O protocolo que utilizou a indução 60 h após PGF2 α apresentou resultados inferiores ($P < 0,05$) quanto ao número de embriões transferíveis e congeláveis e mostrou ainda um aumento no número de embriões degenerados ($p < 0,01$).

Diferentemente do encontrado na raça Nelore, o atraso na indução da ovulação (LH 60 h após a PGF2 α) em protocolos de superovulação com inseminação em tempo fixo em animais taurinos apresentou resultados superiores ao protocolo com indução 48 h após a PGF2 α . Martins et al. (2007) constataram que o atraso na indução foi mais eficiente na produção de embriões transferíveis. Resultados semelhantes foram obtidos por Chesta et al. (2007) utilizando vacas da raça Angus, onde foram comparados os mesmos momentos de indução com LH e observaram que o atraso de 12 h na administração do LH também foi superior na produção de embriões. Com isso, pode-se concluir que, para taurinos, o melhor momento para indução da ovulação com LH em vacas superovuladas utilizando-se

protocolos com inseminação artificial em tempo fixo é o de 60 h após a PGF2 α (BARUSELLI et al., 2006).

A administração de GnRH também tem sido testada como indutor de ovulação. Estudos mostram que não há diferenças significativas quando é feita a substituição do LH pelo GnRH na produção de embriões em vacas taurinas e zebuínas superestimuladas (BARROS e NOGUEIRA, 2001; BÓ et al. 2006; RODRIGUES et al., 2005; CHESTA et al. 2007).

No entanto, para vacas taurinas, quando o GnRH é administrado 60 h após a PGF2 α , assim como acontece com a administração do LH, ocorre uma melhora na produção de embriões (RODRIGUES et al., 2005; CHESTA et al. 2007). Assim, pode-se concluir que a indução da ovulação com LH ou GnRH em vacas superestimuladas deve ser realizada 48 h e 60 h após a PGF2 α em vacas zebuínas e taurinas, respectivamente (BARUSELLI et al., 2006).

De acordo com Bó et al. (2006), essas diferenças no melhor momento da indução da ovulação entre zebuínos e taurinos deve-se ao fato das diferenças no desenvolvimento folicular de cada grupo, pois os folículos de vacas taurinas apresentam capacidade ovulatória quando atingem um maior tamanho (≥ 10 mm) comparado com os folículos dos zebus (7-8,4 mm). Desta maneira, o atraso na indução em taurinos seria necessário para que os folículos atingissem um maior tamanho e conseqüentemente fossem responsivos ao LH.

2.3.5 Uso de diferentes doses de FSH para superovulação

Em bovinos, o número de ovulações e a eficiência da coleta de embriões têm mostrado um padrão dose-dependente em relação à quantidade de FSH utilizado. Com o aumento da dose o número de embriões recuperados aumenta até que se atinja um platô. Porém, se a dose for excessiva pode ocorrer falha na ovulação, reduzindo conseqüente a recuperação embrionária (SCHERZER et al., 2008).

Diferenças na sensibilidade aos hormônios usados para superovulação tem sido relatada entre os grupos genéticos *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, sendo que, uma maior sensibilidade é atribuída aos zebus, por isso, utiliza-se uma menor dose nesse animais (BARUSELLI et al., 2006).

Na literatura há uma variação na dose de FSH para cada grupo genético, no entanto, para taurinos, para se conseguir boa resposta superovulatória a dose encontra-se entre 200 e 400 mg (BERGFELT et al., 1994; BÓ et al., 2006; CHESTA et al., 2007; COSCIONI et al., 2005; DE FEU et al., 2008; KELLY et al., 1997; SANTOS e VASCONCELOS, 2007). Por outro lado, em vacas zebuínas a dose encontra-se abaixo de 200 mg (BARROS e NOGUEIRA, 2002; BARUSELLI et al., 2005; BARUSELLI et al., 2006; MARTINS, 2007; NOGUEIRA et al., 2007).

Baruselli et al. (2006) comparando três diferentes doses de Folltropin-V (100, 133 e 200mg) para a superovulação de vacas nelore (*Bos taurus indicus*), não encontraram diferenças significativas quanto ao número de estruturas recuperadas e embriões viáveis, mostrando ser possível reduzir a dose e ainda assim ter os mesmos resultados. Barati et al. (2006) encontraram resultados semelhantes superovulando vacas da raça iraniana Sistani (*Bos taurus indicus*), não encontrando efeito no número de estruturas recuperadas comparando as doses de 120, 160 e 200 mg de Folltropin-V® (Bioniche Animal Health, Belleville, Ontário, Canadá).

Por outro lado, em animais de outras raças tem sido observado efeito da dose de FSH utilizada. Prado e Toniollo (2006) superovularam 67 vacas da raça Gir com 300, 400 e 500 UI de PLUSET (Hertape-Calier Saúde Animal, Juatuba, MG, Brasil), obtendo 1,4; 2,9 e 1,6 embriões viáveis, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados por Prado et al. (2007), que, comparando as mesmas doses, encontraram uma média de estruturas viáveis de 1,7; 3,4 e 1,7, respectivamente, mostrando que nessa raça a dose se apresenta de forma quadrática.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a resposta superovulatória de vacas da raça Red Sindi superovuladas com três diferentes doses de FSH (Folltropin V®).

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a eficiência do protocolo P36 para a superovulação de vacas Red Sindi;

- Avaliar a taxa de recuperação utilizando-se diferentes doses de FSH.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do experimento e animais

O experimento foi realizado no Setor de Reprodução Animal do Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizado no município de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil (latitude: $-22^{\circ} 44' S$; longitude: $43^{\circ} 42' O$; altitude: 26 m). Foram utilizadas 16 vacas Red Sindi (Figura1), não lactantes, com idade variando entre 4 e 10 anos, com escore de condição corporal entre 3,5 e 4,0 (escala de 1 a 5), mantidas a pasto e suplementadas com sal mineral *ad libitum*.



