

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO**

EDGAR MAURICIO MOGOLLÓN WALTERO

**SUPEROVULAÇÃO DE FÊMEAS BOVINAS UTILIZANDO HORMÔNIO
FOLÍCULO ESTIMULANTE VEICULADO EM UMA MATRIZ POLIMÉRICA
BIODEGRADÁVEL DE LIBERAÇÃO CONTROLADA**

Campos dos Goytacazes - RJ

Dezembro /2009

EDGAR MAURICIO MOGOLLÓN WALTERO

**SUPEROVULAÇÃO DE FÊMEAS BOVINAS UTILIZANDO HORMÔNIO
FOLÍCULO ESTIMULANTE VEICULADO EM UMA MATRIZ POLIMÉRICA
BIODEGRADÁVEL DE LIBERAÇÃO CONTROLADA**

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

Orientador: Professor Doutor Reginaldo da Silva Fontes

Coorientador: Doutor Ricardo Lopes Dias Costa

Campos dos Goytacazes - RJ

Dezembro /2009

EDGAR MAURICIO MOGOLLÓN WALTERO

**SUPEROVULAÇÃO DE FÊMEAS BOVINAS UTILIZANDO HORMÔNIO
FOLÍCULO ESTIMULANTE VEICULADO EM UMA MATRIZ POLIMÉRICA
BIODEGRADÁVEL DE LIBERAÇÃO CONTROLADA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Aprovada em 10 de dezembro de 2009

BANCA EXAMINADORA:

**Pesq. Ricardo Lopes Dias da Costa (Doutor, Produção Animal) – APTA
(Coorientador)**

Prof.^a Célia Raquel Quirino (Doutora, Ciência Animal) – UENF

**Prof. Ângelo José Burla Dias (Doutor, Biociências e Biotecnologia) –
UENF**

**Prof. Reginaldo da Silva Fontes (Doutor, Ciências Veterinárias) – UENF
(Orientador)**

DEDICATÓRIA

A uma terra grande de gente boa e nobre... Brasil.

Aos meus **estudantes** e minhas filhas, **Maria Salome e Juanita Maria**, para quem vou seguir tentando ser exemplo de trabalho e persistência, sem eles, esta viagem perderia o sentido.

Aos meus pais **Olguita e Aquilino**, pelos exemplos de honestidade e perseverança, pelo amor e apoio incondicional aos meus sonhos.

A minha companheira de sonhos **Amanda Lucia**, pela sua confiança em fechar os olhos e pular no vácuo, de mãos dadas comigo.

Aos meus irmãos, **Oscar Alfredo e Luisa Marina**, sempre atentos para estender a mão para mim; a meus sobrinhos; **Sergio, Santiago e Sebastian**, pelo carinho.

AGRADECIMENTOS

A Darcy Ribeiro, porque, sem seus sonhos, os meus não se tornariam realidade.

Aos meus mestres da graduação, especialmente Jaime Fernando Gonzalez, Olimpo Jose Oliver, Martha Olivera, Hector Eduardo Gonzalez e German Amaya Posada. Agora, eu estou tentando passar para outros o exemplo que deles recebi.

Aos meus irmãos - os outros 'filhos' do professor Reginaldo - Hector, Daniel, Thiago, e aos meus 'primos' - os 'filhos' de Ângelo e Maria Clara - Bruno Pena, Fernanda Nazário, Ana Carolina Leal, Hugo Louvain, Fernanda, Aline, Felipe, Danielle e Janaina, pela amizade.

Aos senhores Roberto Vidal, Heuzenil Souza Cordeiro (Nil) e Ricardo Lopes, por estarem sempre presentes no momento adequado e evitarem que meu estudo ficasse truncado.

À minha grande amiga, a senhora Kelen Salaroli Viana, por resolver as minhas dúvidas e acompanhar sempre tudo com aquele grande sorriso.

À Helga Fernandes Gomes e ao pessoal do Laboratório de Química e Função de Peptídeos e Proteínas, por estenderem sempre a mão para me ajudar.

Ao Gilberto Pacheco da Conceição, Márcia Sabino, Thiago Botelho, Lucas Mendonça, Aline e Leonni Zinni, pela ajuda e paciência quando eu ainda não conseguia falar a sua língua.

À grande equipe de trabalho da APTA Regional Andradina: Adilson, senhor Jimenez, senhor Jurado, Aldemir e Pequeno, pela ajuda diária e por receberem um estrangeiro nas suas casas e nas suas vidas, como mais um irmão.

À Cássia e sua família, por alimentarem nossos corpos e manterem nosso espírito animado durante o trabalho em Andradina.

À Maria e Valéria, em Andradina, e à Margarete e Paula, em Campos, por terem mantido meu nível de cafeína adequado para o trabalho.

Aos técnicos do LRMGA, Bruna, Carla, Marcus e João, pela colaboração e as palavras de alento e amizade, além do café quente nas manhãs.

Ao Sergio Gonzalez e Liliana Martinez, por seu incondicional apoio para comigo e minha família.

À Juli Andrea Narvaez, por ter seguido o caminho da pesquisa em reprodução de grandes animais.

Ao professor Reginaldo da Silva Fontes ('Papai'), por correr o risco de redirecionar as minhas aprendizagens pretéritas e demonstrar-me, todos os dias, que pesquisa exige ousadia.

Ao professor Ângelo Jose Burla Dias, pela sempre boa disposição e perseverança na busca de respostas certas para as minhas perguntas e por compartilhar comigo algumas das suas descobertas que, por certo, me possibilitarão ser melhor professor e melhor pessoa.

À professora Maria Clara Caldas Bussiere, pela orientação na busca da informação correta dentre o mar da informação.

À professora Celia Raquel Quirino e seu esposo, o senhor Emidio, pela constante e incalculável ajuda para com a minha família durante o mestrado.

Ao professor Olney Vieira da Motta, por fazer sempre o mais correto.

RESUMO

MOGOLLÓN, Waltero Edgar Mauricio, M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Dezembro de 2009. Superovulação de fêmeas bovinas utilizando hormônio folículo estimulante veiculado em uma matriz polimérica biodegradável de liberação controlada. Professor orientador: Reginaldo da Silva Fontes. Coorientador: Ricardo Lopes Dias da Costa.

O processo convencional de superovulação na espécie bovina precisa de um grande número de aplicações intramusculares do hormônio FSH, procedimento que aumenta o grau de manipulação e estresse dos animais. Sendo assim, objetivou-se, neste trabalho, utilizar uma aplicação única de hormônio FSH com a dose total ou metade, incorporada a uma matriz polimérica biodegradável e biocompatível. Neste trabalho, foram utilizadas 30 novilhas da raça Nelore, separadas aleatoriamente em três grupos: grupo-controle, 100 mg de FSH divididos em três injeções a cada 36 horas; grupo 1, apenas uma injeção de 100 mg de FSH; e o grupo 2, 50 mg de FSH veiculado na matriz polimérica. A resposta superovulatória foi determinada por ultrassonografia, segundo o número e o tamanho dos folículos em crescimento nos dias 0, 4, 6, 8 e 14 do protocolo, o número de corpos lúteos observados dois dias antes da coleta de embriões, a quantidade e o grau de desenvolvimento das estruturas coletadas no dia 7, após a inseminação. Observou-se efeito tanto das doses, do número de aplicações de hormônio FSH, quanto do número de estruturas coletadas ($P > 0,05$), sendo o resultado superior no grupo 1, com média de 4,0 embriões por coleta Vs. 1,7 e 0,5 dos grupos controle e 2 (50 % FSH) respectivamente. Conclui-se que o FSH veiculado em uma matriz polimérica é eficiente em produzir superovulação em novilhas Nelore, com apenas uma aplicação subcutânea.

Palavras chave: FSH, Matriz polimérica, Nelore, Superovulação.

ABSTRAC

MOGOLLÓN, Waltero Edgar Mauricio, M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Dezembro de 2009. Superovulation of bovine heifers using FSH hormone carried into biodegradable and control delivery polimeric matrix. Advisor teacher: Reginaldo da Silva Fontes. Counselor: Ricardo Lopes Dias da Costa.

The conventional process of superovulation in cattle need eight intramuscular injections of FSH hormone which increases handling and stress degree of animals. The aim of this work were to reduce the number of injections for one and the amount of hormone FSH to 50% by incorporating it into a biodegradable and biocompatible polymeric matrix. In this work were used 30 Nelore heifers were randomly divided in three groups. The control group received 100 mg of FSH in three injections each 36 hours, while the other groups received only one injection of 100 or 50 mg of hormone loaded in the polymer matrix. The superovulatory response was determined according to the number and size of growing follicles, in days 0, 4, 6, 8 and 14 of the protocol and the number of corpora lutea (CL) two days before collection, by ultrasound examination furthermore the quantity and development state of the collected structures in the uterine washed. There was effect of the injections number or FSH amount when compared to each treatment with the control group in the number of collected structures, but presented statistical differences between treatments, being superior result by 100% a single dose injection. It is concluded that FSH loaded in polimeric matrix produce efficient super ovulation in Nelore heifers.

Key words: Superovulation, polymeric matrix, Nelore cattle, FSH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do desenvolvimento dos folículos ovarianos.....	15
Figura 2. Dinâmica de desenvolvimento ovariano.....	19
Figura 3. Comparação do diâmetro, em milímetro, dos folículos de novilhas e vacas <i>B. taurus taurus</i> e <i>B. taurus indicus</i>	20
Figura 4. Processo de superovulação com três injeções de FSH a cada 36 horas.....	26
Figura 5. Classificação dos polímeros segundo a ubiquação das unidades monoméricas.....	31
Figura 6. Perfis de liberação de medicamentos em função do tempo.....	33
Figura 7. Amostras tiradas a cada 12 horas.....	39
Figura 8. Espectrofotômetro Shimadzu UV 1240.....	39
Figura 9. Esquema do processo de sincronização e superovulação do grupo-controle e dos grupos 1 e 2.....	40
Figura 10. Evolução no tempo da liberação de FSH.....	43
Figura 11. Número médio de folículos maiores e menores de 6 mm nos três tratamentos superovulatórios no dia 8.....	45
Figura 12. Número médio de folículos maiores e menores de 6 mm nos três tratamentos superovulatórios no dia 14.....	46
Figura 13. Número médio de folículos maiores de 6 mm, de corpos lúteos no dia 14 e embriões na coleta nos três tratamentos superovulatórios.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- FSH – Hormônio folículo estimulante
- LH – Hormônio luteinizante
- PIV – Produção *in vitro*
- TE – Transferência de embriões
- eCG – Gonadotrofina coriônica equina
- PF 127 – Pluronic F 127
- PVA – Álcool polivinílico
- TZP – Processos citoplasmáticos trans-zonais
- KL – Kit-ligante
- IGF 1– Fator de crescimento semelhante à insulina.
- TGF-b – Fatores de crescimento transformantes beta
- IATF – Inseminação artificial em tempo fixo
- GnRH – Hormônio liberador das gonadotrofinas
- CIDR – Dispositivo intravaginal de liberação controlada de progesterona
- CL – Corpo lúteo
- PBS – Solução salina fosfatada e tamponada
- mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
- PGF₂α – Prostaglandina F₂α

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 OOGÊNESE E FOLICULÔGENESE.....	15
3.2 CICLO ESTRAL BOVINO.....	17
3.3 DINÂMICA FOLICULAR.....	18
3.4 SUPEROVULAÇÃO.....	22
3.4.1 Hormônios para superovulação.....	23
3.4.2 Evolução da superovulação.....	24
3.4.3 Manipulação da onda folicular.....	27
3.4.4 Fatores que afetam a resposta superovulatória.....	29
3.5 POLÍMEROS VEICULADORES DE FÁRMACOS.....	30
3.5.1 Polímeros de gelificação termorreversível.....	34
3.5.2 Pluronic F 127.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 LOCAL.....	37
4.2 ANIMAIS.....	37
4.3 PREPARAÇÃO DA MATRIZ POLIMÉRICA.....	37
4.4 TESTE <i>IN VITRO</i>	38
4.5 SINCRONIZAÇÃO E SUPEROVULAÇÃO DAS NOVILHAS.....	39
4.6 COLETA E CONGELAMENTO DOS EMBRIÕES.....	41
4.7 VARIÁVEIS AVALIADAS.....	41
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 TESTE <i>IN VITRO</i>	43
5.2 TESTE <i>IN VIVO</i>	44
6. CONCLUSÕES	50
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO

Na última década, o Brasil tornou-se o maior produtor mundial de embriões bovinos. Atualmente, encontra-se em posição de destaque com quase 50% do total de embriões produzidos mundialmente. A atividade concentrou-se, principalmente, nas raças zebuínas e taurinas de corte, com as transferências realizadas a fresco, preferencialmente. (VARAGO et al., 2008)

Dentre as biotecnologias reprodutivas usadas nos últimos tempos na indústria pecuária, é cada vez mais comum o uso das que precisam da ovulação múltipla ou superovulação. Porém, ainda não é possível diminuir o efeito negativo gerado pelo manejo dos animais por causa da meia-vida curta do hormônio FSH que varia de 5 a 12 horas aproximadamente. (CALLEJAS et al., 2002)

Os protocolos convencionais de superovulação requerem oito aplicações de hormônio FSH, o que causa estresse pela aplicação seriada em um protocolo tradicional, aumentando a mão de obra envolvida no trabalho, o manejo dos animais no curral, quando é necessário injetar o hormônio superestimulatório a cada 12 horas.

Polímeros degradáveis em processos hidrolíticos e/ou enzimáticos a hidroxiácidos não tóxicos são usados comumente na medicina por oferecer vantagens, como a biocompatibilidade, a biodegradabilidade, além de a possibilidade de constituir dispositivos apropriados para a veiculação de medicamentos e diminuir a toxicidade dos medicamentos veiculados. (AMARAL et al., 2007)

Atualmente, a indústria farmacêutica tem conseguido grandes avanços com matrizes poliméricas biocompatíveis, biodegradáveis e termo-sensíveis, capazes de encapsular e fazer liberação controlada de medicamentos.

O custo dos hormônios para sincronização e superovulação é também um dos problemas que enfrenta a TE. Sendo assim, neste trabalho, foram avaliadas não só a diminuição do número de vezes em que os animais entram no curral, mas também a quantidade de hormônio FSH injetada, visto que a matriz polimérica permite a liberação controlada e constante, diferente do

sistema de duas injeções diárias. Por isso, abaixar os custos da superovulação na TE tradicional representa uma interessante alternativa na indústria pecuária.

Neste trabalho, testou-se uma matriz polimérica, constituída por Pluronic F127 e Poli vinil álcool, incorporando, na mesma, o hormônio FSH para conseguir a superovulação com uma só injeção subcutânea em novilhas da raça Nelore, além de testar o uso de uma dose mais baixa de FSH.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL.