Figura 1: Doadoras Red Sindi do rebanho da UFRRJ

4.2 Delineamento experimental

Com o objetivo de determinar a melhor dose de FSH, as vacas foram distribuídas de maneira aleatória nos três grupos experimentais, nos quais receberam 100; 133 e 200 mg de Folltropin-V[®] (Bioniche Animal Health, Belleville, Ontário, Canadá; 1 mg corresponde a 1 mg de NIH-FSH-P1) como tratamento superovulatório. Foram realizadas quatro repetições em cada grupo experimental, entre abril e dezembro de 2008, totalizando 16, 13 e 14 superovulações nos grupos de 100, 133 e 200mg de Folltropin-V[®], respectivamente. A resposta superovulatória foi determinada pelo número de corpos lúteos (CL) presentes em ambos os ovários no sexto dia (D6) após a primeira inseminação, e pelo número de estruturas recuperadas, porcentagem de estruturas recuperadas (estruturas recuperadas/CL) e qualidade embrionária no D7. Foi avaliado também o estágio de desenvolvimento embrionário das estruturas recuperadas.

4.3 Tratamento superovulatório das doadoras

Para a superovulação e inseminação com tempo fixo das doadoras foi utilizado o protocolo descrito por Barros e Nogueira (2001), denominado P-36, variando-se apenas a dose do FSH, conforme o tratamento (100, 133 ou 200 mg de Folltropin-V[®], VISINTIN et al., 1999; BARUSELLI et al., 2006).

O tratamento foi iniciado em dia aleatório do ciclo estral, com a colocação de um dispositivo intravaginal com 1,9 g de progesterona (CIDR-B[®], Pfizer Animal Health, São Paulo, Brasil) e aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol i.m. (Estrogin[®], Farmavet, São Paulo, Brasil), sendo este considerado o dia 0 (D0). No D4 teve início a administração de FSH em oito doses decrescentes, durante quatro dias consecutivos, com intervalo de 12 horas. Concomitante com a quinta dose de FSH foi aplicado análogo da PGF₂ α (0,5 mg de Cloprostenol sódico; Sincrosin[®], Vallée, Montes Claros, MG, Brasil). O dispositivo de progesterona foi removido na

tarde do D7. Doze horas após a última aplicação de FSH foram administrados 25µg de GnRH (Gestran Plus®, ARSA S.R.L., Buenos Aires, Argentina). As inseminações artificiais foram realizadas 12 e 24 horas após a aplicação do GnRH, com sêmen criopreservado de touro da raça Red Sindi, oriundo de central de inseminação artificial idônea (Figura 2). Seis dias após a primeira inseminação artificial foi realizado exame ultra-sonográfico (Philips-VMI-510-V2, 7,5 MHz) dos ovários para determinar o número de corpos.

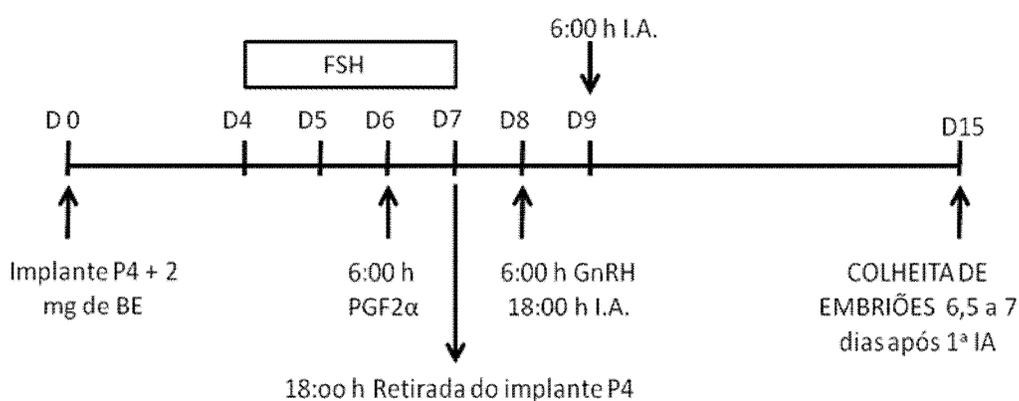


Figura 2: Esquema do protocolo de superovulação das doadoras

4.4 Colheita e avaliação dos embriões

As colheitas dos embriões foram realizadas por meio de lavagem uterina pelo método não-cirúrgico no 6,5º dia após a primeira inseminação artificial. Todos os procedimentos foram realizados por um mesmo técnico. Para as coletas foi utilizada solução de Dullbecco PBS (Nutricell®, Campinas, SP, Brasil). Os embriões recuperados foram transferidos para placas de Petri contendo meio de manipulação TQC® (Nutricell, Campinas, SP, Brasil). Os embriões foram submetidos a cinco lavagens nesse mesmo meio e então classificados morfológicamente sob estereomicroscópio (40x). A classificação quanto ao estágio de desenvolvimento

(não fertilizado, 2–8 células, 8–16 células, mórula inicial-MI, mórula compacta-MC, blastocisto inicial-BI, blastocisto-BL, e blastocisto expandido-BX) e a qualidade (Grau I – Excelente; II – Bom; III – Regular; IV - pobre) foi realizada de modo subjetivo de acordo com o manual da IETS (STRINGFELLOW e SEIDEL, 1998). Os embriões classificados como grau I, II e III foram considerados embriões transferíveis e os classificados como I e II como embriões congeláveis.

4.5 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o programa estatístico SAEG (UFV, 2007). Para testar a normalidade das amostras foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram avaliados usando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. A distribuição dos embriões nos diferentes estádios de desenvolvimento e a porcentagem de embriões viáveis e congeláveis foi avaliada pelo Teste de Qui-quadrado. Nos dados que apresentaram número menor que 5 foi usado o Teste Exato de Fisher. Em todas as análises utilizou-se um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

O número total de corpos lúteos, de estruturas recuperadas, de embriões viáveis e congeláveis após as 43 superovulações (SOV), foi de 186, 77, 56 e 54, respectivamente. Valores médios/SOV e os respectivos erros padrão das médias, bem como os resultados referentes às diferentes doses de FSH nos tratamentos superovulatórios estão representados na tabela 1.

Foi observado efeito da dose no número de corpos lúteos e número de estruturas recuperadas ($P < 0,05$), sendo que a dose de 200mg apresentou os melhores resultados ($6,4 \pm 0,85$ e $3,5 \pm 0,95$, respectivamente). No entanto, foi observada uma redução na porcentagem de estruturas recuperadas, quando se utilizou a dose de 200mg (Figura 3). Não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) entre as doses de 100 e 133 mg nos mesmos parâmetros citados anteriormente. O número de embriões viáveis, o número de embriões congeláveis e a porcentagem de embriões viáveis e congeláveis não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$) entre os três grupos analisados (Tabela 2).