Realizar superovulação em fêmeas bovinas, utilizando o hormônio FSH veiculado em uma matriz polimérica biodegradável de liberação controlada.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Avaliar o efeito de uma só injeção de hormônio folículo estimulante (FSH), veiculada numa matriz polimérica biodegradável de liberação controlada, na estimulação ovariana, mediante a contagem das estruturas ovarianas (folículos ou corpos lúteos) por ultrassonografia.

Avaliar o efeito da redução da dose hormonal na superovulação.

Avaliar quantidade e a qualidade dos embriões obtidos mediante estes protocolos de superovulação.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE.

A oogênese pode ser definida como o desenvolvimento e diferenciação das células germinativas primordiais da fêmea, culminado com a formação do ovócito haploide apto para a fecundação. O processo inicia-se na vida fetal da fêmea bovina (120-140 dias de gestação) e finaliza com a formação dos folículos primordiais. (WANDJI et al., 1992; FERNANDES et al., 2009)

Os ovários dos mamíferos contêm milhares de ovócitos inclusos em folículos ovarianos (antrais e pré-antrais). Os folículos pré-antrais representam cerca de 90% da população folicular e são responsáveis pela constante renovação de folículos antrais no ovário. No entanto, cerca de 99,9% dos folículos de um ovário não ovulam, param de desenvolver por um processo fisiológico conhecido como atresia. (Saumande, 1991, citado por ANDRADE et al., 2005)

Por outro lado, a foliculogênese corresponde ao processo de formação, crescimento (por aumento do diâmetro ovocitário, multiplicação das células da granulosa e desenvolvimento do antro) e maturação folicular (Figura 1). Esse processo tem início com a formação do folículo primordial e culmina com o estágio conhecido como folículo de *De Graaf* ou pré-ovulatório. (Saumande, 1991, citado por ANDRADE et al., 2005; FERNANDES et al., 2009)

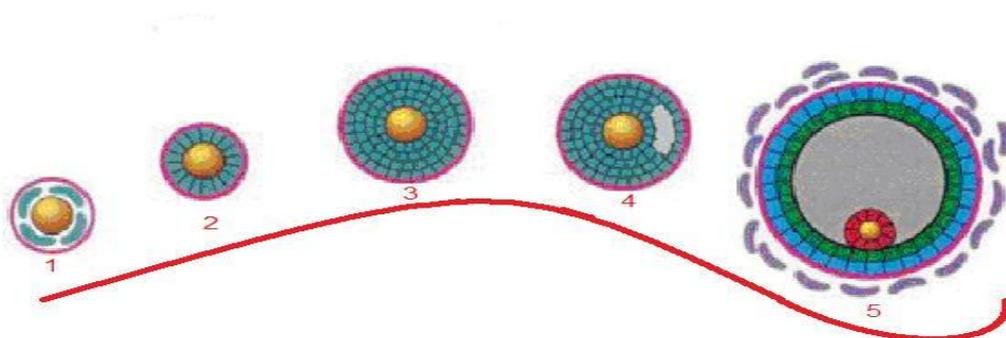


Figura 1: Representação esquemática do desenvolvimento dos folículos ovarianos. 1- Folículo Primordial; 2 - Folículo Primário; 3 - Folículo Secundário; 4 - Folículo Terciário com antro pequeno; 5 - Folículo Pré-ovulatório (adaptado de ANDRADE et al., 2005).

O folículo é a unidade morfofuncional do ovário mamífero e apresenta uma dupla função: proporcionar um ambiente ideal para o crescimento e a maturação do oócito e produzir substâncias, principalmente esteróides, além de diferentes peptídeos. (FORTUNE et al., 2000)

O oócito desempenha um papel muito ativo na promoção e crescimento do folículo, e orienta a diferenciação de células da granulosa. O oócito faz isso, em parte, pela secreção de fatores de crescimento parácrinos solúveis que atuam sobre suas vizinhas células da granulosa que, por sua vez, regulam o desenvolvimento oocitário. (GILCHRIST et al., 2004)

O oócito não é um mero expectador ou receptor de ações parácrinas oriundas das células vizinhas, na fase pré-antral. Ele participa ativamente na indução da proliferação e da diferenciação das células da granulosa. (GILCHRIST et al., 2004)

A comunicação entre o oócito e as células da granulosa é proporcionada por processos citoplasmáticos trans-zonais (TZP) e pela secreção de mediadores parácrinos. As TZPs são extensões das células da granulosa que penetram por meio da zona pelúcida e atingem a membrana do ovócito, onde junções do tipo *gap* (*gap junction*) permitem transporte bidirecional de moléculas reguladoras. (ALBERTINI et al., 2001)

Já a comunicação parácrina entre o ovócito e as células da granulosa, embora também bidirecional, é mediada por vários fatores de crescimento produzidos por ambos os tipos celulares, dentre os quais, destacam-se o fator de células-tronco (SCF; também conhecido como kit-ligante: KL) e os membros da família dos Fatores de Crescimento e Transformação- β (TGF- β), particularmente o Fator de Crescimento e Diferenciação-9 (GDF-9) e a Proteína Morfogenética Óssea-15 (BMP-15, também conhecida como GDF-9B) (BURATINI, 2007)

Há muitos hormônios que regulam o desenvolvimento folicular, mas os chamados gonadotrofinas, FSH e LH, são os mais importantes. Eles são glicoproteínas produzidos no lóbulo anterior da pituitária, e sua função principal é a estimulação das gônadas. A função primária do FSH nas fêmeas é a estimulação do crescimento dos folículos antrais, e a do LH é causar ovulação e formação dos corpos lúteos. (SENGER, 2003)

3.2 CICLO ESTRAL BOVINO.

O ciclo estral nos bovinos tem variação de 17 até 25 dias, apresentando grandes semelhanças entre as fêmeas zebuínas e as taurinas. (FORTUNE, 1993; BARROS et al., 1995)

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

Durante o ciclo estral, podem-se diferenciar as etapas de crescimento dos folículos ovarianos que, nas fêmeas bovinas, podem ser divididas em três fases:

- Recrutamento - Quando vários folículos primários passam a se desenvolver concomitantemente. Esta fase é dependente do FSH.

- Seleção e dominância - Na qual, um folículo cresce mais que os outros, tornando-se dominante e inibindo o crescimento dos demais (subordinados). Esta fase é dependente do LH.

- Ovulação e atresia - O folículo dominante ovula após um pico de liberação de LH. No entanto, se houver um corpo lúteo ativo, os níveis de progesterona estarão altos (fase luteal), inibindo a liberação de LH (*feed back* negativo), e então o dominante entra em atresia, e uma nova onda de crescimento folicular se inicia. A última onda folicular de cada ciclo culmina com a regressão do corpo lúteo, induzida pela prostaglandina $F2\alpha$, liberada no útero. Com a diminuição dos níveis de progesterona, cessa a inibição sobre a hipófise para a produção de LH que é liberado, induzindo o crescimento final do folículo, a ovulação e a posterior luteinização, formando um novo corpo lúteo. (BARUSELLI et al., 2008)

3.3 DINÂMICA FOLICULAR.

No final da década de 80, trabalhos utilizando a ultrassonografia em tempo real documentaram que o crescimento folicular nos bovinos acontece em ondas (BO, 2002; ERENO, 2002), que podem ocorrer desde antes da puberdade, e cujo número pode variar de duas até quatro em cada ciclo. (HOPPER et al., 1993; GINTHER et al., 1989)

Duas hipóteses foram propostas inicialmente para explicar a dinâmica folicular durante o ciclo estral dos bovinos: 1 - o desenvolvimento folicular em duas ondas; 2 - o desenvolvimento folicular é contínuo.

A primeira hipótese foi descrita por Rajakoski (1960), que realizou estudos histológicos dos ovários provenientes dos matadouros. Este propôs um modelo no qual o crescimento folicular acontece em duas ondas, durante o ciclo estral: sendo que a primeira onda inicia-se logo após a manifestação do cio e a segunda, entre os dias 12 e 14, que, de acordo com Pierson e Ginther (1988), cada uma delas apresenta um folículo que cresce até o diâmetro pré-ovulatório.

A segunda hipótese propôs que o crescimento folicular apresenta-se contínuo e independente da etapa do ciclo. (SIROIS e FORTUNE, 1988).

A primeira hipótese foi avaliada posteriormente em 1981, comprovando, histologicamente, a teoria das duas ondas. (GINTHER et al., 1996; ADAMS et al., 2008)

Na segunda metade da década de 80, entretanto, o desenvolvimento da ultrassonografia transretal permitiu fazer o acompanhamento contínuo dos eventos ovarianos durante a totalidade do ciclo estral, conseguindo a solução das controvérsias nas duas hipóteses (Figura. 2).

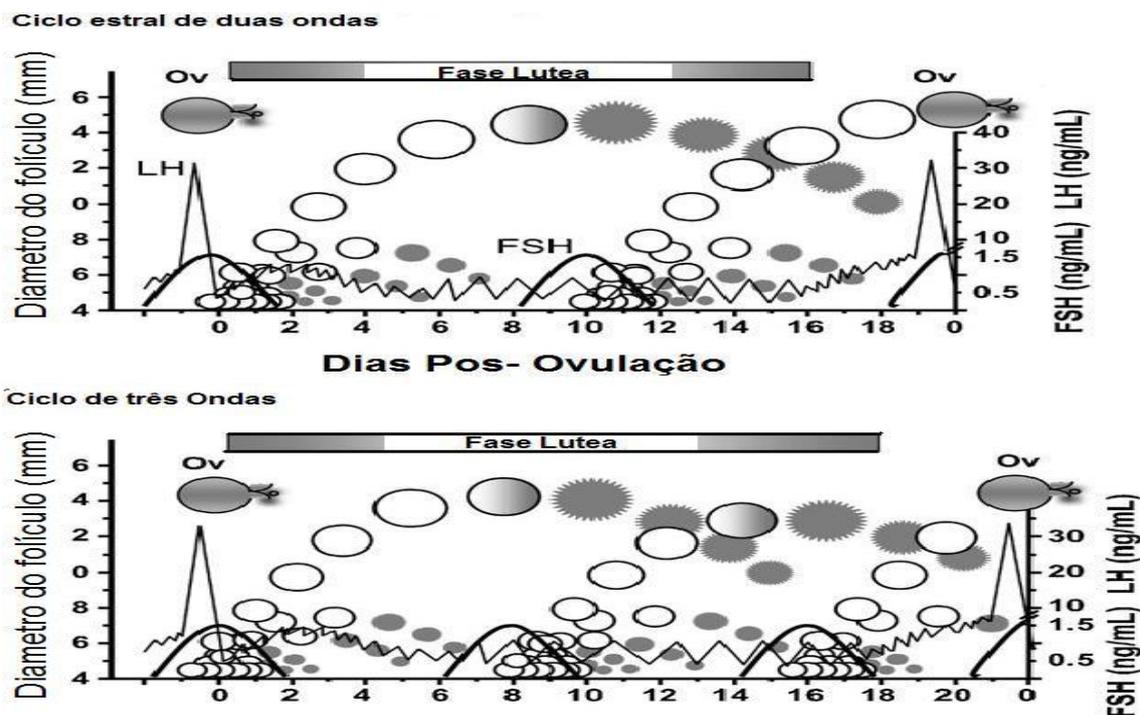


Figura 2: Dinâmica de desenvolvimento folicular ovariano e secreção de gonadotrofinas nos ciclos estrais de duas e três ondas em vacas (Adaptado de Adams et al., 2008).

E, assim, chegou-se à conclusão de que o crescimento folicular pode apresentar duas, três e até quatro ondas foliculares dentro de um só ciclo estral. O número de ondas foliculares é influenciado por muitos fatores, como nutrição, parição e status de lactação. (GINTHER et al., 1996)

Diferentes hormônios regulam o desenvolvimento dos folículos, mas os hormônios gonadotrópicos, FSH e LH são considerados os mais importantes. A função principal do FSH nas fêmeas é a estimulação do crescimento dos folículos antrais, enquanto o LH induz a ovulação e a formação do CL. (SENGER, 2003)

Nas primeiras etapas de desenvolvimento dos folículos (3-5 mm), estes respondem às gonadotrofinas. Tal etapa é denominada de recrutamento. Ela está associada à elevação das concentrações plasmáticas do hormônio FSH. A concentração de FSH atinge o seu pico máximo quando o maior folículo, o dominante, atinge o tamanho de 4-5 mm. A partir desse momento, o folículo dominante cresce por seis dias de forma linear, conseguindo aumentar as concentrações periféricas de estrógenos e andrógenos. (ADAMS et al., 1992; GINTHER et al., 1989; SUDERLAND et al., 1994)

O FSH está relacionado à emergência da onda de crescimento folicular, momento no qual atinge concentrações máximas, quando os folículos recrutados apresentam diâmetro médio de 4 mm. Deste momento em diante, as concentrações decrescem até alcançarem o nadir próximo ao desvio, com relatos variando desde 32 horas antes até 10 horas após a seleção folicular. (KULICK, 1999; GINTHER, 2000)

Em bovinos da raça Holandesa, a divergência folicular é marcada pela diferença nas taxas de crescimento dos dois maiores folículos. Esta divergência está associada a eventos endócrinos e celulares, como o decréscimo dos níveis de FSH, aumento das concentrações circulantes de 17β -estradiol, aumento de IGF-I e aumento na expressão de receptores para LH. (GINTHER, 2001 e SARTORI et al., 2001)

Perto do terceiro dia, com 8,5 mm de diâmetro, nas fêmeas *Bos taurus taurus* e 7,2 mm nas fêmeas *Bos taurus indicus*, o folículo dominante adquire receptores para o LH, nas células da granulosa, considerado o momento do desvio, a partir do qual passa a exercer a dominância (Figura 3). Mesmo com níveis basais de FSH, o folículo dominante atinge o seu platô após o desvio, graças ao efeito positivo do LH, cujo crescimento é limitado pela progesterona (P4) secretada pelo corpo lúteo (CL), que promove a diminuição da frequência e aumenta a amplitude dos pulsos de LH. (GARVERICK et al., 1992; RAJAMAHENDRAN et al., 1994; BERGFELT et al., 1995)

Subespécie	<i>B. taurus taurus</i>		<i>B. taurus indicus</i>	
	Novilha	Vaca	Novilha	Vaca
Fase da Dinâmica folicular				
Emergência	3,6 (mm)	4,2 (mm)	3,0 (mm)	3,5 (mm)
Desvio	8,5 (mm)	7,2 (mm)	6,2 (mm)	5,9 (mm)
Ovulação	16,5 (mm)	17,1 (mm)	11,3 (mm)	12,1 (mm)

Figura 3: Comparação do diâmetro, em milímetro, dos folículos de novilhas e vacas *B. taurus taurus* e *B. taurus indicus*. Kulick, 1999; Ginther, 2003; Gimenez, 2006

Após a mudança na dependência gonadotrófica, o LH passa a assumir papel fundamental na fase final de crescimento e maturação folicular. Embora uma elevação transitória, nas concentrações deste hormônio, tenha início 32 horas antes até um período de 48 horas, após a divergência folicular, seu envolvimento no processo de seleção ainda não está claramente definido. Sabe-se, entretanto, que o LH estimula a produção intrafolicular de esteroides e de sistemas de fatores de crescimento envolvidos nos mecanismos de desvio. (DRIANTCOURT, 2001; GINTHER, 1998)

A queda nos níveis de FSH ocorre devido à retroalimentação negativa sobre a hipófise, causada pela ação combinada da inibina e do estradiol, produzidos por folículos maiores que 5 mm, em fêmeas Holandesas. Porém, esta ação conjunta dos folículos ocorre somente até a fase de crescimento comum. Após a divergência folicular, apenas o folículo dominante é o responsável pela inibição desta gonadotrofina. (GINTHER, 2003; GIBBONS et al., 1997; FORTUNE et al., 2004)

Ao atingir o platô, o folículo dominante entra na fase denominada estática, na qual exerce sua dominância sobre os folículos subordinados por mais seis dias, causando a atresia destes. Depois e já sem a secreção contínua dos andrógenos produzidos pelo folículo dominante, ocorre um novo pico de FSH, responsável pelo início da nova onda de crescimento folicular. (ADAMS et al., 1992)

No mecanismo de dominância, é muito importante o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1). Este fator está envolvido na estimulação da célula da granulosa, na proliferação da teca e na esteroidogênese, as quais são responsáveis pela biodisponibilidade de receptores para FSH. Essa biodisponibilidade de receptores já está presente em maior quantidade no folículo dominante tão logo este é identificado morfológicamente como dominante, o que demonstra a sua atuação de dominância concomitante à emergência da onda folicular. (FORTUNE et al., 2004)

O crescimento do folículo dominante promove o aumento das concentrações de estrógenos, que desencadeiam o mecanismo de retroalimentação positiva para a liberação do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) e o conseqüente pico de LH, promovendo a ovulação. (FORTUNE, 1993)

Embora existam inúmeros trabalhos acerca das interrelações entre as gonadotrofinas e o desenvolvimento folicular no momento ou nas proximidades da divergência folicular, desenvolvidos na raça holandesa, há escassez de estudos em zebuínos e, principalmente, na raça Nelore ou em seus cruzamentos. Na literatura vigente, constam apenas duas recentes investigações sobre a divergência folicular na raça Nelore, sendo que, em apenas uma delas, foi descrito o perfil de FSH ao longo da primeira onda folicular. (GIMENES et al., 2007)

3.4 SUPEROVULAÇÃO.

Denomina-se superovulação o aumento do número fisiológico de ovulações próprias da espécie, provocada pela administração de gonadotrofinas. No bovino, considera-se uma resposta ao tratamento, quando se produzem mais de duas ovulações. A superovulação deve complementar-se com um regime ótimo de inseminação artificial, utilizando sêmen de boa qualidade. O fato de a espécie bovina ser monovular impossibilita a obtenção de vários descendentes de maneira natural, em curto tempo a partir de uma fêmea geneticamente superior. (CABODEVILA e TORQUATI, 2001)

A aplicação de biotecnologias embrionárias requer, em primeira instância, o processo denominado superovulação (SO) ou ovulação múltipla (MO), que se consegue mediante o uso de hormônios exógenos. Essa biotecnologia permite a produção de vários embriões no mesmo ciclo estral, diferindo da produção unitária que, normalmente, alcança uma fêmea bovina em cada ciclo estral. (ERENO, 2002)

Uma boa resposta ao tratamento superovulatório é a condição fundamental para que um programa de transferência de embriões tenha êxito e para o desenvolvimento científico de biotecnologias mais avançadas que dependam da disposição de embriões e ovócitos, como material de investigação (micromanipulação e sexagem de embriões, clonagem e transgênese). (ELIGIO, 1998)

A grande variabilidade na resposta aos tratamentos hormonais pode ser influenciada por fatores relacionados aos tratamentos ou, na maioria das vezes, por fatores individuais associados às características da dinâmica folicular. (MACHADO, 2002)

3.4.1 Hormônios para superovulação

Os principais hormônios utilizados para superovular fêmeas são a gonadotrofina coriônica equina (eCG) e o extrato de pituitária suína contendo maior percentual de hormônio folículo estimulante (FSH-p). (MACHADO, 2002)

Dentre as gonadotrofinas utilizadas para promover a superovulação nas doadoras, destacam-se a gonadotrofina coriônica equina (eCG ou PMSG), administrada isoladamente ou associada ao soro anti-PMSG, e o hormônio folículo estimulante (FSH), oriundo do extrato de pituitária de suínos, ovinos e equinos, ou ainda o FSH recombinante bovino e a somatotropina bovina (bST). (MARQUES et al., 2008)

A eCG permite conseguir uma resposta superovulatória com apenas uma dose, entre os dias 8 e 12 do ciclo estral, mas, por ter meia-vida longa no sangue (mais de 10 dias), resulta em prolongada estimulação do crescimento folicular, provocando um crescimento disperso com altos níveis de estrógenos que afetam tanto as taxas de fertilização quanto a qualidade embrionária. Além disso, este hormônio também induz resposta imunológica, levando à produção de anticorpos anti-eCG, tornando-se necessário o aumento da dose em aplicações subsequentes para se obter o mesmo efeito nos tratamentos posteriores. (TAKEDOMI et al., 1994; KIMURA et al., 2007)

O hormônio mais usado em programas de transferência de embriões (TE) é o FSH-p, cujo tratamento é realizado com a aplicação de duas doses diárias, durante quatro dias, começando a superestimulação entre os dias 8 e 12 do ciclo estral. Outros hormônios que podem causar superovulação, ainda que pouco utilizados, são o EPE (Extrato de pituitária equina), FSH-O (extratos de pituitária ovina), HMG (gonadotrofina isolada de mulheres em menopausa). (TAKEDOMI et al., 1994)

Devido à meia-vida curta do FSH (aproximadamente cinco a 12 horas), é preciso realizar múltiplas aplicações intramusculares para conseguir o efeito

de superovulação nas fêmeas bovinas. (DEMOSTIER et al., 1988; MACHADO et al., 2002)

Os protocolos mais comuns de superovulação requerem de seis a oito aplicações de FSH com intervalos de 12 horas, a fim de que vários folículos se desenvolvam, e possa ocorrer uma ovulação múltipla. Este processo permite uma maior obtenção de embriões na coleta. (FONSECA et al., 2001)

3.4.2 Evolução da superovulação

Apesar do fato de a eCG apresentar um menor custo no mercado, seu uso não é muito difundido hoje, visto que sua ação prolongada (de 40 até 123 horas) pode induzir o crescimento folicular na primeira onda após ovulação, causando incremento nas concentrações de estradiol no sangue, o que, por sua vez, tem efeito deletério nas etapas iniciais do desenvolvimento embrionário. Além disso, a eCG também pode provocar um crescimento folicular contínuo, levando a aumento de tamanho dos ovários e à formação de cistos foliculares. (GOULDING, 1995)

A injeção de FSH duas vezes ao dia, em doses decrescentes, promove uma melhor resposta superovulatória em gado bovino que a eCG. Porém, as múltiplas injeções não levam só a inconvenientes técnicos para o veterinário, mas também causam excessivo estresse nas fêmeas. (TAKEDOMI et al., 1994)

A utilização do FSH, como agente indutor de superovulação, tem sido extensivamente estudada. Foi testado o uso de diferentes concentrações (GONZALEZ et al., 1990; SAUNDERS et al., 1990), vias de administração (HOCKLEY et al., 1992; TRIBULO et al., 1993), eficiência de produtos comerciais das mais variadas marcas e procedências (TRIBULO et al., 1993; DONALDSON, 1995) e variações na relação FSH/LH entre os preparados comerciais. (DONALDSON, 1990; BRAILEANU et al., 1998)

Foi demonstrado que concentrações elevadas de LH numa preparação de FSH têm efeitos negativos na produção e na qualidade de embriões bovinos. O nível máximo de contaminação com LH deve ser de 15 a 20%. (DONALDSON, 1986 citado por BARROS et al., 2004)

Os resultados inconstantes têm sido associados com as ovulações prematuras, durante o tratamento com o FSH, com a conseqüente formação

precoce de corpo lúteo, que secreta níveis subluteais de progesterona no período esperado do estro e, por fim, com a inibição do pico pré-ovulatório de LH e, conseqüentemente, de ovulações. (STOCK et al., 1996)

Pesquisadores holandeses realizaram experimentos que permitiram, posteriormente, o desenvolvimento de protocolos de superovulação para realizar inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Este protocolo foi chamado de P-36, por manter a fonte de progesterona por até 36 horas após a aplicação de PGF2 α , e a ovulação ser induzida com LH exógeno, administrado 12 horas após a remoção da fonte de P4 (ou seja, 48 horas após a aplicação de PGF2 α), evitando a inconveniência da detecção do estro. Este protocolo tem demonstrado ser eficaz na raça Nelore. (VOS et al., 1995; VAN DE LEEMPUT et al., 2001; BARROS et al., 2007)

Em fêmeas da raça Nelore, tem sido utilizada uma variação do protocolo P-36, segundo o qual, o dispositivo intravaginal é retirado 24 horas após a prostaglandina F2 α , que passou, assim, a ser chamado de P-24. Esta variação pode ter resultados comparáveis com os de P-36, porque a capacidade ovulatória em *Bos taurus indicus* é adquirida com diâmetros inferiores aos observados em *Bos taurus taurus*. (BARUSELLI et al., 2007)

Surpreendentemente, a utilização do protocolo P-36 em raças europeias diminuiu o número de embriões viáveis, quando comparado a protocolos convencionais com observação do estro. Esta observação motivou pequenos ajustes no protocolo P-36. Na raça Holandesa e Angus, o protocolo P-36 se mostrou mais eficaz quando o agente indutor da ovulação (LH ou GnRH) foi aplicado 60 horas (P36/LH60), ao invés de 48 horas (P36/LH48), após a administração de PGF2 α . (CHESTA et al., 2007; BARUSELLI et al., 2006)

Numa pesquisa realizada na Universidade de Brisbane – Austrália, comprovou-se que uma única aplicação de FSH, em fêmeas Brahman, por via intramuscular, estimula o crescimento folicular por dois dias. Esse trabalho sugeriu uma revisão de conceitos pré-estabelecidos sobre o real tempo de ação do FSH em folículos em desenvolvimento. (D'OCCHIO, citado por www.tecnopec.com.br 2008; BARUSELLI et al., 2008)

A grande vantagem dessa descoberta foi diminuir o número de aplicações de FSH, que, tradicionalmente, eram realizadas em oito aplicações,

de 12 em 12 horas, passando para três aplicações em momentos estratégicos do protocolo, a cada 36 horas (figura 4). (www.tecnopec.com.br 2008)

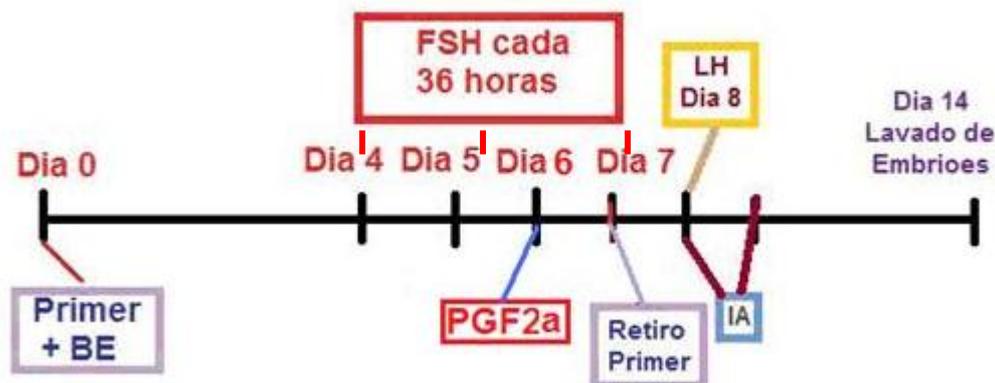


Figura 4: Processo de superovulação com três injeções de FSH a cada 36 horas.

Alguns trabalhos fazem referência à aplicação única, subcutânea, do hormônio FSH, diluído em salina 0,9% NaCl, existindo, entretanto, diferentes opiniões. Bo et al. (1994) e Lovie et al. (1994) observaram que a aplicação única apresenta resultados similares aos da aplicação múltipla (oito injeções). No entanto, Takedomi et al (1995) não obtiveram resposta ao realizar esse protocolo.

Pesquisadores japoneses relataram que uma única aplicação de pFSH dissolvida em salina 0,9% NaCl causa, primeiramente, um drástico incremento e, logo a seguir, uma súbita diminuição na concentração plasmática desse hormônio, o que expõe os ovários a uma alta concentração de pFSH, maior do que o normal, causando falha no desenvolvimento folicular e na ovulação. (TAKEDOMI et al., 1995)

Outros estudos têm mostrado que a injeção subcutânea de FSH resulta em múltiplas ovulações, ainda que o número de ovulações seja menor que com as injeções intramusculares múltiplas. (BO et al., 1994; LOVIE et al., 1994)

A injeção única de FSH, aplicada por via subcutânea, é suficiente para induzir uma superovulação em bovinos. No entanto, esta injeção aumenta as concentrações plasmáticas de FSH durante um curto período, de forma que uma parte dos folículos estimulados pode parar seu crescimento na ausência

de níveis adequados de FSH na etapa final da maturação. (MARTINEZ et al., 2008)

O efeito de diferentes métodos de administração do hormônio FSH tem sido examinado e os resultados sugerem que a injeção única, pela via subcutânea, pode ser tão efetiva quanto as múltiplas injeções intramusculares. Porém, ainda que a injeção única também cause superovulação nas fêmeas bovinas, a administração de múltiplas injeções do hormônio FSH produz uma maior quantidade de embriões congeláveis e transferíveis quando comparada com a da primeira. (KELLY et al., 1997)

3.4.3 Manipulação da onda folicular

Existem duas formas básicas de controlar a emergência de uma nova onda folicular para superovulação em fêmeas bovinas: a ablação mecânica do folículo dominante, mediante o uso do equipamento de aspiração folicular guiado por ultrassom, e a ablação farmacológica, com diferentes combinações de produtos hormonais. (BURATINI et al., 2000)

A ablação do folículo dominante, para a sincronização da emergência de uma onda de crescimento folicular, pode ser conseguida usando um equipamento de aspiração folicular guiado por ultrassom. Pode realizar-se a aspiração de todos os folículos maiores que 5 mm de diâmetro ou a ablação do folículo dominante da primeira onda de crescimento folicular, produzindo queda prematura dos estrogênios e, indiretamente, do FSH, sincronizando a emergência de uma nova onda de crescimento. Para melhorar o desenvolvimento folicular, este tratamento pode ser acompanhado por injeções de somatotropina bovina. (BURATINI et al., 2000)