Quanto ao estágio de desenvolvimento embrionário a maioria dos embriões recuperados se encontrava entre os estádios de mórula compacta e blastocisto ($P > 0,05$), porém foram também encontradas em menor quantidade ($P < 0,05$) estruturas nos estádios de mórula inicial e blastocisto expandido (Figura 4).

Tabela 1: Valores médios de resposta ao tratamento superovulatório de vacas Red Sindi tratadas com três diferentes doses de FSH:

FSH (mg)	n	Número de corpos lúteos	Estruturas recuperadas	Qualidade embrionária	
				Embriões viáveis	Embriões congeláveis
100	16	3,4 ± 0,69 ^a	1,1 ± 0,36 ^a	0,81 ± 0,31 ^a	0,75 ± 0,27 ^a
133	13	3,3 ± 0,56 ^a	0,85 ± 0,27 ^a	0,77 ± 0,28 ^a	0,77 ± 0,28 ^a
200	14	6,4 ± 0,85 ^b	3,5 ± 0,95 ^b	2,4 ± 0,66 ^a	2,3 ± 0,65 ^a
Total	43	4,3±0,46	1,79±0,39	1,3±0,27	1,26±0,27

*Resultados com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05)

Tabela 2: Efeito da dose de FSH sobre a porcentagem de embriões viáveis e porcentagem de embriões congeláveis de vacas Red Sindi:

FSH (mg)	Porcentagem de viáveis % (n/total)	Porcentagem de congeláveis % (n/total)
100	76 (13/17) ^a	70 (12/17) ^a
133	91 (10/11) ^a	91 (10/11) ^a
200	67 (33/49) ^a	65 (32/49) ^a

*Resultados com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05)

A relação entre o número de embriões viáveis / total de embriões e o número de embriões congeláveis / total de embriões, bem como o número total de embriões em cada dose está representada na figura 5. Não foi observada diferença significativa entre as doses analisadas (P>0,05).

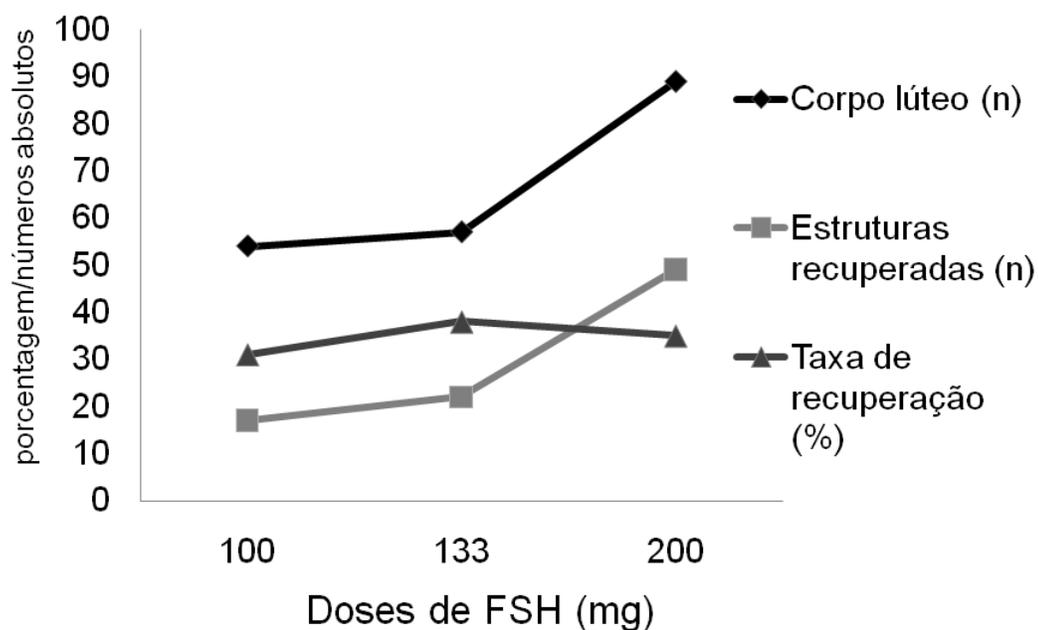


Figura 3: Número total de corpos lúteos, de estruturas recuperadas e taxa de recuperação em vacas Red Sindi de acordo com a dose de FSH.

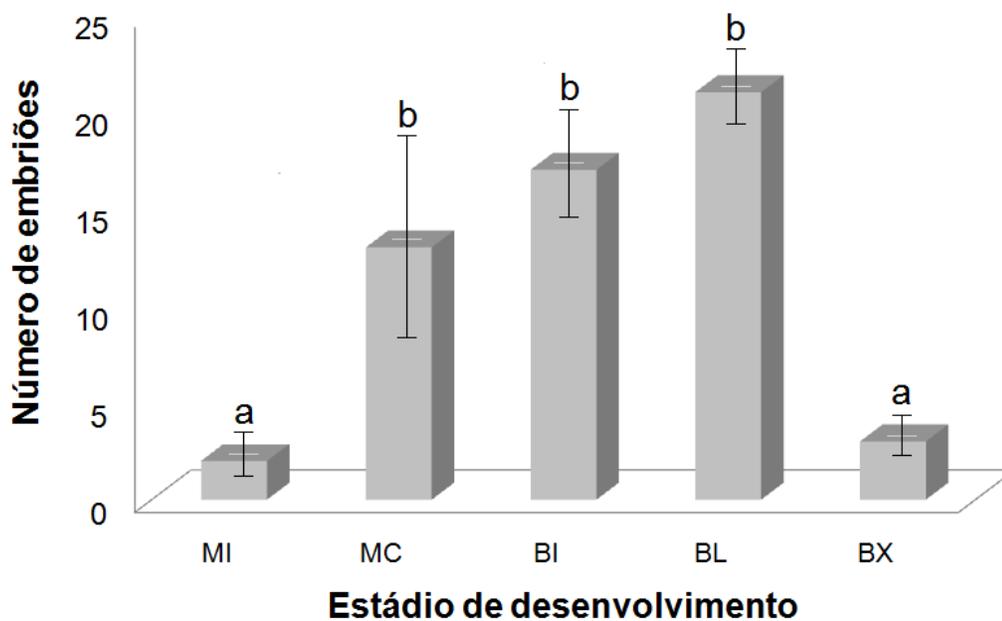


Figura 4: Distribuição dos embriões recuperados segundo estádios de desenvolvimento embrionários de vacas Red Sindi superovuladas. Mórula (MI),

mórula compacta (MC), blastocisto inicial (BI), blastocisto (BL) e blastocisto expandido (BX). *Colunas com letras diferentes diferem entre si ($P < 0,05$).