O tratamento hormonal mais comum é aquele que se usa o estradiol 17 β (E-17 β) ou o benzoato de estradiol (BE) combinado com progesterona (P4), injetados no mesmo momento da inserção de um dispositivo intravaginal de liberação de P4. GnRH e pLH também têm sido utilizados para induzir ovulação do folículo dominante e sincronizar a emergência da nova onda, embora sua eficiência dependa do estágio do folículo dominante no momento do tratamento, podendo a emergência da onda folicular resultante ser variável para a superestimulação. (BO et al., 2007; BO et al., 2008 a)

Uma dificuldade apresentada, atualmente, é a proibição do uso de estradiol em alguns países. Uma abordagem alternativa poderia ser a de aumentar a resposta ovulatória do folículo dominante ao tratamento com GnRH e iniciar os tratamentos com FSH no momento da emergência da nova onda folicular. (BO et al., 2008 b)

Durante a superovulação, a fim de evitar a presença de um folículo dominante, que poderia causar atresia dos folículos subordinados, o tratamento com FSH deve começar justamente no início da nova onda folicular, ou seja, quatro dias após a colocação do dispositivo intravaginal e a administração do estrógeno. Dois dias após a primeira aplicação de FSH, é administrada uma dose luteolítica de PGF₂ α e, 12 horas mais tarde, o dispositivo intravaginal é removido. As doadoras são inseminadas artificialmente 12 e 24 horas após a detecção do cio. (BO, 2002)

Seis a sete dias mais tarde, os embriões são colhidos, classificados e congelados ou inovulados. Este protocolo apresenta duas vantagens: pode ser iniciado em qualquer dia do ciclo estral e dispensa a observação do cio base. Porém, ainda requer a detecção do estro para a inseminação artificial das doadoras. (BARROS, 2007)

Alguns pesquisadores testaram a eficácia de protocolos, nos quais o momento esperado da ovulação era atrasado por 6 a 12 horas, mantendo a liberação de P4 (CIDR ou DIB), e a ovulação era induzida pela administração de LH ou GnRH. (BARROS e NOGUEIRA, 2001; NOGUEIRA, 2002 citados por BARROS, 2007)

Tais protocolos não aumentaram significativamente o número de embriões viáveis, quando comparados ao dos protocolos com detecção do estro. Entretanto, com estes tratamentos hormonais, foi possível controlar o momento da ovulação, permitindo a utilização da IATF. Assim, só a partir destes experimentos, é que foi possível o desenvolvimento do novo protocolo, o P-36, aquele que consiste em manter a fonte de progesterona até 36 horas depois da aplicação do agente lúteolítico. (BARROS e NOGUEIRA, 2005)

3.4.4 Fatores que afetam a resposta superovulatória

Dentre os fatores que afetam a resposta tanto na superovulação quanto na produção de embriões, há alguns considerados fisiológicos, como a raça, idade, estado nutricional, sanidade, estado reprodutivo, etc. Igualmente, devem-se considerar aqueles fatores relacionados com o tratamento de superovulação, como o tipo e dose de hormônio, superovulações repetidas e suas respostas. (SILVA, et al., 2002)

Os programas tradicionais de superovulação ainda apresentam algumas limitações, como: 1) manejo para detecção de cio; 2) necessidade de iniciar o tratamento superestimulatório em momento específico do ciclo estral; 3) necessidade de detecção do cio para inseminação das fêmeas superestimuladas; 4) baixa repetibilidade na produção de embriões viáveis por doadora; 5) cerca de 20 a 30% das doadoras não respondem ao tratamento. (BARUSELLI et al., 2008)

Por outro lado, a variabilidade na resposta das doadoras de embriões, a tratamentos superestimulatórios com gonadotrofinas, continua sendo um dos maiores problemas nos programas comerciais de transferência de embriões. (ARMSTRONG, 1993; BOLAND e ROCHE, 1993; BARROS e NOGUEIRA, 2001; BARUSELLI, 2006 citados por BARROS, 2007)

O estresse é responsável por diversas alterações fisiológicas nos animais, incluindo a subfertilidade. A interferência do estresse no rendimento reprodutivo dos bovinos mostra maior importância quando se emprega manejo intensivo. Além disso, tanto o cortisol (principal hormônio indicador de estresse), quanto a progesterona são liberados pela glândula adrenal em condições de estresse. Nos bovinos, considera-se, como valor basal de cortisol, 10 ng/ ml, e tem sido demonstrado que os manejos no curral elevam os níveis plasmáticos desse hormônio para acima desse valor. (MAZIERO et al., 2007)

Estados repetidos de estresse agudo podem afetar o pico pré-ovulatório de LH no gado, e injeções de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) exógeno diminuem significativamente a frequência de pulsos do LH. (STOEBEL e MOBERG, 1982; RIBADU et al., 2000)

Adicionalmente ao estresse por manejo, nas regiões tropicais, deve ser levado em consideração o estresse produzido pelas altas temperaturas, que, em alguns casos, é capaz de produzir largos períodos de aciclicidade (níveis de progesterona < 1 ng/ ml), ou a ocorrência de ciclos irregulares e, sobretudo, ciclos de curta duração. Sendo assim, conclui-se que o estresse calórico afeta negativamente a dinâmica ovariana. (TORRES et al., 2007)

Alguns trabalhos têm reportado que o estresse do transporte causa diminuição do número de corpos lúteos nas novilhas superovuladas com incremento nas concentrações plasmáticas de cortisol. (MONNLAUX et al., 1983)

Os processos de superovulação têm então a possibilidade de diminuir o estresse provocado pelas múltiplas injeções diárias, utilizando um hormônio como a eCG, com resultados pouco consistentes, ou usar um hormônio que apresenta melhores resultados, o que requer múltiplas aplicações, acarretando problemas de estresse (FSH). Sendo assim, a situação ideal seria utilizar FSH numa dose única, que permita garantir sua lenta liberação durante o tempo apropriado para a estimulação do crescimento folicular múltiplo.

3.5 POLÍMEROS VEICULADORES DE FÁRMACOS.

Existe grande interesse na busca de materiais cada vez menos agressivos ao meio ambiente, particularmente na indústria farmacêutica. Têm sido desenvolvidos polímeros chamados inteligentes devido a sua habilidade de controlar a liberação dos medicamentos injetados no corpo, tanto humano quanto animal. (CASTRO, 2006)

Os polímeros têm demonstrado potencial em aplicações biomédicas, como a reparação de tecidos; matrizes de PEG-PLGA polietileno glicol-poliácido láctico-co-ácido glicólico têm sido usadas para promover a cura da diabetes, como liberadoras de genes de transformação do fator $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). Este é um importante fator de crescimento relacionado com a reparação do tecido e, hoje, tem sido usado experimentalmente na reparação de defeitos de tecido cartilaginoso em junção com condrócitos. (YU e DING, 2008)

Os polímeros podem ser classificados, segundo sua origem, em: homopolímeros compostos de um só tipo de monômero e heteropolímeros ou copolímeros constituídos por monômeros diferentes, caso da união entre PEO (polietileno óxido) e PPO (polipropileno óxido). Também podem ser classificados, segundo o padrão de repetição dos monômeros nas cadeias dos copolímeros, como copolímeros alternantes, em bloco, aleatórios e copolímeros de inserto (figura 5). (IUPAC, 2002)

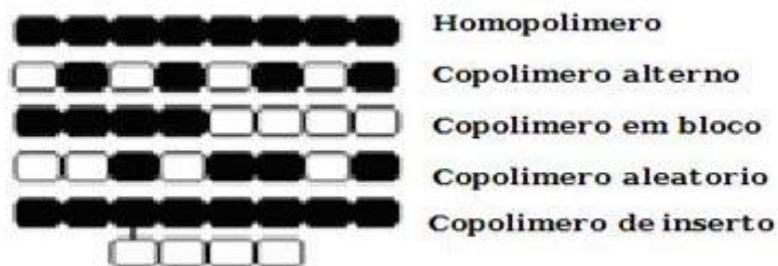


Figura 5: Classificação dos polímeros segundo a ligação das unidades monoméricas

Outras classificações dos polímeros podem ser feitas baseadas em seu mecanismo de polimerização, sua composição química, suas aplicações e seu comportamento sob elevação de temperatura. (IUPAC, 2002)

Os materiais introduzidos nos tecidos corporais com propósitos terapêuticos específicos, de diagnóstico ou propósitos preventivos são chamados de biomateriais. Estes devem ser biocompatíveis, ou seja, não devem causar resposta fisiológica que possa deteriorá-los no meio onde são introduzidos; e, após sua interação com os tecidos e fluidos corporais, devem biodegradar-se em componentes não tóxicos tanto química quanto fisicamente, ou pela combinação físico-química. Existem outros termos para falar da biodegradação, que são bioerosão e bioabsorção. (SÁEZ, 2004)

Há quase três décadas, vem sendo utilizado um material polimérico para fios de sutura, baseado em derivados do poliácido láctico, tanto por sua biocompatibilidade como pelas propriedades não imunogênicas e não tóxicas deste material nos tecidos. Ele se decompõe simplesmente em ácido láctico, presente em todos os animais e micro-organismos. (CASTRO, 2006)

Se a matriz polimérica não for degradada dentro do corpo, ela deve ser cirurgicamente removida, o que implica um alto custo e risco para o paciente. Por exemplo, nos sistemas alternativos para administração de vacinas, foi

demonstrado que a produção de anticorpos, em camundongos imunizados com uma única dose de um antígeno, contido numa matriz polimérica não degradável, mantinha-se por mais de seis meses em níveis comparados aos dos camundongos imunizados por duas vezes. Mas, a aplicação desta estratégia suscitou preocupação pelos possíveis efeitos adversos que o material poderia ocasionar no organismo, criando-se a necessidade de remoção cirúrgica do implante, após a liberação do antígeno. Neste sentido, a síntese de polímeros biodegradáveis contribuiu para a melhoria destes sistemas, visto que eles não requerem remoção cirúrgica e apresentam poucos efeitos colaterais. (MANTOVANI, 2002)

Hoje, o mercado mundial tem polímeros que oferecem vantagens, como liberação de fármacos a uma velocidade determinada (liberação temporal: controle sobre a velocidade da liberação do fármaco) e/ou uma localização indicada para a necessidade do corpo ou estado da doença em um período especificado de tempo (liberação espacial: controle sobre a localização do fármaco). (GHANDEHARI, 2008)

Os poliésteres biodegradáveis, como o poliácido láctico, policaprolactona e poliácido glicólico e os seus copolímeros, têm sido sintetizados (poliésteres biodegradáveis sintéticos) devido a sua biodegradabilidade desde a década de 70. Os biomateriais derivados do poliácido láctico têm conquistado atenção clínica nos últimos anos, pela sua aceitação em organismos vivos. Estes têm sido utilizados como elementos de fixação em materiais para reposição de ossos, fios de suturas e matrizes de encapsulação de drogas, em sistemas de liberação controlada. (SODERGARD e STOLT, 2002)

Matrizes poliméricas biodegradáveis degradam *in vivo* em fragmentos menores que podem ser excretados pelo corpo. Estes produtos de degradação não são tóxicos, e não devem criar nenhuma resposta inflamatória. Outra característica importante é a ocorrência da degradação em um razoável período de tempo, requerido pela aplicação. (MANTOVANI, 2002)

3.5.1 Polímeros de gelificação termorreversível

Alguns pesquisadores já conseguiram misturar substâncias poliméricas com medicamentos, para o uso no controle de doenças cancerígenas, com

sucesso. Outros buscam a liberação regulada de medicamentos e hormônios no corpo. Nestas buscas, foram encontradas características muito interessantes além da biocompatibilidade e biodegradabilidade, como a termossensibilidade de alguns polímeros, que permite a alteração de líquido para gel quando ocorre um aumento na temperatura. (CHAOLIANG, 2008; CHUNG, 2008)

Nas formas de administração convencionais (spray, injeção, pílulas), a concentração da droga na corrente sanguínea apresenta um aumento, atinge um pico máximo e, então, declina. Cada droga possui uma faixa de ação terapêutica, na qual, acima da dose, é tóxica, e abaixo, é ineficaz. Os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas. Este fato é problemático se a dose efetiva estiver próxima à dose tóxica. O objetivo dos sistemas de liberação controlada é manter a concentração do fármaco entre estes dois níveis por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única dosagem. (MANTOVANI, 2002)

A diferença de concentração plasmática efetiva em função do tempo, entre sistemas convencionais e de liberação controlada, pode ser melhor visualizado na figura 6.

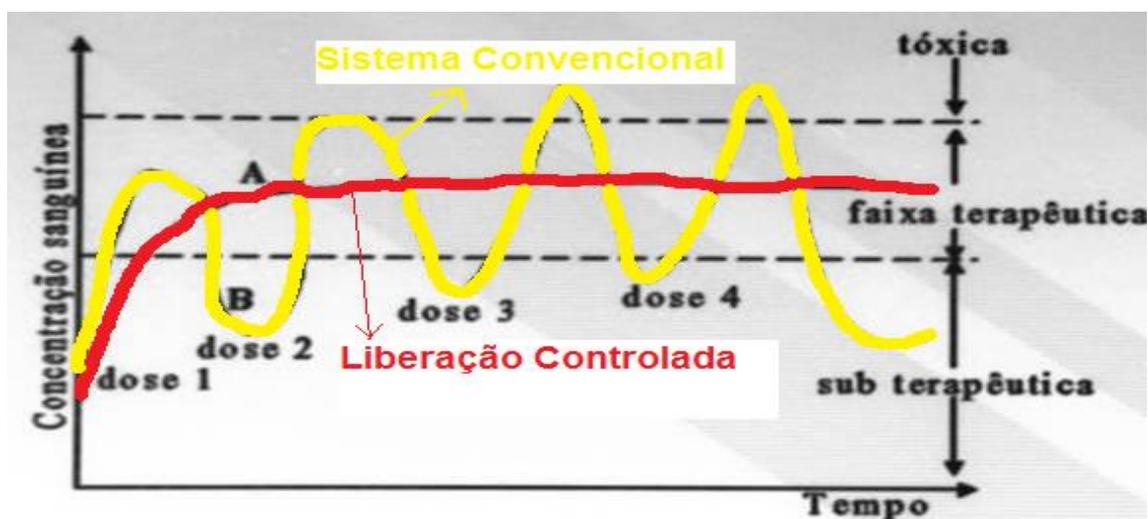


Figura 6: Perfis de liberação de medicamentos em função do tempo (adaptado de Mantovani, 2002).

No desenvolvimento dos sistemas de liberação controlada de fármacos, deve-se levar em conta: 1. tipo de material polimérico, 2. rota de preparação, 3. tamanho das partículas, 4. quantidade de fármaco incorporado, 5. carga, 6.

fármaco liberado (*in vivo e in vitro*), 7. estabilidade do fármaco, 8. estabilidade do sistema de liberação, 9. efeito de estocagem, 10 propriedades da superfície, 11. apresentação, 12. antigenicidade, 13. toxicidade do sistema de liberação, 14. fármaco e biocinética do sistema de liberação. (SÁEZ, 2004)

O uso de copolímeros em bloco para liberação de drogas foi proposto na década de 1980. Os copolímeros que possuem blocos hidrofílicos e hidrofóbicos (anfifílicos) tendem a formar micelas na água, para reduzir a energia livre, principalmente desde suas interações hidrofóbicas; suas soluções aquosas mostram gelificação termorreversível com as mudanças de temperatura. Baseados na termossensibilidade e biodegradabilidade, o material polimérico tem sido utilizado para a formação *in situ* de depósitos de liberação de drogas, por injeção de soluções dentro do corpo. (JEONG, et al., 1999 citados por SIBAO e JAGDISH, 2005)

3.5.2 Pluronic F 127.

Uma alternativa para conseguir que o hormônio FSH seja liberado lentamente, partindo de uma única aplicação, é a sua veiculação em polímeros que o liberem lentamente no sangue e que, adicionalmente, sejam inócuos ou de muito baixa toxicidade. (ESCOBAR, 2006)

Alguns ensaios de veiculação de hormônios e de outras substâncias (proteínas, medicamentos, etc.) têm sido realizados com sucesso, o que demonstra a utilidade dos chamados “polímeros inteligentes”, na lenta e sustentada liberação de substâncias por tempos controlados. Como exemplo, pode-se citar a administração de análogos de GnRH, ou testosterona, dissolvidos em polímeros termossensíveis de lenta liberação, e a veiculação de FSH em polivinilpirrolidona, já realizada em vacas Holandesas. (TAKEDOMI, 1995; CALLEJAS, 2002; WENSEL, 2002; SIBAO, 2005)

O Pluronic F 127, também chamado de Poloxamer 407, é um gel termorreversível, ou seja, que pode virar de líquido para gel e/ou voltar para líquido, de acordo com a temperatura do meio. Esta característica permite seu uso como veiculador de medicamentos por via oral, tópica, intranasal, vaginal, retal, ocular e parenteral. (ESCOBAR, 2006)

O PF 127 apresenta forma líquida em baixas temperaturas (4° a 5°C) e vira gel na temperatura ambiente, por isso, ele pode misturar-se com o hormônio em temperatura de refrigeração e manter-se desse jeito até sua injeção no corpo do animal, onde se torna gel pelo aumento da temperatura. Este tipo de polímero pode veicular e liberar lentamente o hormônio FSH no sangue, permitindo sua ação sobre os folículos recrutados, evitando a formação de um folículo dominante e apresentando crescimento e ovulação múltiplos.

O PF 127 tem uma duração média dependente das cadeias que ele forma com outros polímeros, como o álcool polivinílico (PVA), podendo melhorar a estabilidade e a duração dentro do corpo. (CONH, et al., 2006)

O PVA, associado com PF 127, é utilizado basicamente para aumentar a tensão superficial da matriz polimérica, aumentando sua meia-vida e, portanto, prolongando a degradação do polímero e a liberação do medicamento.

A biodegradação e a bioabsorção destes polímeros são uma sucessão de eventos. Exposto ao ambiente aquoso, o material sofre inicialmente hidratação. Com a presença de moléculas de água, o processo de degradação ocorre por meio da hidrólise das ligações ésteres, originando produtos na forma de oligômeros (ou monômeros) solúveis e não tóxicos. A degradação prossegue por um processo biologicamente ativo (por enzimas) ou pela clivagem hidrolítica passiva, sendo caracterizada pela perda de massa, diminuição de massa molar ponderal média e pela perda das suas propriedades mecânicas. (ZHAO, 2007)

Algumas pesquisas realizadas permitem presumir que a liberação das drogas, dentro do corpo, realizada pelos polímeros, faz com que sua ação seja mais duradoura ou que sua dose possa ser diminuída em função da veiculação inteligente exercida pelo polímero.

Em estudos realizados em vacas Holandesas, nos quais foram realizadas superovulações com uma só injeção subcutânea de FSH, veiculada em polivinilpirrolidona (PVP), podem-se observar resultados similares dos da superovulação tradicional de oito injeções. Nos grupos que foram injetados com FSH veiculado em PVP (25 - 50%), encontraram-se 6,3 a 8,8 estruturas com até 5,0 embriões transferíveis, no entanto, no grupo em que foram

injetados oito vezes, obtiveram-se 9,5 estruturas e 6,0 embriões transferíveis. (TAKEDOMI, 1995, CONH, 2006)

Do mesmo jeito, Kimura et al. (2007) conseguiram veicular FSH em hidroxigel de alumínio, para a realização com sucesso de superovulação em fêmeas bovinas da raça preta japonesa. Porém, em trabalhos realizados, na Argentina, veiculando FSH em PVP, não se conseguiu obter o efeito superovulatório, quando comparado com o do tratamento tradicional de oito injeções em dose decrescente. (CALLEJAS, 2002)

Em estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa, testou-se a veiculação de Ibuprofeno em PF 127, a fim de diminuir os efeitos nocivos da manipulação, durante o procedimento de transferência nas receptoras de embrião. Verificou-se que os resultados foram significativamente melhores quando o anti-inflamatório foi usado por via intramuscular sem o polímero (NARVÁEZ, 2008).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL.

Os testes *in vitro* foram realizados no Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal da UENF (RJ), e os testes *in vivo*, na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Regional do Extremo Oeste - Andradina (SP), localizada a 20° 50' de latitude Sul e 51° 21' de longitude Oeste. O clima pode ser caracterizado como tropical chuvoso com inverno seco. A precipitação pluviométrica média do município é de cerca 1.268 mm ao ano.

4.2 ANIMAIS

De um grupo de 45 novilhas da raça Nelore Mocho, foram selecionadas 30 para formação de três grupos de 10 animais cada. A média de peso foi de 385,36 ± 32,92 kg, e o escore de condição corporal foi de 3,0 a 3,5 (na escala de 1 a 5), com média de idade de 30 meses. Todos os animais estiveram nas condições-padrão de pastagem da fazenda com sal mineral e água *ad libitum* e foram submetidas à avaliação clínica geral e ultrassonografias para avaliar atividade ovariana.

4.3 PREPARAÇÃO DA MATRIZ POLIMÉRICA.

O Pluronic F127[®] (Sigma-Aldrich Chemical Co, Estados Unidos) foi diluído em solução salina fosfatada e tamponada (PBS), numa relação entre 15 e 30% (Peso/ Volume) e estocado sob refrigeração (4 - 6°C) por 12 horas para sua diluição total. Após a refrigeração, o composto formado foi misturado com o

álcool polivinílico (PVA) (Sigma-Aldrich Chemical Co, Estados Unidos) numa relação de 0,5 a 2,0% (P/ V). Uma vez misturado, o composto foi armazenado sob refrigeração (4-6°C) 24 horas. Antes do momento do uso, foi adicionado FSH (100 mg), misturando todo o composto no agitador (vortex), e o composto final foi estocado entre 4 e 6°C até o momento da sua administração.

4.4 TESTE *IN VITRO*

O primeiro teste realizado foi a verificação da gelificação da matriz, pelo qual foram testados três diferentes volumes (5, 10 e 15 ml), com o objetivo de verificar o tempo de gelificação que apresentou variação em função da quantidade de matriz utilizada. Neste experimento, a matriz gelificou sempre entre 1,5 e 2,0 minutos à temperatura de 37°C.

Para determinar se uma maior concentração de PVA na matriz polimérica conjugada ao hormônio FSH faz com que a meia-vida, tanto do polímero quanto do hormônio, se prolongue, foram testadas diferentes concentrações deste produto (PVA).

A matriz polimérica foi preparada com PF 127 (0,2- 0,3 g/ml) mais 0,5%, 1,0% ou 2,0% de PVA, à qual foi adicionado o FSH (10 mg/ml). Para cada concentração de PVA, foram realizadas três repetições.

Foram acondicionados 2,0 ml da matriz polimérica com 20 mg de FSH em tubos de ensaio, deixando-os gelificar por três minutos em estufa (37-38°C). Logo após, foram adicionados 2,0 ml de PBS (solução salina fosfatada e tamponada) sobre a matriz gelificada, mantendo sempre uma temperatura de 37- 38°C (figura 7). A cada 12 horas, foi retirado e substituído todo o PBS no tubo. O PBS retirado foi armazenado em alíquotas de 500 µl (figura 8) e congelado para posterior quantificação de FSH presente.

A quantificação do FSH foi realizada pelo método de espectrofotometria com o corante de Bradford, e realizada no Laboratório de Química e Função de Peptídeos e Proteínas da UENF, no espectrofotômetro (Shimadzu UV 1240), em um comprimento de onda de 595 nm. Foi realizada uma curva-

padrão de FSH diluído em PBS para comparar com os valores de absorvância das amostras e determinar a concentração de hormônio a cada 12 horas.



Figura 7. Matriz gelificada, contendo FSH e 2 ml de PBS, pronta para tirar amostra.



Figura 8. Alíquotas de 500µl de PBS recolhidas a cada 12 horas.

4.5 SINCRONIZAÇÃO E SUPEROVULAÇÃO DAS NOVILHAS.

As fêmeas foram sincronizadas, utilizando-se um dispositivo intravaginal de liberação controlada com 1 mg de progesterona (Primer[®], Tecnopec, Brasil) e uma injeção intramuscular (IM) de 3 ml de Benzoato de Estradiol (3 mg Gonadiol[®], Schering-Plough, Brasil), aplicados em dia aleatório do ciclo estral considerado como dia zero (D0).

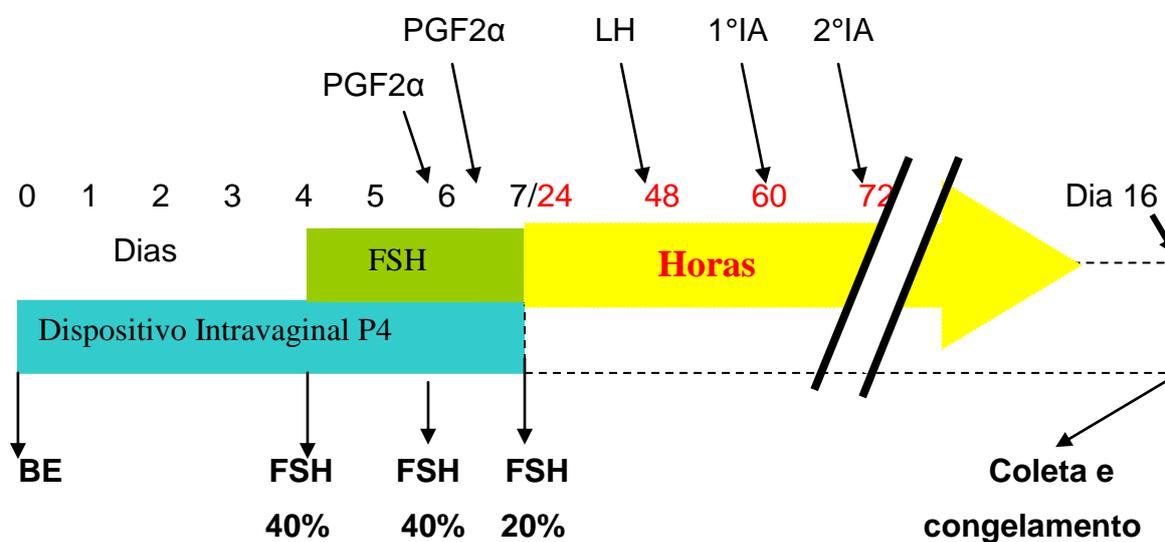
Quatro dias após a introdução do Primer (D4), foi iniciada a superovulação. Foram feitas aplicações intramusculares de Foltropin[®] (FSH, Bioniche, Canada) em concentrações decrescentes para o grupo-controle. No dia 6 (D6), administrou-se uma dose IM de 0,52 mg de Cloprostenol análogo da PGF2 α (2 ml Sincrocio[®]Ouro Fino, Brasil) pela manhã, e outra à tarde. No dia 7 (D7), o implante de P4 foi retirado pela manhã e, no dia 8 (D8), aplicaram-se 12,5 mg IM de LH (10 ml Lutropin[®], Bioniche, Canada) pela manhã. A primeira inseminação foi realizada à tarde do mesmo dia, e a segunda pela manhã do dia seguinte (Fig. 9). (BARUSELLI. 2006)

Os animais foram inseminados pelo mesmo técnico e foi utilizado sêmen comprovadamente viável de um mesmo reprodutor. Sete dias após da primeira

inseminação, os animais foram submetidos à colheita não cirúrgica dos embriões.

Para avaliação dos diferentes protocolos de superovulação, as fêmeas foram separadas em três grupos com 10 novilhas cada. No grupo-controle foram realizadas três aplicações de FSH a cada 36 horas, sendo as duas primeiras com 40% da dose total, e a terceira com 20%. No grupo 1, foram injetados 50 mg de FSH, veiculado na matriz polimérica em dose única por via subcutânea (SC), e no grupo 2, foram injetados 100mg de FSH em dose única (figura. 9).

GRUPO-CONTROLE



GRUPOS 1 e 2

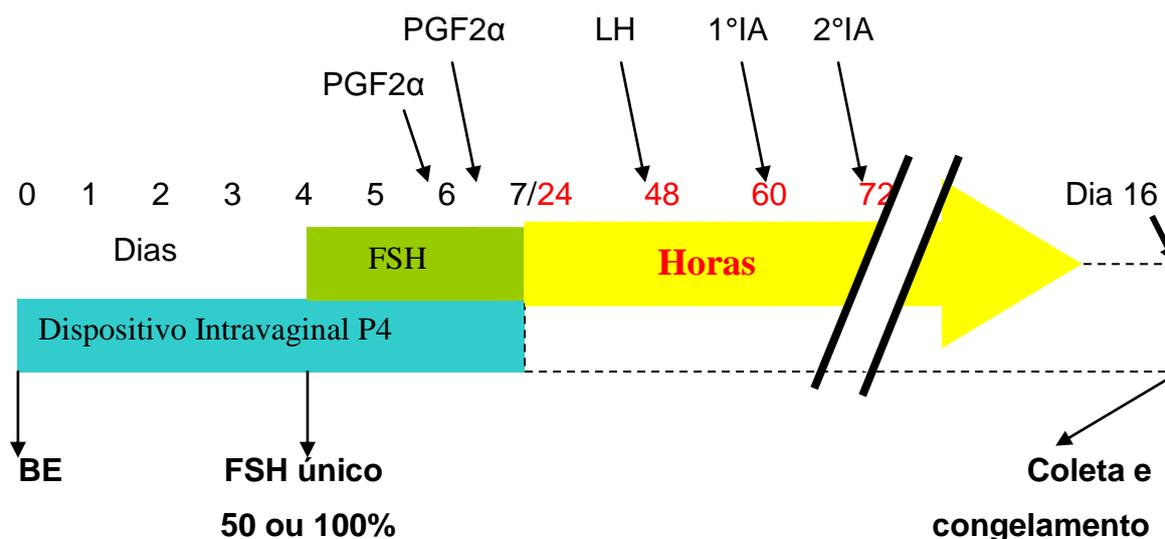


Figura 9. Esquema dos protocolos de sincronização do ciclo estral e superovulação de vacas do grupo-controle, injeção de FSH a cada 36 horas, e dos grupos 1 e 2, injeção única de FSH, veiculado em matriz polimérica com a metade e o total da dose, respectivamente.