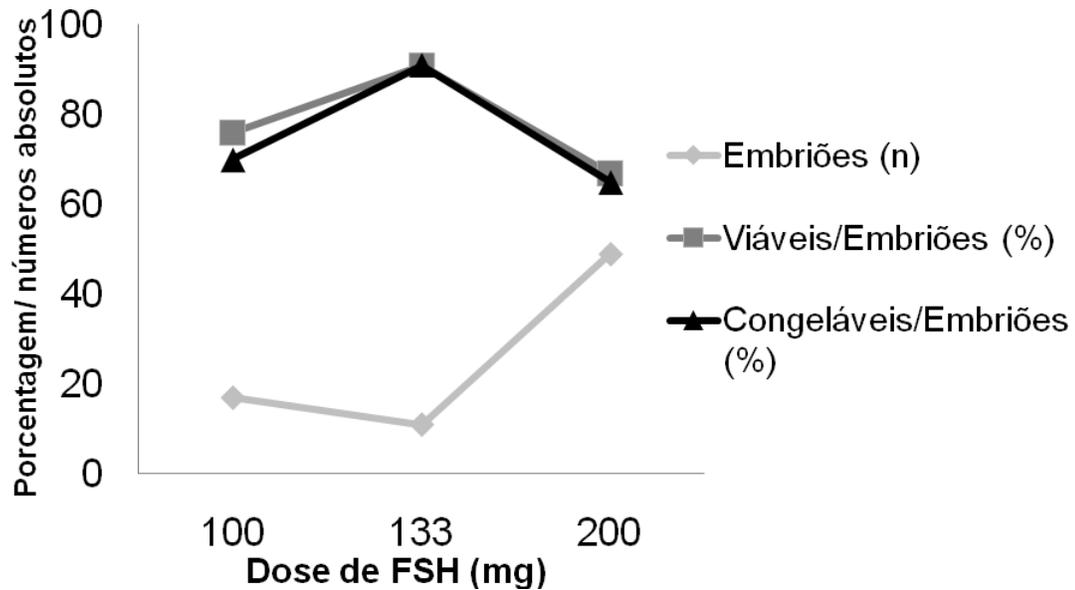


Figura 5: Número de embriões, relação embriões viáveis/total de embriões e embriões congeláveis/total de embriões de número e porcentagem de vacas Red Sindi de acordo com a dose de FSH.

6 DISCUSSÃO

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 (BARROS E NOGUEIRA, 2001; BARUSELLI et al., 2006). No entanto, as marcantes diferenças encontradas entre os grupos genéticos ou raças têm sido fonte de variação nos resultados quando se extrapola um protocolo desenvolvido para um determinado grupo genético ou até mesmo especificamente para uma raça.

De acordo com Moor et al. (1984), diferenças na dinâmica folicular, como o tamanho, a distribuição e as condições dos folículos antrais podem afetar a resposta superovulatória frente ao tratamento hormonal.

Diferenças na fisiologia reprodutiva têm sido descritas entre raças de *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* o que pode, em parte, explicar as variações na resposta superovulatória entre raças desses grupos genéticos. Entre estas se destacam diferenças no diâmetro do folículo dominante e ovulatório, na duração do período de expressão do estro, e uma maior sensibilidade a gonadotrofinas exógenas por parte dos zebuínos (Baruselli et al., 2006).

Frente a essas diferenças, foi necessário o desenvolvimento de protocolos de superovulação adequados às raças zebuínas, visto que estes foram desenvolvidos originalmente em raças taurinas. Para tanto, estudos foram realizados ao longo da última década com o intuito de avaliar a viabilidade de protocolos de superovulação com inseminação em tempo fixo e atualmente o protocolo denominado P-36 é o que apresenta melhores resultados e conseqüentemente o mais utilizado (BARROS et al. 2004; BARROS et al. 2007; BARROS e NOGUEIRA, 2001; BARUSELLI et al., 2005; NOGUEIRA et al., 2002; NOGUEIRA et al., 2007; ZANENGA et al., 2003).

Utilizando esse protocolo para superovulação e inseminação com tempo fixo de doadoras Nelore (subgrupo VIII-D; Felius, 1985), Nogueira et al. (2007) obtiveram uma média de $13,3 \pm 0,75$ estruturas totais e $9,4 \pm 0,63$ embriões viáveis. No entanto, os resultados obtidos no presente estudo, onde se utilizou o protocolo P-36 para superovulação de vacas Sindi (subgrupo VIII-C; Felius, 1985), foram

bastante inferiores ($1,3 \pm 0,27$ embriões viáveis/coleta) às médias de embriões viáveis/coleta descritas em vacas *Bos taurus indicus* (8 a 9 embriões) (BARUSELLI et al., 2006; NOGUEIRA et al. 2007), e *Bos taurus taurus* (5,0 a 5,5) (HASLER, 2003; CHEBEL et al., 2008).

Dentro do protocolo com inseminação em tempo fixo a utilização do FSH como agente indutor de superovulação tem sido extensivamente estudada, sendo avaliado o uso de diferentes doses (BARATI et al., 2006; BARUSELLI et al., 2003; LERNER et al., 1986; VISINTIN et al., 1999).

É geralmente aceito que a dose necessária para superovular vacas *Bos taurus taurus* é maior do que a usada para vacas *Bos taurus indicus*, pois a primeira apresenta maior sensibilidade às gonadotrofinas exógenas (BARATI et al., 2006).

Contudo, mesmo com essa diferença entre os grupos genéticos o fator indivíduo continua sendo determinante, seja em zebuínos ou taurinos. Hasler (1992), em estudo retrospectivo de um período de 13 anos com um total de 6000 vacas holandesas superovuladas reportou uma variação de 0 a 101 estruturas recuperadas e de 0 a 50 embriões recuperados. Variação também encontrada por Baruselli et al. (2003), citados por Martins (2007), que, utilizando vacas Nelore verificaram que a doadora foi a maior fonte de variação, mostrando efeito do indivíduo na taxa de recuperação, estruturas recuperadas, embriões transferíveis e número de corpos lúteos.