4.6 COLETA E AVALIAÇÃO DOS EMBRIÕES.

A coleta dos embriões foi realizada sete dias depois da primeira inseminação. As fêmeas foram submetidas à anestesia epidural (4 ml de Lidocaína® 2%) e foi realizado o lavado uterino mediante o uso de cateteres de “Foley”. A lavagem foi realizada com PBS enriquecida com soro fetal bovino (Cultilab, Brasil) e utilizou-se um filtro, no final do sistema de condução, para manter os embriões na solução o tempo todo e recuperá-los por meio da lavagem da rede do filtro.

O líquido contido no filtro foi transferido para uma placa de Petri, onde se realizou a seleção e a classificação dos embriões. A triagem e a classificação dos embriões foram realizadas segundo as normas contempladas pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (I.E.T.S). (STRINGFELLOW, 1998) Foram utilizadas apenas mórulas compactas e blastocistos iniciais, classificados como excelentes (grau I) ou bons (grau II) para congelamento.

Para o congelamento, os embriões foram lavados em 10 gotas de meio Holding®, acondicionados em etilenoglicol (crioprotetor) e congelados utilizando máquina de congelamento TK 3000 (TK congelamento, Brasil).

4.7 VARIÁVEIS AVALIADAS

Para avaliação do número de folículos, crescimento e formação posterior dos corpos lúteos (CL), as novilhas foram submetidas a exame ultrassonográfico nos dias 0, 4, 6, 8 e 14 dos protocolos (Falco 100, Pie medical), no qual foi utilizado um transdutor convexo multifrequencial de 5,0 e 7,5 Mhz, por via transretal. Além de avaliar o efeito dos tratamentos sobre a produção de folículos e corpos lúteos, foi avaliada também a quantidade e a qualidade dos embriões obtidos.

O número e a qualidade dos embriões obtidos de cada tratamento foram comparados com aos do grupo-controle (FSH 100% 3X) e, igualmente, foram

comparadas as quantidades de folículos e de corpos lúteos, conforme avaliação ultrassonográfica dos ovários, realizada previamente.

4.8 ANÁLISE DOS DADOS.

Foi utilizado um delineamento inteiramente ao acaso com três tratamentos e 10 repetições. Foi realizada a análise de variância (Proc GLM, SAS, 1999) das variáveis: número médio de folículos maiores de 6 mm, número médio de folículos menores de 6 mm (nos dias 8 e 14), número médio de corpos lúteos no dia 14 e número de embriões coletados. Quando os dados não apresentaram distribuição normal, os mesmos foram transformados mediante o logaritmo na base 10. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste *t*. (SAS, 1999)

No grupo FSH 100% (1X), uma novilha foi excluída por apresentar abundante secreção de aparência purulenta na manipulação no dia 8, ficando, assim, apenas nove animais nesse grupo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

5.1 TESTE *IN VITRO*.

A adição de 2% de PVA apresentou maior duração da matriz polimérica e, conseqüentemente, um maior tempo de liberação de FSH, além de uma maior estabilidade no padrão de liberação do hormônio, quando comparada às das demais concentrações. (Figura 10)

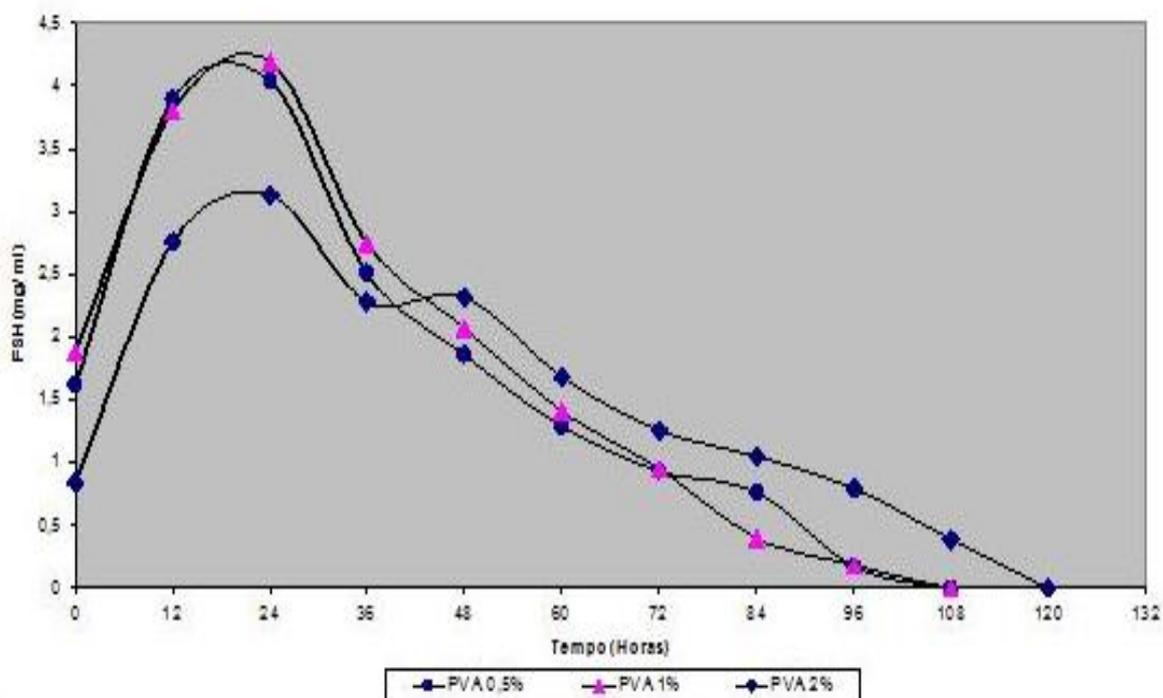


Figura 10. Padrão de liberação *in vitro* de FSH (20 mg) em matriz polimérica de Pluronic F127 associada a diferentes concentrações de PVA (0,5%, 1,0% e 2,0%)

Foi observado que o tempo de dissolução da matriz coincide com o tempo de liberação do hormônio, tendo uma variação de 108 a 120 horas, dependendo da concentração de PVA presente na matriz polimérica, sendo que a maior duração foi para a matriz com PVA a 2%. Isso significa que o tempo de liberação do hormônio apresenta similaridade com o tempo requerido para causar efeito superovulatório nas fêmeas bovinas, como foi reportado por Kelly (1996); Mapletof (2002) e Chebel (2008).

Wensel (2002) e Chung (2007) realizaram veiculação de GnRH e de hormônio do crescimento em Pluronic F 127, conseguindo ótima veiculação desses hormônios. Estes achados unidos aos resultados observados no presente estudo permitem concluir que o FSH pode ser veiculado em uma matriz polimérica construída com Pluronic F 127[®] (20- 30%) e PVA (0,5 a 2,0%).

Considerando que o comportamento da matriz polimérica *in vitro* tenha apresentado respostas adequadas para a veiculação e a liberação do FSH, são importantes novos estudos que permitam aprofundar os conhecimentos em relação ao comportamento da matriz polimérica *in vivo*. E, levando-se em consideração os efeitos que podem ser causados pela variação de alguns parâmetros, como a temperatura corporal, pH e resposta imunológica, que a longa duração do hormônio causa no animal. Todavia, já foi relatado que as vacas apresentam anticorpos contra FSH de origem suína, mas esta resposta imunológica não interfere na produção de corpos lúteos e embriões viáveis. (DUARTE, 2008)

5.2 TESTE *IN VIVO*

Neste estudo, os ovários das novilhas apresentaram resposta ao aumento dos níveis de FSH, mostrando crescimento folicular em todos os grupos. Tais resultados foram semelhantes aos observados por Takedomi (1994) e Kimura (2007).

O teste *in vivo* mostrou que o hormônio FSH misturado com a matriz polimérica conseguiu promover o crescimento dos folículos até um tamanho em que pudessem responder ao hormônio LH, que, na raça Nelore, acontece ao atingir diâmetro de 5,8 a 6,2 ± 0,2 mm, no momento da divergência. Este diâmetro foi atingido ainda no grupo que recebeu só 50% da dose total de hormônio, porém está demonstrado que a taxa de ovulação é superior quando os folículos atingem maior diâmetro (7 a 10 mm) neste período. (CARVALHO, 2005; GIMENES, 2008)

Nos dias 4 e 6 do protocolo, foram observadas quantidades muito similares no número total de folículos em todos os grupos, porém, no D8, pôde-se verificar diferença estatística quando comparadas ao número de folículos maiores e menores de 6 mm. (figura 11).

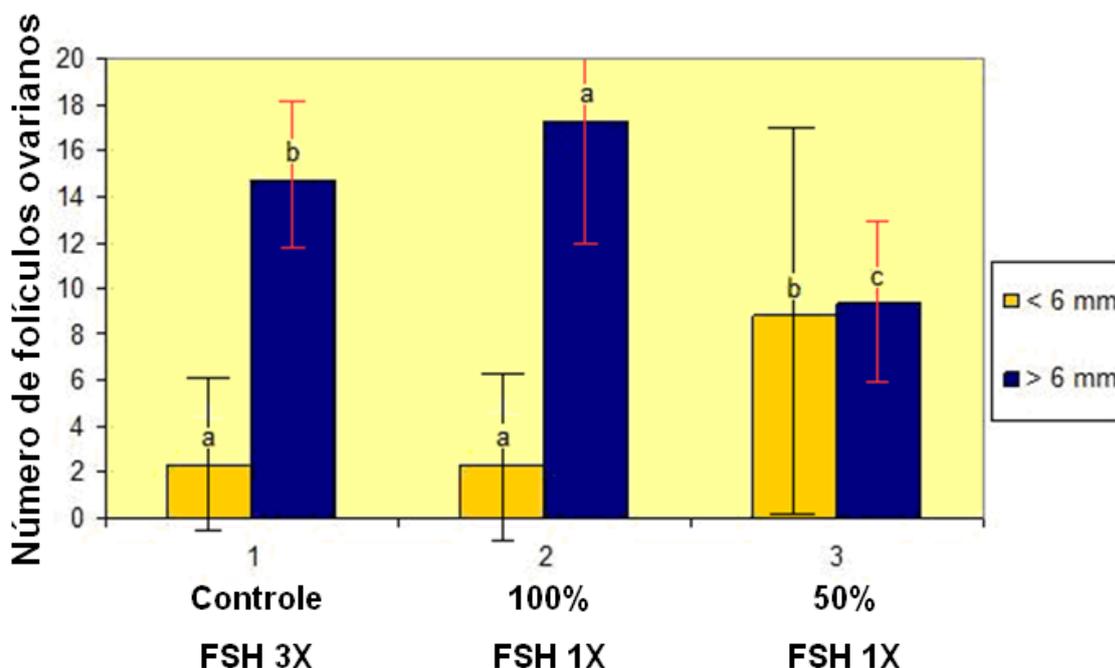


Figura 11: Número médio de folículos maiores e menores de 6 mm nos três tratamentos superovulatórios no dia 8. Valores com sobrescritos iguais não diferem entre si ($p > 0,05$).

Os valores apresentados, pelos tratamentos controle (3X) e FSH 100% (1X), mostraram diferença estatística ($p > 0,05$) na quantidade de folículos em crescimento até o dia 8 (dia da aplicação de LH), mas o tratamento FSH 50% (1X) apresentou aumento nos folículos menores que 6 mm e diminuição nos maiores que 6 mm, em relação aos outros grupos (figura 10).

Os valores anteriores têm demonstrado que a dose de FSH 50% não permitiu o desenvolvimento normal da maioria dos folículos, no entanto, a dose 100% apresenta melhores resultados nesta etapa, tanto na aplicação única quanto na tríplice.

No dia 14, as estruturas ovarianas, observadas com auxílio do ultrassom, em todos os grupos, mostraram que as que tiveram folículos maiores de 6 mm não conseguiram ovular e que também havia quantidades variáveis, mas não significativas, de folículos em crescimento (menores de 6

mm), porém, o grupo-controle apresentou maior quantidade de corpos lúteos, conforme mostra a figura 12.

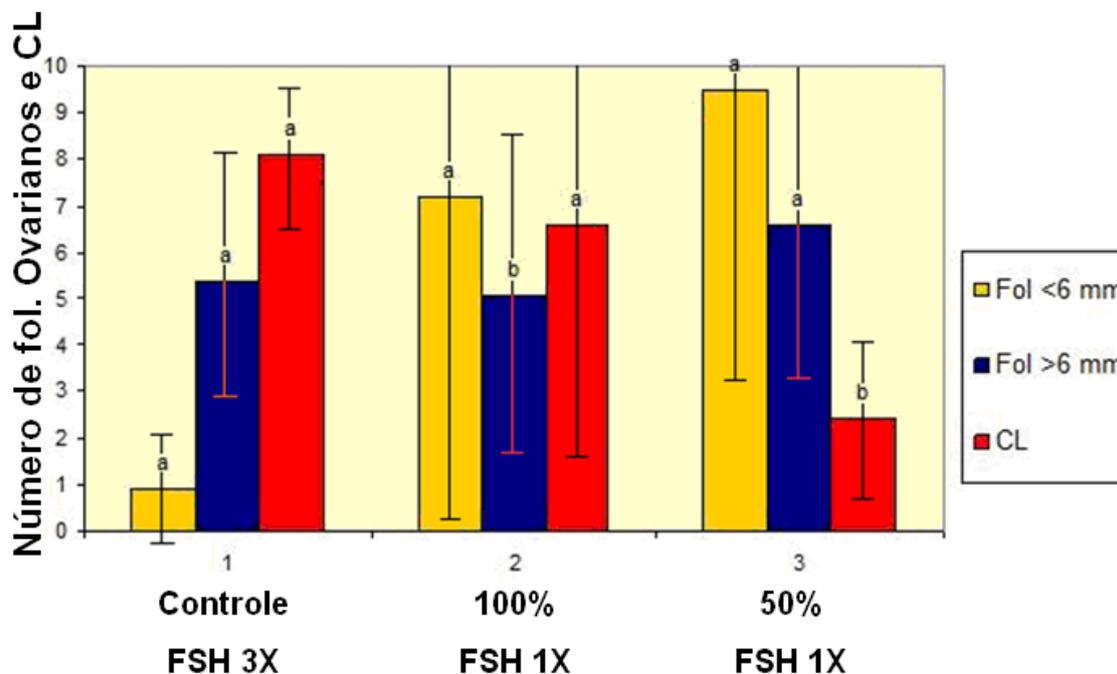


Figura 12. Número médio de folículos maiores e menores de 6 mm e corpos lúteos nos três tratamentos superovulatórios do dia 14. Valores com sobrescritos iguais não diferem entre si ($p>0,05$).

Estes achados permitem observar que foi superior o comportamento dos protocolos que tinham a dose 100% de FSH na medida em que eles mostraram um maior número de corpos lúteos e, portanto, de ovulações. Isto evidencia que a quantidade de FSH usada no grupo 3 (50 mg) foi muito baixa, sendo insuficiente para produzir uma superovulação eficientemente, já que os folículos alcançaram seu desenvolvimento tardiamente (D14), afetando assim sua ovulação.

Além disso, os dados do dia 14 mostraram também a existência de um número crescente de folículos menores de 6 mm, nos grupos 2 e 3, com hormônio veiculado em matriz polimérica. Esse resultado nos permite sugerir que pode estar ocorrendo a permanência de pequenas quantidades de FSH na circulação, causando, assim, o desenvolvimento folicular tardio.

Foi observado, no presente experimento, que a maioria dos folículos ainda que atingisse o grau de desenvolvimento necessário para responder ao estímulo do hormônio LH (6 mm no dia 8), não conseguiu ovular. Porém,

alguns animais conseguiram fazer múltiplas ovulações e outros apresentaram folículos persistentes (anovulatórios) e/ou formação de cistos. Resultados semelhantes foram obtidos por Kimura et al. (2007). Entretanto, Callejas et al. (2002) observaram resultados diferentes, visto que o número de folículos maiores no momento da coleta foi baixo (1,2 a 2 folículos) quando comparado ao da superovulação com FSH veiculado em PVP (dose única) ou injetado por via intramuscular (doses múltiplas).

Dentre as possíveis explicações em relação aos folículos terem apresentado desenvolvimento, embora sem ovular, está a possibilidade de a matriz polimérica ter feito liberação do FSH muito rapidamente em alguns animais, que poderiam ter apresentado metabolismo acelerado e, portanto, aumento da temperatura corporal e/ou pH do sangue. Essas alterações podem afetar o comportamento dos polímeros, como reportado por Jeong e Vandamme citados por Castro (2006), que afirmam que alguns copolímeros apresentam degradação mais rápida *in vivo* que *in vitro*, fato este atribuído à atuação enzimática.

Outra possível explicação seria de que a duração da matriz polimérica e, portanto, dos níveis de FSH no animal foi muito prolongada e, por isso, apresentaram grande quantidade de folículos maiores de 6 mm ainda depois da aplicação do hormônio LH, como indutor da ovulação, no dia 8 dos protocolos.

Já foi demonstrado que tanto na raça Nelore quanto na Holandesa, sob condições fisiológicas, ocorre declínio nas concentrações plasmáticas de FSH próximo ao momento da divergência folicular, o que, na raça Nelore, acontece perto dos 6 mm de diâmetro e 2,5 dias depois da ovulação do ciclo anterior. Esse declínio nos níveis de FSH pode ser necessário para o adequado desenvolvimento dos folículos e pode ser prejudicado pela ação da liberação constante do hormônio pela matriz polimérica, fato que não acontece quando se utiliza um protocolo de múltiplas injeções. (Gimenes, 2008)

Segundo Amsterdam (2002), as células gonadais podem ser superestimuladas pelas gonadotrofinas FSH ou LH onde existe um mecanismo de dessensibilização, essencial para impedir esta estimulação. Pode acontecer, por exemplo, o processo denominado luteólise funcional, no qual as células da

granulosa vão-se luteinizando, que mostra redução da sensibilidade ao LH ainda que tenha receptores para esse hormônio.

Na figura 13, verificou-se efeito significativo ($p < 0,05$) do grupo-controle, quando comparado ao do grupo 50% FSH (1X) para o número de corpos lúteos observados por ultrassonografia no dia 14 (dois dias antes da coleta), mas não apresentou diferença significativa em relação ao grupo 100% FSH (1X). Entretanto, os corpos lúteos não apresentam concordância com os achados, no momento do lavado uterino, visto não corresponderem com o número de estruturas encontradas, fato que pode ser explicado pela dificuldade de transposição do aplicador, devido ao estreitamento da cérvix dos animais, o que impediu a coleta.

O grupo 2 FSH 100% (1X), veiculado em matriz polimérica, apresentou maior quantidade de embriões, mostrando diferença estatística com a dos outros grupos, da mesma maneira que apresentou diferença significativa em relação ao número de folículos maiores de 6 mm de diâmetro no dia 14 do protocolo.

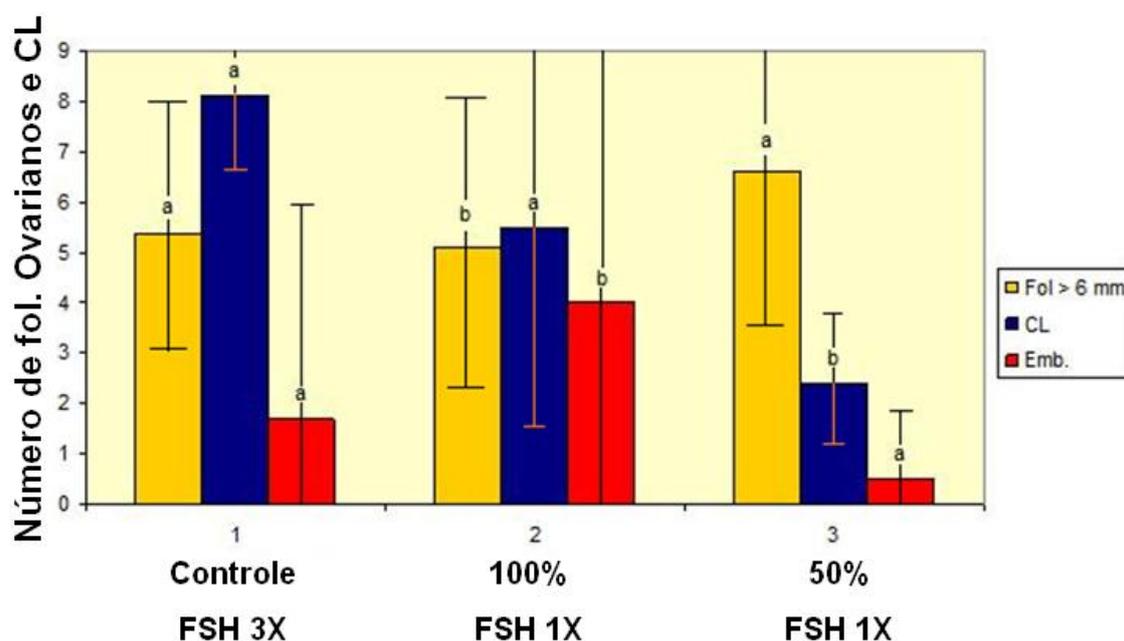


Figura 13. Número médio de folículos maiores de 6 mm, corpos lúteos no dia 14 e embriões coletados nos três tratamentos superovulatórios. Valores com sobrescritos iguais não diferem entre si ($p > 0,05$).

Os resultados do presente estudo mostram que o grupo de animais tratados com a dose total, normalmente usada em novilhas Nelore (100 mg), veiculada numa matriz polimérica biodegradável de liberação controlada,

injetada por via subcutânea, como dose única, conseguiram resultados melhores que os tratados com múltiplas aplicações do hormônio FSH.

Em relação à matriz polimérica, considera-se necessário realizar ainda mais testes *in vivo*, a fim de estabelecer com precisão quais os mecanismos de liberação dos hormônios e as propriedades intrínsecas aos polímeros que a formam.

Estudos futuros devem ser realizados com animais de maior desenvolvimento, tanto corporal quanto uterino, para evitar dificuldades no momento do lavado uterino. Da mesma forma, seria ideal trabalhar com animais pré-sincronizados e de histórico reconhecido para a produção de embriões.

A realização de um maior número de pesquisas que utilizem matrizes poliméricas como veiculadoras de hormônios permitirá a definição de uma dose intermédia entre 50 e 100 % do hormônio FSH. Ou que ainda a diminuição da dose total, com uma segunda dose intramuscular de 20 a 30% do total como suporte para melhorar a finalização do processo de crescimento dos folículos.

6. CONCLUSÕES.

- O hormônio FSH veiculado numa matriz polimérica constituída por Pluronic F 127 e polivinil álcool, em dose única, foi capaz de produzir superovulação em novilhas da raça Nelore.
- Pode-se reduzir, para uma dose única, o número de aplicações do hormônio FSH veiculado numa matriz polimérica biodegradável de liberação controlada.
- A aplicação de 50mg de FSH veiculada na matriz polimérica implica uma insuficiente resposta ao tratamento superovulatório na raça Nelore, quando utilizada dose única.
- O fato de não apresentar diferença significativa no número de embriões produzidos, entre o grupo-controle e o grupo 100% FSH, esclarece os benefícios obtidos quando se injeta uma só dose, porque gera menor estresse e menos mão de obra.
- Estudos futuros devem ser realizados com o intuito de diminuir a variação individual apresentada na resposta superovulatória dos animais

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G.; JAISWAL, R.; SINGH, J.; MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, 69, p. 72- 80, 2008.

ADAMS, G.; MATTERI, R.; KASTELIC, J.; GINTHER, O. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of reproduction and fertility*, Cambridge, v. 94, n. 1, p. 177- 188, 1992.

ALBERTINI, D.; COMBELLES, C.; BENECCHI, E.; CARABATSOS, M. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*, v.121, p.647-653, 2001.

AMARAL, E., GRABE, A., NOGUEIRA, H., LINZ, G., BARRATT, G. E.; MOSQUEIRA, V. Cardiotoxicity reduced by Halofantrine entrapped in nanocapsule devices. *Life Sciences*, v. 80, p.1327- 1334. 2007

ANDRADE, E.; MARCONDES, M.; ALFIERI, A.; OLIVEIRA, J. De.; RODRIGUES, A.; TONIOLLI, R. Interactions of indol acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. *Theriogenology*, v.64, p. 1104-1113, 2005.

BARROS, C. M.; FIGUEIREDO, R. A.; PINHEIRO, O. L. Estro ovulação e dinâmica folicular em zebuínos. *Revista Brasileira de reprodução animal*, Belo Horizonte, v. 19, n. 1-2, p. 9-12, 1995.

BARROS, C.; NOGUEIRA, M. Superovulação em zebuínos de corte. Em: *Biotechnology da reprodução em bovinos. 1º Simpósio internacional da reprodução animal aplicada*. Londrina, PR, 2004.

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

BARROS, C. et al. Tratamentos superestimulatórios utilizados em protocolos para transferência de embriões bovinos *Acta Scientiae Veterinariae* 35(Supl. 3): 2007.

BARUSELLI, P.; SÁ FILHO, M. de.; MARTINS, C.; NASSER, L.; NOGUEIRA, M.; BARROS, C.; BÓ, G. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 65, 2006. 77- 88.

BARUSELLI, P.; GIMENES, L.; SALES, J. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. *Rev Brás Reprod Anim*, v 31, n. 2, p.205- 211, 2007.

BARUSELLI, P.; MARTINS, C.; SALES, J.; FERREIRA, R. Novos avanços na super ovulação de bovinos. *Acta scientiae veterinariae*. 36 (Supl. 2): p 433-448. 2008

BARUSELLI, P.; MARQUES, M.; REIS, E., NASSER, L.; SILVA, R.; MENEGATTI, J. Adequação da dose de FSH (Folltropin-V) em protocolos de superovulação de vacas nelore (*Bos taurus indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo. *Acta Sci Vet* , v.31 (Suppl 1), p. 244, 2008.

BERGFELT, E.; KOJIMA, F.; WEHRMAN, M.; CUPP, A.; PETERS, K.; MARISCAL, V.; SANCHEZ, T. Frequency of luteinizing hormone pulses and circulating 17 B estradiol concentration in cows is related to concentration of progesterone in circulation when the progesterone comes from either and endogenous or exogenous source. *Journal of animal reproduction science*, Amsterdam, v. 37, n. 3, p. 257- 265, 1995.

BO, G.; HOCKLEY, D.; NASSER, L.; MAPLETOFT, R. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Folltropin-V in beef cattle. *Theriogenology*, v. 42, p. 963- 975. 1994.

BO, Gabriel. Dinámica Folicular y Tratamientos Hormonales para Sincronizar la Ovulación en el Ganado Vacuno (online). (Trujillo, Venezuela), octubre 2002. http://www.avpa.ula.ve/congresos/cd_xi_congreso/pdf/grabielfbofr.PDF.

BO, G.; COLAZO; M., MARTINEZ, M.; KASTELIC, J.; MAPLETOFT, R. Sincronización de La emergencia de La onda folicular y la ovulación en animales tratados con progestágenos y diferentes esteres de estradiol. Em 2° Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. *Biotechnology da reprodução em bovinos*. 2007.

BO, G.; GUERRERO, D. E.; ADAMS, G. Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. *Theriogenology*, v. 69, p. 81- 87, 2008.a

BO, G.; GUERRERO, D. E.; MAPLETOFT, R. Novas abordagens para a manipulação da dinâmica folicular para superestimulação em bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*. v. 36 (supl. 2), p. 397- 402. 2008b.

BOLS, P. E. J.; LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; SOOM, A. V. A comparison of a mechanical sector and a linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. *Theriogenology*, v.62, p.906- 914, 2004.

BRAILEANU, G.; ALBANESE, C.; CARD, C.; CHEDRESE, P. FSH bioactivity in commercial preparations of gonadotropins. *Theriogenology*, v. 49, p. 1031, 1998.

BURATINI, J.; PRICE, C.; VISINTIN, J. E.; BO, G. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology*, v.54 ,421- 431. 2000.

BURATINI, J. Controle endócrino e local da folículo-gênese em bovinos. *Rev Bras Reprod Anim*, v. 31, n. 2, p. 190- 196. 2007.

CABODEVILA, J. E.; TORQUATRI, S. Superovulação de Fêmeas bovinas. In: Palma, G.A. *Biotechnology de la Reproducción* 1ª edição INTA, Argentina, 2001. p. 79-108.

CALLEJAS, S.; ALBEIRO, R.; CABODEVILA, J.; DULOUT, F.; ALLER, J. E.; TERUEL, M. Efecto de La estimulación ovarica com FSH-P em dosis única disuelta em polivinylpirrolidona y La combinación de FSH-P y ECG em dosis reducidas. *Revista Argentina de producción animal*. v.22, p. 141- 151, 2002.

CARVALHO, L. Caracterização ultra-sonográfica do desvio folicular ovariano em vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). Tese de mestrado Universidade estadual paulista, faculdade de Medicina Veterinária y Zootecnia, Botucatu, 2005.

CASTRO, Maria Leonora de. Copolímeros estatísticos biodegradáveis de E caprolactona e L, L-dilactideo-síntese, caracterização e propriedades. Tese de Doutorado Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2006.