Baruselli et al. (2006) comparando três diferentes doses de Folltropin-V (100, 133 e 200mg) para a superovulação de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*), não encontraram diferenças significativas quanto ao número de estruturas recuperadas e embriões viáveis, mostrando ser possível reduzir a dose e ainda assim ter os mesmos resultados. Barati et al. (2006) encontraram resultados semelhantes superovulando vacas da raça Sistani (*Bos taurus indicus*), não encontrando efeito no número de estruturas recuperadas comparando as doses de 120, 160 e 200 mg de Folltropin-V. Por outro lado, os resultados encontrados no presente estudo mostraram que quando a dose de Folltropin-V foi reduzida, houve um decréscimo significativo no número de corpos lúteos e estruturas recuperadas, com os melhores resultados sendo obtidos com a dose de 200 mg de FSH.

A raça Sindi é classificada como pertencente ao Subgrupo VIII-C (Raças Indo-paquistanesas), no qual se encontram os zebuínos com a fronte convexa (Felius, 1985). Neste grupo encontram-se também a raça Deoni, Sahiwal, Nimari e

Gir. Essa última tem se destacado no Brasil, principalmente por estar bem adaptada e com uma boa produção leiteira. Estudos conduzidos para avaliar a resposta superovulatória com diferentes doses de FSH também têm sido realizados na raça Gir, contudo, os resultados obtidos têm sido abaixo do que se consegue em outras raças, tanto em zebuínos, quanto em taurinos, de forma semelhante ao observado no presente trabalho.

Prado e Toniollo (2006) superovularam 67 vacas da raça Gir com 300, 400 e 500 UI de Pluset[®] (Hertape-Calier Saúde Animal, Juatuba, MG, Brasil), obtendo 1,4; 2,9 e 1,6 embriões viáveis, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados por Prado et al. (2007), que, comparando as mesmas doses, encontraram uma média de estruturas viáveis de 1,7; 3,4 e 1,7, respectivamente. No entanto, Visintin et al. (1999) superovulando novilhas da raça Nelore com as mesmas doses de Pluset[®] citadas anteriormente, constataram que a taxa de recuperação de embriões viáveis com 300 UI de FSH foi compatível com a literatura, no entanto, 400 e 500 UI apresentaram baixos resultados. Esses resultados, juntamente com os do presente estudo, sugerem que vacas zebuínas pertencentes ao subgrupo racial VIII-C (Felius, 1985) apresentam baixa resposta ao tratamento superovulatório com FSH exógeno.

Na literatura não existem relatos sobre a dinâmica folicular da raça Sindi. Por isso a utilização de um protocolo desenvolvido para outra raça pode ser inadequado, visto que, pode haver diferenças na fisiologia, mesmo sendo estas raças do mesmo grupo genético (*Bos taurus indicus*). Borges et al. (2003), comparando a dinâmica folicular de vacas Nelore e Gir, verificaram diferenças na taxa de crescimento folicular e no tamanho do folículo ovulatório. Estas diferenças podem afetar a resposta aos hormônios exógenos utilizados para o controle e manipulação do ciclo estral e indução da ovulação, o que torna importante a caracterização da dinâmica da raça a ser utilizada para determinar o melhor momento de aplicação de cada hormônio.

Apesar da dose de 200 mg ter resultado em maiores médias de produção de embriões e resposta ovariana (tabela 2), foi observado uma menor taxa de recuperação (número de CL / número de estruturas recuperadas) como mostrado no gráfico 1. Segundo Cabodevila e Torquati (2001), altas doses de FSH podem gerar uma redução na taxa de recuperação devido à retenção dos oócitos nos folículos luteinizados; retenção dos oócitos e ou embriões no oviduto ou bloqueio da

capacidade de captação dos oócitos pelas fímbrias com a conseqüente caída destes na cavidade abdominal. Por outro lado, Moor et al. (1984) afirmam que, apesar das melhorias nas técnicas de transferência de embriões, o maior problema é baixa taxa de recuperação de embriões viáveis, e este pode ser atribuído à uma variação individual frente ao estímulo superovulatório.

A qualidade embrionária também pode ser influenciada pela dose de FSH utilizada. Donaldson (1984) reportou uma diminuição na qualidade embrionária quando se aumentou a dose de FSH de 28 mg para 60 mg.

No presente trabalho, a dose de 133mg de Folltropin-V foi a que mostrou maior porcentagem de embriões congeláveis e viáveis, enquanto as doses de 100 e 200mg proporcionaram resultados inferiores (tabela 3). Prado et al. (2007), comparando a qualidade embrionária de vacas Gir superovuladas com três doses de FSH encontraram resultado semelhante, sendo a dose de 400 UI melhor que a de 300 e 500 UI para a qualidade dos embriões.

Considerando-se que a dose de 200mg resultou em uma média de embriões recuperados três vezes maior que as médias obtidas com as doses de 100 e 133 mg e que a porcentagem de embriões viáveis do grupo de 200mg foi de 67%, a utilização dessa dose permitiu a obtenção de uma maior quantidade de embriões viáveis por coleta.

Gradela et al. (1996) correlacionaram o número de embriões viáveis por coleta em vacas Nelore com a concentração plasmática de estrógeno e progesterona. Os autores verificaram que, vacas com a concentração de P4 maior que 1 ng/mL, 24 e 48 h após a PGF₂α durante o tratamento de superovulação apresentaram uma maior taxa de recuperação de estruturas totais (82%), no entanto, a qualidade embrionária foi baixa (42% de embriões viáveis). Por outro lado, nos animais que apresentaram concentrações de P4 menor ou igual a 1 ng/mL, foi observada uma baixa taxa de recuperação (59%) e a qualidade foi superior (96% de embriões viáveis). Em relação ao E2 os autores verificaram uma correlação positiva ($r > 0,80$) entre a concentração desse hormônio 48 h após a PGF₂α e o número de embriões viáveis.

No presente trabalho foi observada uma sincronização de desenvolvimento das estruturas recuperadas, com predominância de estádios entre

mórula compacta e blastocisto. Esse aspecto pode estar relacionado à indução da ovulação com a utilização de GnRH no final do protocolo de superovulação.

Nas condições desse trabalho, vacas da raça Sindi mostraram baixa resposta ao protocolo de superovulação utilizado, porém com elevada porcentagem de embriões viáveis e congeláveis. Sendo assim, torna-se necessário estudar a dinâmica folicular de vacas dessa raça, bem como o perfil hormonal durante a superovulação, visando definir estratégias de superovulação mais adequadas, assim como avaliar protocolos mais adaptados.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que:

- Dentre as doses de FSH testadas, a de 200 mg se mostrou mais indicada para a superovulação de vacas Sindi;
- O protocolo utilizado permitiu a recuperação de elevada porcentagem de embriões de boa qualidade;
- Vacas da raça Sindi se mostraram pouco responsivas ao protocolo utilizado;
- As respostas das doadoras Sindi aos protocolos superovulatórios utilizados foram semelhantes às descritas para vacas do subgrupo genético VIII-C.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, G.P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation. **Theriogenology**, v. 41, p. 19-24, 1994a.
- ADAMS, G.P.; NASSER, L.F.; BO, G.A.; GARCIA, A.; DEL CAMPO, M.R.; MAPLETOFT, R.J. Superovulatory response of ovarian follicles of wave 1 versus wave 2 in heifers. **Theriogenology**, v. 42, p. 1103-1113, 1994b.
- ADAMS, G.P.; JAISWAL, R.; SINGH J.; MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v.69, p.72-80, 2008.
- ALVAREZ, P.; SPICER, L.J.; CHASE J.R. C.C.; PAYTON, M.E.; HAMILTON, T.D.; STEWART, R.E.; HAMMOND, A.C.; WETTEMAN, R.P. Ovarian and endocrine characteristics during the estrous cycle in Angus, Brahman and Senepol cows in a subtropical environment. **Journal of Animal Science**, v.78, p.1291-1302, 2000.
- BARATI, F.; NIASARI-NASLAJI, A.; BOLOURCHI, M.; SARHADDI, F.; RAZAVI, K.; NAGHZALI, E.; THATCHER, W.W. Superovulatory response of Sistani cattle to three different doses of FSH during winter and summer. **Theriogenology**, v. 66, p. 1149–1155, 2006.
- BARROS C.M., BARCELOS A.C.Z.B.; NOGUEIRA F.G. Tratamentos superestimulatórios utilizados em protocolos para transferência de embriões bovinos. Superstimulatory treatments utilized in bovine embryo transfer protocols. **Acta Scientiae Veterinariae**. 35(Supl. 3): s759-s766, 2007.
- BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**; v. 56, p. 1483–96, 2001.

- BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. Superovulação em zebuínos de corte. I **Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, Londrina, PR, 2004.
- BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. Superovulation in Zebu Cattle: Protocol P36. In: **Embryo Transfer Newsletter**, p. 5–9, 2005.
- BARUSELLI P.S., MARTINS C.M., SALES J.N.S. & FERREIRA R.M.. Novos avanços na superovulação de bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**. V. 36 (Supl. 2), p.s433-s448, 2008.
- BARUSELLI, P.S., SA FILHO, M.F., MARTINS, C.M., NASSER, L.F., NOGUEIRA, M.F., BARROS, C.M., BO, G.A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle, **Theriogenology**, v. 65, p. 77–88, 2006.
- BARUSELLI, P.S.; MARTINS, C.M.; SÁ FILHO, M.F.; NASSER, L.N.; GIMENES, L.U.; MADUREIRA, E.H.; BÓ, G.A.. Novos avanços nos tratamentos de doadoras e de receptoras de embrião bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, 33 (Supl 1): 151-156, 2005.
- BERGFELT, D.R.; BÓ, G.A.; MAPLETOFT, R.J.; ADAMS, G.P. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle. **Animal Reproduction Science**; v. 49, p. 1–12, 1997.
- BERGFELT, D.R.; LIGHTFOOT, K.C.; ADAMS, G.P. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. **Theriogenology**, v. 42, p. 895–907, 1994.
- BÓ, G.A., GUERRERO, D.C., ADAMS, G.P. Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. **Theriogenology**, v.69, n.1, p.81-87, 2008.

- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON; R.A., CACCIA, M.; TRIBULO, H.; MAPLETOFT, R.J. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v. 41, p. 1555-1569, 1994.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P; CACCIA, M.; MARTÍNEZ, M.; PIERSON, R.A.; MAPLETOF, R.J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 39, p. 193–204, 1995a.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; CHESTA, P.M.; MARTINS, C.M. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. **Theriogenology**, v.65, p.89-111, 2006.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTINEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 307–26, 2003.
- BÓ; G.A., ADAMS; G.P., PIERSON; R.A., MAPLETOFT; R.J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**; v. 43, p. 31–40, 1995b.
- BORGES, A. M.; TORRES, C. A. A.; RUAS, J. R. M.; ROCHA JUNIOR, V. R.; RUAS, J. R. M; GIOSSO, M. M.; FONSECA, J. F.; CARVALHO, G. R.; MAFFILI, V. Follicular dynamic and ovulation time of non-lactating Gir and Nelore cows during two seasons of the year. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.80, n.5, p. 346-354, 2004.
- BORGES, A. M.; TORRES, C. A. A.; RUAS, J. R. M.; ROCHA JÚNIOR, V. R.; CARVALHO, G. R.; MARCATTI NETO, A.; ASSIS, A. J. Características da dinâmica folicular e regressão luteal de vacas das raças Gir e Nelore após tratamento com cloprostenol sódico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 85-92, 2003.
- CABODEVILA, J.; TORQUATI, S. Superovulación de hembras bovinas. In: PALMA, G.A. **Biología de La Reproducción**. Balcarce, Argentina : Ediciones, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria,. Cap.VI, p.79- 108, 2001.