CHAOLIANG, H.; SUNG, W.; DOO, S. *In situ* gelling stimuli-sensitive block copolymer hydrogels for drug delivery. *Journal of controlled release*, v.127, p. 189- 207, 2008.

CHEBEL, R.; DEMÉTRIO, D.; METZGER, J. Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. *Theriogenology*, v. 69, p. 98- 106. 2008.

CHEN, S. E.; SINGH, J. Controlled delivery of testosterone from smart polymer solution based systems: In vitro evaluation. *International journal of pharmaceutics*, v. 295, p.183- 190, 2005

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* 2007; 307 (abstract).

CHUNG, H.; LEE, Y.; PARK, T. Thermo- sensitive and biodegradable hydrogels based on stereocomplexed Pluronic multi- block copolymers for controlled protein delivery. *Journal of controlled release*, 127, p.22- 30. 2008.

COHN, C.; LANDO, G.; SOSNIK, A.; SHAI, G.; LEVI, A. PEO- PPO- PEO based Poly (ether ester urethane)s as degradable reverse thermo- responsive multiblock copolymers. *Biomaterials*,v. 27, p. 1718- 1727. 2006.

DEMOSTIER, M.; BECKERS, J.; VAN DER ZWALMEN, P.; CLOSSET, J.; GILLARD, J.; ECTORS, F. Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows, *Theriogenology*, v. 30 (1988), pp. 379–386.

DONALDSON, L. E. Comparison of Cloprostenol and Dinoprost Tromethamine for the control of estrus in bovine embryo transfer. *Theriogenology*, v. 21, p. 1019-1022, 1984.

DONALDSON, L. E. Embryo production by super-ov and FSH-P. *Theriogenology*, v.33, p.214, 1990.

DONALDSON, L. E. A comparison of FSH products. In: international workshops of embryo transfer, biotechnology and advanced technologies, 1, 1995, Montevideo. *Anais... Montevideo:Universidad de la Republica*, v.1, p.1-8.

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, v. 55, p. 1211-1239, 2001.

DUARTE, K.; PIRES, R.; GOMES, L. Resposta imunológica de vacas Nelore e caracu superovuladas com FSHp injetado por via subcutânea. PUBVET, Londrina, v. 2, N. 39, Art # 377, 2008. Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/texto.php?id=377>>.

ELIGIO CASTILLO, Teresa. Síntese bacteriana e modificação de polihidroxicanoatos para liberação controlada de hormônios. Tese apresentada ao centro de ciências e tecnologias agropecuárias da universidade estadual Do Norte Fluminense. Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 1998.

ERENO, Ronaldo. Dinâmica folicular em bovinos. Monografia do mestrado na universidade estadual Paulista. Botucatu- SP, 2002.

FERNANDES, C.; ROCHA, I.; ARAGAO, I.; VIANA, J. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. Acta Scientiae Veterinariae, v. 37 (3), p. 215- 224, 2009.

FORTUNE, J. E. Follicular dynamics during the bovine estrus cycle: A limiting factor in improvement of fertility. Journal of animal reproduction science, Amsterdam, v. 33, n. 1- 4, p. 111- 125, 1993.

FORTUNE, J. E.; CUSHMAN, R. A.; WAHL, C. M.; KITO, S. The primordial to primary follicle transition. Molecular and Cellular Endocrinology. 2000;163:53-60.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G.; YANG, M. Follicular development: The role of the follicular microenvironment in the selection of the dominant follicle. Journal of animal reproduction science, Amsterdam, v. 82- 83, p. 109- 126, 2004.

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

GARVERICK, H.; ZOLLERS, W.; SMITH, M. Mechanism associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. Animal reproduction sciences, Amsterdam, v. 28, n. 1- 4, p. 111- 124, 1992.

GHANDEHARI, H. Materials advanced drug delivery in the 21st century: a focus area for advanced drug delivery reviews. Advanced drug delivery reviews 60, 2008, 956.

GIBBONS, J. R.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. *Biology of Reproduction*, v. 57, p. 1066- 1073, 1997.

GILCHRIST, R.; RITTER, I. E.; ARMSTRONG, D. Oocyte -somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Animal reproduction science*, v. 82-83, p. 431-446. 2004.

GIMENES, L.; SÁ FILHO, M.; TORRES, J.; BELTRAN, M.; NOGUEIRA, G.; BARUSELLI, P. Perfil de FSH e LH na divergência folicular em novilhas Nelore (*Bos indicus*). *Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science*, São Paulo, v. 45, p. 11- 16, 2008.

GINTHER, O. J.; KASTELIC, J. P.; KNOPF, L. Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biology of reproduction*. 41: 247-254. 1989.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M.; FRICKE, P.; GIBBONS, J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of reproduction*, 55: 1187- 1194.1996.

GINTHER, O. J. et al. Pulsatility of systemic FSH and LH concentrations during follicular wave development in cattle. *Theriogenology*, v. 50, p. 507- 519, 1998.

GINTHER, O. J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Animal Reproduction Science*, v. 60– 61, p. 61–79, 2000.

GINTHER, O. J. et al. Follicle selection in monovular species. *Biology of reproduction*, v. 65, p. 638- 647. 2001.

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

GONZALEZ, A., LUSSIER, J., CARRUTHERS, T. MURPHY, B. E MAPLETOFT, R. Super ovulation in the cow with pregnan mare serum gonadotrophin: effect of dose an anti pregnan mare serum gonadotropin. *Canadian Veterinary Journal*, v. 35, p. 158- 162, 1990.

GOULDING, D.; WILLIAMS, D.; ROCHE, J.; BOLAND, M. Factors affecting superovulation in heifers treated whit PMSG. *Theriogenology*, v. 45, 765- 773. 1995

HAFEZ, E.; HAFEZ, B. Reprodução animal. São Paulo, Brasil: Manole, 7 edição, p.513, 2004.

HOCKLEY, D.; BO, G.; PALASZ, A.; DEL CAMPO, M.; MAPLETOFT, R. Super ovulation with a single subcutaneous injection of Foltropin in the cow: effect of dose and site of injection. *Theriogenology*, v. 37, p. 224, 1992.

HOPPER, H. W.; SILCOX, R. W.; BYERLEY, D. J. E.; KISER, T. E. Follicular development in prepubertal heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 31, 7-12. 1993.

KELLY, P.; DUFFY, P.; ROCHE, J.; BOLAND, P. Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Animal reproduction science*, v. 46, p. 1- 14. 1997.

KIMURA, K.; HIRAKO, M.; IWATA, H.; AOKI, M.; KAWAGUCHI, M. E.; SEKI, M. Successful superovulation of cattle by a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel. *Theriogenology*, v. 68, p. 633- 639, 2007.

KULICK, L. J. et al. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology*, v. 52, p. 913-921, 1999.

LOVIE M.; GARCIA A.; HACKETT A.; MAPLETTFT R. J. The effect of dose schedule and route of administration on superovulation on superovulatory response to follitropin in Holstein cows. *Theriogenology*, 1994; 41:241

MACHADO, L.; CORRÊA, M. E.; PINESCHI, L. Alternativas hormonais para programas de transferência de embriões em bovinos. UFPEL. Disponível em: www.ufpel.tche.br/hcv ,2002.

MANTOVANI, M. Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos. Monografia. Universidad de Campinas Unicamp. Instituto de química, laboratório de química de estado solido. 2002.

MARTINEZ, A.; ALVAREZ, R.; PIRES, R.; NOGUEIRA, G. Resposta ovariana e perfil de desenvolvimento folicular de novilhas tratadas com injeção subcutânea de FSH e reforço intramuscular após 48 horas. *B. Industr. Anim.* v. 65,n. 1, p. 15- 19. 2008.

MARTINEZ, Antonio. Super ovulação em bovinos com dose única de FSH aplicada por via subcutânea. Efeito de um reforço de FSH (via intramuscular) após 48 horas. Tese doutorado, universidade estadual paulista, faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, 2006.

MAPLETOFT, R.; BENNETT, K.; ADAMS, G. Recent advances in the superovulation in cattle, *Reproduction and nutrition development*, v. 42, p. 601-611. 2003

MARQUEZ, M.; SILVA, K.; MAX, M.; GOMES, R.; SENEDA, M. Principais estratégias para o incremento da TE em bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 36. suplemento 2, p. 161- 164, 2008.

MAZIERO, R. R. D.; MATTOS, M. C. C.; MARTIN, I.; OBA, E.; SARTORI, R.; FERREIRA, J. C. P. Concentrações plasmáticas de cortisol e progesterona em vacas nelore (*bos taurus indicus*) submetidas a manejo diário ou manejo semanal. *Acta Scientiae Veterinariae* 35(Supl. 3): 2007

MONNLAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. Superovulatory responses of cattle, *Theriogenology* 19 (1983), pp. 55–79.

NARVÁEZ, H. Efeito do ibuprofeno no momento da inovulação de embriões bovinos. Tese Mestrado Universidade Estadual do Norte Fluminense UENF, laboratório de reprodução e melhoramento genético animal. 2008.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Follicular populations during the estrous cycle in heifers: III. Time of selection of the ovulatory follicle. *Journal of animal reproduction science*, Amsterdam. V. 16. n. 2, p. 81- 95, 1988.

RAJAMAHENDRAN, R.; MANNIKAN, M. Effects of exogenous steroid hormones on the dominant follicle maintained by a norgestomed implant in heifers. *Canadian journal of animal science*, Ottawa, v. 74, n. 4, p. 457- 464, 1994.

RIBADU, A.; NAKADA, K.; MORIYOSHI, M.; ZHANG, W.; TANAKA, Y.; NAKAO, T. The role of LH pulse frequency in ACTH-induced ovarian follicular cysts in heifers, *Anim Reprod Sci*, v. 64, p. 21–31. 2000.

SÁEZ, V.; HERNÁEZ, E.; SANZ, L. E.; KATIME, I. Liberación controlada de fármacos. Microparticulas. *Revista iberoamericana de polimeros*, v. 5 (2), p. 87-101, 2004.

SARTORI, R. et al. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biology of reproduction*, v. 65, p. 1403- 1409. 2001.

SAS Institute Inc. *SAS user's guide: statistic*, version 6.08 Cary, N.C, 1996.

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

SENGER, P. L. *Pathways to pregnancy and parturition*, 2^a ed. Current Conceptions. Inc. Moscow. 2003.

SIBAO Chen; JAGDISH Singh. Controlled delivery of testosterone from smart polymer solution based systems: In vitro evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*. Vol 295. pag. 183–190. 2005.

DA SILVA, J. Fatores que influenciam a produção de embriões de vacas Nelore (*B. taurus indicus*) superovuladas. Dissertação de mestrado, UNESP, Jaboticabal. 2002.

SIROIS, J.; FORTUNE J. E. 1988. Ovarian follicular dynamics during estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.* 39:308-317.

SODERGARD, A. E.; STOLT, M. Properties of lactid acid based polymers and their correlation with composition. *Progress in polymer science*, v. 27, n. 41, p 1123- 1163, 2002.

STOCK, A.; ELLINGTON, J.; FORTUNE, J. E. A dominant follicle does not affect follicular recruitment by super ovulatory doses of FSH in cattle but can inhibit ovulation. *Theriogenology*, v. 45, p. 1091- 1102, 1996.

STOEBEL, D.; MOBERG, G. Repeated acute stress during the follicular phase and luteinizing hormone surge of dairy heifers, *J Dairy Sci* 65 (1982), pp. 92–96

SUDERLAND, S.; CROWE, M.; BOLAND, M.; ROCHE, J.; IRELAND, J. Selection dominance and atresia of follicles during the oestrus cycle of heifers. *Journal of reproduction and fertility*, Cambridge, v. 101, n. 3, p. 547- 555, 1994.

STRINGFELLOW, D.; SEIDEL, S. (Eds.). Manual of the International Embryo Transfer Society., Savoy, IL: 1998.

TAKEDOMI, T.; AOYAGI, Y.; KONISHI, M.; KISHI, H.; TAYA, K.; WATANABE, G.; SASAMOTO, S. Superovulation of Holstein heifers by a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyvinilpirrolidone. *Theriogenology* 43; 1259-1288. Elsevier Science Inc. 1995.

TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; PIRES, M. F. A.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A.; RAMOS, A. A.; FOLHADELLA, I. M.; POLISSENI, J.; FREITAS, C.; CLEMENTE, C. A. A.; SÁ FILHO, M. F.; SOUZA, A. H.; MARTINS, C. M.; BARUSELLI, P. S. Efeito do estresse calórico na ciclicidade ovariana de doadoras *Bos indicus* sob regime de opu-piv. *Acta Scientiae Veterinariae* 35(Supl. 3): 2007.

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

VAN DE LEEMPUT, E.; VOS, P.; HYTTEL, P.; VAN DEN HURK, R., BEVERS, M.; VEN DER WEIJDEN, G.; DIELEMAM, S. Effect of bried postponement of the preovulatory LH surge on ovulation rates and embryo formation in eCG/prostaglandin- treated heifers. *Theriogenology*, v. 55, p. 573, 2001.

VARAGO, F.; MENDONÇA, L.; LAGARES, M. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Revista Brasileira de reprodução animal*, v. 32. n. 2, p. 100- 109. 2008.

VOS, P. et al. Does postponement of preovulatory LH surge on ovulation rates and embryo yield in super ovulated Holstein heifers. *Theriogenology*, v. 43, p. 344, 1995.

WALKER, D.; CAMPOS-CHILLON, L. E.; SEIDEL, G. Vitrification of in vitro-produced bovine embryos by addition of Ethylene Glycol in one-step. *Reproduction of domestic animal* 41, p. 467- 471. 2006.

WANDJI, S. A.; FORTIER, M. A.; SIRARD, M. A. Differential response to gonadotropins and prostaglandin E2 in ovarian tissue during prenatal and posnatal development in cattle. *Biol Reprod.* 46 :1034-1041 1992

WENZEL, J. W.; SREE BALAJI, K. S.; KOUSHIK, K.; NAVARRE, C.; DURAN, S.; RAHE, C.; KOMPELLA, U. Pluronic F127 gel formulations of deslorelin and

GnRH reduce drug degradation and sustain drug release and effect in cattle. Journal of controlled release, vol 85, Issues 1-3. 2002.

www.tecnopec.com.br. Novo Protocolo de Superovulação em Tempo Fixo (SOVTF) Zebuínas. 2008.

www.tecnopec.com.br . Manual técnico sobre sincronização e inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bovinos. 2008.

YU, L E.; DING, J. Injectable hydrogels as unique biomedical materials. Chemical society Reviews. 2008, 37, 1473- 1481.

ZHAO, Lili. Síntese e caracterização do copolímero tri bloco anfifílico biodegradável poli (L,L- lactideo- stat- ϵ - caprolactona)- bloco- poli (óxido de etileno)- bloco- poli-(L,L- lactideo- stat- ϵ - caprolactona). Tese de Mestrado em Engenharia Metalúrgica, universidade de São Paulo. 2007.