- CARVALHO, J.B.P. Sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR) em novilhas *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus* e *Bos taurus*. **Tese (Doutorado)**, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2004.
- CHEBEL R.C., DEMÉTRIO D.G.B., METZGER J. Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. **Theriogenology**, v.69, p. 98-106, 2008.
- CHESTA, P.; TRIBULO, L.; TRIBULO, H.; BALLA, E.; BARUSELLI, P.S.; BÓ, G.A. Effect of time of ovulation induction by gonadotropin-releasing hormone or pituitary luteinizing hormone on ova/embryo production in superstimulated beef cows inseminated at a fixed time. **Reproduction, Fertility and Development**; 307 (abstract), 2007.
- COLAZO, M.G. Use of steroid hormones or GnRH to synchronize and resynchronize follicular wave emergence, estrus, and ovulation in cattle. **Tese de Doutorado (Ph.D.)**, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canadá, 2005.
- COLAZO, M.G.; GORDON, M.B.; RAJAMAHENDRAN, R.; MAPLETOFT, R.J.; AMBROSE, D.J. Pregnancy rates to timed artificial insemination in dairy cows treated with gonadotropin-releasing hormone or porcine luteinizing hormone. **Theriogenology**, v. 72, p. 262–270, 2009.
- COLAZO, M.G.; MARTÍNEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R.J. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. **Theriogenology**, v. 60, p. 855-865, 2003.
- CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. Brasília; CNA; disponível em: www.cna.org.br; acessado em agosto de 2009.

- COSCIONI, A.C.; PEGORARO, L.M.C.; PIMENTEL, C.L.; FISCHER, V.; SANTOS, J.E.P.; STUMPF JR. W. Diferentes níveis de gordura na dieta de vacas Jersey em lactação influenciam a resposta superovulatória? **Revista Ciência Rural**, v. 35, p.644-649, 2005.
- COSTA, D.P.B.; RODRIGUES, V.C.; SILVA, J.C.G.; ABREU, J.B.R.; MOURÃO, R.C.; LIMA, E.S.; NETO, C.N. Medidas morfofuncionais de bovinos castrados nelore e f1 nelore x sindi com 36 e 48 meses de idade. **Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, v. 27, p. 34-40, 2007.
- COSTA, D.P.B.; RODRIGUES, V.C.; SILVA, J.C.G.; MOURÃO, R.C.; NETO, C.N, COSTA, Q.P.B. Avaliação das vísceras de novilhos nelore e f1 nelore x sindi aos 36 e 48 meses de idade. **Ciência Animal Brasileira** , v. 8, n. 1, p. 17-23, 2007.
- De FEU, M.A.; PATTON, J.; EVANS, A.C.O.; LONERGAN, P.; BUTLER, S.T. The effect of strain of Holstein–Friesian cow on size of ovarian structures, periovulatory circulating steroid concentrations, and embryo quality following superovulation. **Theriogenology**, v. 70, p. 1101–1110, 2008.
- DEMCZUK, E., KOZICKI, L. E., PONTELLI, E. Transferência de embrião em vacas da raça Simental na região noroeste do Paraná e Sul do Mato Grosso do Sul. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.**, vol.35, p. 174-177, 1998.
- DONALDSON, L.E. Dose of FSH-P as a source of variation in embryo production from superovulated cows. **Theriogenology**, v. 22, p. 205-212, 1984.
- EMPRESA ESTADUAL DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DA PARAÍBA S. A. Disponível em: http://www.emepa.org.br/gado_sindi.php. Acessado em agosto de 2009.
- FELIUS, M. **Genus Bos: cattle breeds of the world**. New York, Merk, 1985

- FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.109-126, 2004.
- GIMENES, L.U.; SA´ FILHO, M.F.; MADURE, E.H.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M.; BARUSELLI, P.S. Estudo ultrasonográfico da divergência folicular em novilhas *Bos indicus*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33(Suppl 1), p. 210 (Abstract), 2005.
- GINTHER O.J.; KOT, K.; KULICK, L.J.; WILTBANK, M.C. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**; v.48, p. 75–87, 1997.
- GINTHER, O.J., KNOPF, L., KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**., v.87, p.223-230, 1989.
- GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; DONADEU, F.X.; KOT, K. Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction**, v.65, p.638–647, 2001.
- GINTHER, O.J.; KNOPF, 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**, v. 87, p. 223-230, 1989
- GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**; v. 55, p. 1187–94, 1996.
- GRADELA, A.; ESPER, C.R.; ROSA E SILVA, A.A.M. Plasma concentrations of progesterone, 17- β estradiol and androstenedione and superovulatory response of Nellore cows (*Bos indicus*) treated with FSH. **Theriogenology**, v. 45, p. 843-850, 1996.

- GRIMES, J. F. Utilization of Embryo Transfer in Beef Cattle. **Agriculture and Natural Resources**, Highland County, 2003.
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. São Paulo, Brasil: Manole, 7edição, p. 513, 2004.
- HASLER J. F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle **Animal Reproduction Science**, v.79, p.245-264, 2003.
- HASLER, J. F. Factors affeting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. **Theriogenology**, v. 56, p.1401-1415, 2001.
- HASLER, J.F. Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 2857–2879, 1992.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa da Pecuária Municipal 2006-2007, v. 35, 2007.
- KAFI M, MCGOWAN MR. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 48: p.137-157, 1997.
- KELLY, P., DUFFY, P., ROCHE, J.F., BOLAND, M.P. Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular groth, ovulatory response and endocrine patterns. **Animal Reproduction Science**, v. 46, p. 1-14, 1997.
- LERNER, S. P.; THAYNE, W. V.;BAKER, R. D.; HENSCHEN, T.; MEREDITH, S.; INSKEEP, E. K.; DAILEY, R. A.; LEWIS, P. E.; BUTCHER R. L. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in holstein cows **Journal of Animal Science**, v. 63, p. 176-183,1986.

- MACMILLAN, K.L.; THATCHER, W.W. Effect of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v.45, p.883-9, 1991.
- MAPLETOFT, R.J.; BENNETT-STEWARD, K.; ADAMS, G.P., Recent Advances in the Superovulation of Cattle. **Reproduction. Nutrition and Development**, v. 42, p.601-611, 2002.
- MAPLETOFT, R.J.; BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S. Control of ovarian function for assisted reproductive technologies in cattle. **Animal Reproduction**, v. 1, p. 114-124, 2009.
- MARTÍNEZ, M.F.; ADAMS, G.P.; BERGFELT, D.R.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R.J. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 57, p. 23-33, 1999.
- MARTÍNEZ, M.F.; ADAMS, G.P.; KASTELIC, J.P.; BERGFELT, D.R.; MAPLETOFT, R.J.. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. **Theriogenology**, v. 54, p. 757-768, 2000.
- MARTINS C.M.; CASTRICINI E.S.C.; REIS E.L.; TORRES-JÚNIOR J.R.S., GIMENES L.U.; SÁ FILHO M.F.; GIMENES, L.U.; BARUSELLI, P.S. Produção embrionária de vacas holandesas a diferentes protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 3(Suppl 1), p. 286 (abstract), 2005.
- MARTINS, C.M. Diferentes protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em *Bos taurus* e *Bos indicus*. **Dissertação Mestrado em Medicina Veterinária**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- MEIRELLES, F.V.; ROSA, A.J.M.; LÔBO, B.R. Is the American Zebu really *Bos indicus*? **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, p. 543-47, 1999.

- MOOR, R. M.; KRUIP, T. A.; GREEN, D. Intraovarian control of folliculogenesis: limit to superovulation? **Theriogenology**, v.21, p.103-116, 1984.
- NASSER, L.; ADAMS, G.P.; BÓ, G.A.; MAPLETOFT, R.J. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. **Theriogenology**, v. 40, p. 13-724, 1993.
- NASSER, L.F.T. Resposta superovulatória na primeira onda de crescimento folicular em doadoras Nelore (Bos indicus). **Tese (Doutorado)**, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.
- NELSON, L.D.; NELSON, C.F. Handling and culture of bovine embryos: survey of media used by 26 embryo transfer companies in the USA. **Theriogenology**, v.56, 1377-1382, 2001.
- NOGUEIRA M.; FRAGNITO P.; TRINCA L.;BARROS C.M. The effect of type of vaginal insert and dose of pLH on embryo production, following fixed-time AI in a progestin-based superstimulatory protocol in Nelore cattle. **Theriogenology** ,v. 67, p.655 – 660, 2007.
- NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, B.J.P.; TEIXEIRA, A.B.; TRINCA, L.A.; D'OCCHIO, M.J.; BARROS, C.M. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed-time insemination in superstimulated beef cows. **Theriogenology**, v. 57, p. 1625–34, 2002.
- PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonography of the bovine ovary. **Theriogenology**, v.21, p.495-505, 1984.
- PRADO, F.R.A; TONIOLLO, G.H. Superovulação em vacas da raça gir com diferentes concentrações de FSH/LH em oito subdoses. São Paulo, **Radar técnico em reprodução**, 2006.

- PRADO, F.R.A.; TONIOLLO, G.H.; J. A. OLIVEIRA. Superestimulação ovariana em vacas da raça gir leiteiro com uso de diferentes concentrações de FSH. **Ars Veterinaria**, v. 23, p. 172-177, 2007.
- PURSLEY, J.R.; MEE, M.O.; WILTBANK; M.C.. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂, and GnRH. **Theriogenology**; v. 44, p. 915-923, 1995.
- REICHENBACH, H.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F.; SANTOS FILHO, A.S.; ANDRADE, J.C.O Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: Gonçalves, P.B.D.; Figueiredo, J.R.; Freitas, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**, 1ªed. São Paulo, Ed. Varela, p.153-160, 2002.
- REIS, E. L. Efeito da dose e do momento da administração de gonadotrofina coriônica eqüina no protocolo de sincronização da ovulação para T. E. T. F. **Dissertação (Mestrado)** - FMVZ departamento de Reprodução animal, São Paulo, 2004.
- RODRIGUES, C.A.; MANCILHA, R.F.; REIS, E.L.; AYRES, H.; GIMENES, L.U.; SA´ FILHO, M.F.Efeito do número de implantes de norgestomet e do momento da administração do indutor de ovulação em vacas holandesas superovuladas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33(Suppl 1), p. 229 (abstract), 2005.
- SANTOS, R.M.; VASCONCELOS, J.L.M.. Efeito do intervalo entre recrutamentos foliculares na superovulação de vacas da raça Holandesa não-lactantes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.4, p.844-850, 2007.
- SARTORELLI, E.S.; CARVALHO, L.M.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J.; BARROS, C.M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, p. 2382–94, 2005.
- SARTORI, R.;FRICKE, P.M.; FERREIRA, J.C.P.; GINTHER, O.J.; WILTBANK, M. C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v.65, p.1403-1409, 2001.

- SCHERZER, J., FAYRER-HOSKEN, R.A., RAY, L., HURLEY, D.J. & HEUSNER, G.L. Advancements in large animal embryo transfer and related biotechnologies. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 371-376, 2008.
- SIMPSON, R. B.; CHASE, C. C. JR.; SPICER, L. J.; CARROLL, J. A.; HAMMOND, A. C; WELSH, T. H., JR. Effect of exogenous estradiol on plasma concentrations of Somatotropin, insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding protein activity, and metabolites in ovariectomized Angus and Brahman cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 14, p. 367–380, 1997.
- SINGH, J., M. DOMINGUEZ, R. JAISWAL, G. P. ADAMS. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. **Theriogenology**. V. 62, p. 227–243, 2004.
- SIROIS, J., FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle monitored by real-time ultrasonography. **Biology of Reproduction**, v. 39, 308–317, 1988.
- STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. **Manual of the International Embryo Transfer Society: a procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures**, 3rd ed., Savoy, IL: International Embryo Transfer Society, 1998.
- TALPUR,F.N.; BHANGER, M.I., KHUHAWAR, M.Y. Comparison of fatty acids and cholesterol content in the milk of Pakistani cow breeds. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 698–703, 2006.
- THATCHER, W.W.; GUZELOGLU, A.; MATTOS, R.; BINELLI, M.; HANSEN, T.R.; PRU, J.K. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1435-1450, 2001.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. SAEG – Sistema de análises estatísticas e genéticas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. **Manual do usuário**, p. 150, (versão 9.1), 2007.

VIANA J. H. M.; CAMARGO L. S. A.; A produção de embriões bovinos no Brasil Uma nova realidade, **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. s915-s924, 2007.

VISINTIN, J. A.; ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H.; MIZUTA, K.; CELEGHINI, E. C. C.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A.; GUSMÕES, P. P. G.; CANDINI, P. H. Superovulação de novilhas da raça Nelore com diferentes doses de FSH/LH e congelação de embriões pelo método one-step com etilenoglicol. **Brazilian Journal of Veterinarian Research and Animal Science**, v.36, 1999.

ZANENGA, C.A.; MARQUES, M.O.; SANTOS, I.C.C.; VALENTIN, R; BARUSELLI, P.S. Comparação entre dois protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*). **Acta Scientiae Veterinariae**; v. 31(Suppl 1), p. 626–7, 2003.