

UFRRJ
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ZOOTECNIA

DISSERTAÇÃO

**Efeito do método de sincronização da onda folicular
na resposta superovulatória em bovinos**

Joaquim Esquerdo Ferreira

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**EFEITO DO MÉTODO DE SINCRONIZAÇÃO DA ONDA FOLICULAR
NA RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA EM BOVINOS**

JOAQUIM ESQUERDO FERREIRA

Sob a orientação do Professor
Marco Roberto Bourg de Mello

e Co-orientação do Professor
Helcimar Barbosa Palhano

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre em Ciências** no
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, Área de Concentração
em Produção Animal

Seropédica, RJ
Março de 2012

636.208245

F383e

T

Ferreira, Joaquim Esquerdo, 1987-

Efeito do método de sincronização da onda folicular na resposta superovulatória em bovinos / Joaquim Esquerdo Ferreira - 2012.

33 f. : il.

Orientador: Marco Roberto Bourg de Mello.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Zootecnia.

Bibliografia: f. 24-33.

1. Bovino - Reprodução - Teses. 2. Bovino - Transferência de embriões - Teses. 3. Ovulação - Regulação - Teses. I. Mello, Marco Roberto Bourg de, 1971-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

Bibliotecário: _____

Data: ___/___/___

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

JOAQUIM ESQUERDO FERREIRA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de Concentração em Produção Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 02/03/2012



Marco Roberto Burg de Mello. Dr. UFRRJ
(Orientador)



Vera Lúcia Teixeira de Jesus. Dr.^a. UFRRJ



Raquel Varella Serapião. Dr.^a. PESAGRO

BIOGRAFIA

JOAQUIM ESQUERDO FERREIRA, filho de Adilson José de Souza Ferreira e Rita Luzia Esquerdo Ferreira, nasceu em 14 de maio de 1987, na cidade de Leopoldina, estado de Minas Gerais. Cursou a 5ª e a 6ª series do ensino fundamental na Escola Municipal de São Domingos, em Santo Antônio do Aventureiro, Minas Gerais, entre os anos de 1998 e 1999; e a 7ª e 8ª series do ensino fundamental na CNEC, em Além Paraíba, Minas Gerais, entre os anos de 2000 e 2001; o ensino médio foi cursado na CNEC, em Além Paraíba, Minas Gerais, entre os anos de 2002 e 2004.

Ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em maio de 2005, concluindo o mesmo curso em dezembro de 2009.

Fez estágio no Departamento de Reprodução e Avaliação Animal do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no período de julho de 2008 a março de 2010, sob a orientação do Professor Doutor Marco Roberto Bourg de Mello.

Participou de projetos de pesquisa e publicações na área de Reprodução Animal, com ênfase nas áreas de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução em Bovinos, assim como cursos e eventos científicos realizados na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e externamente.

Ingressou no Programa de Pós-graduação em Zootecnia, nível Mestrado, na área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob a orientação do professor Doutor Marco Roberto Bourg de Mello, em março de 2010, sendo bolsista da CAPES.

*O único lugar onde o sucesso vem antes do
trabalho é no dicionário!*

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

*Ao meu avô paterno Gastão Ferreira (in memoriam)
Sua trajetória de luta, seu princípio de trabalho, sua
integridade e honestidade habitam meus
pensamentos, guiam meus passos e iluminam meus
caminhos.*

*Aos meus pais Adilson José de Souza Ferreira e Rita
Luzia Esquerdo Ferreira, ao meu irmão Adilson
Esquerdo Ferreira e ao meu grande amigo e
orientador Marco Roberto Bourg de Mello.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre presente comigo nesta longa caminhada e guiando meu caminho, sempre em meu coração, por permitir que eu chegasse até aqui e por colocar tantas pessoas especiais em minha vida, as quais serão citadas a seguir;

Ao Professor Dr. Marco Roberto Bourg de Mello, pela orientação, por me levar sempre ao norte, pela amizade, pela irmandade, pelo estímulo, pelos conselhos, pelo exemplo, pelas longas conversas, pelo apoio profissional pela confiança depositada em mim e, principalmente, pelo exemplo de humildade, integridade e profissionalismo;

Ao Professor Dr. Helcimar Barbosa Palhano do DBA/IB/UFRRJ pela orientação, amizade, estímulo, conselhos e exemplos dados;

À minha mãe Rita, ao meu pai Adilson e ao meu irmão Dilsim, por sempre acreditarem em mim, pelo apoio incondicional, pelo carinho e a paciência que sempre tiveram comigo, por compreender a ausência neste período, além de compartilhar comigo não só os momentos alegres, mas também os momentos tristes;

Ao meu avô Newton, minhas avós Lucia e Maria, meus tios Aleilson, Dindinha, Fátima, Agilson, Denir, Dudu, Cristina, Aldiléia e Admilson e ao meu padrinho Jorge pelo carinho.

À Ana Paula Toledo Barbosa da Silva, amiga do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária/UFRRJ, pelas idéias sobre reprodução, pelos conselhos, incentivos e ótima convivência, além de ajudar na realização do experimento e na elaboração da dissertação;

À Valéria da Silva Ferreira e Raquel Rodrigues da Costa Mello amigas do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia/UFRRJ, pelas conversas sobre reprodução, pelos conselhos, incentivos e ótima convivência, além de ajudarem na realização do experimento e na elaboração da dissertação;

Aos amigos Bernardo Janella, Beatriz Cardoso, Leandro Mascarenhas, Pedro “Piquete” Pereira e Lara Silenciato, estagiários do Setor de Reprodução Animal da UFRRJ: pela enorme ajuda na execução de toda parte experimental deste projeto;

À família 327 da UFRRJ por me acolherem neste longo período e sempre me apoiarem;

À Isabela Leite, por me ajudar na realização do experimento, nos estudos e nas várias traduções do inglês, pelo apoio, pelas conversas e pela confiança depositada em mim;

Ao Dr. Sérgio Camargo Trabali Filho, da PESAGRO-RIO pela análise estatística dos resultados, pela ajuda na formatação final da dissertação e pelo apoio profissional;

Ao grande amigo e professor Dr. Pedro Antônio Muniz Malafaia, pelo apoio, pelos conselhos e o grande exemplo profissional;

Aos funcionários da PESAGRO-RIO, e em especial ao Sr. Carlos Machado Ribeiro (Carlão) pela enorme contribuição na execução do experimento com o manejo dos animais, cumprimento dos horários, profissionalismo, pelas longas conversas e por acreditar em mim e estar sempre disponível a ajudar;

Aos professores e aos funcionários do Setor de Reprodução Animal do Instituto de Zootecnia da UFRRJ em especial ao Prof. José Eugênio Trés, Prof. Júlio César Ferraz Jacob e à Profa. Vera Lúcia Teixeira de Jesus pela contribuição e convívio durante todo este período;

Ao M.Sc Pedro Afonso de Prealux Moreira Alves, da PESAGRO-RIO, pelo apoio profissional e pela ajuda na realização do experimento;

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela oportunidade de realização do curso;

À PESAGRO RIO pela disponibilização dos animais e instalações para a realização do experimento;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo;

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelos recursos financeiros para a execução deste trabalho;

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

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

FERREIRA, Joaquim Esquerdo. **Efeito do método de sincronização da onda folicular na resposta superovulatória em bovinos.** 2012. 33p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Embora a transferência de embriões bovinos seja uma técnica amplamente empregada em todo o mundo, a variabilidade da resposta de doadoras ao tratamento superovulatório ainda é uma importante limitação. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do método de sincronização da onda folicular na resposta superovulatória de doadoras de embrião Girolando. Para tanto, sete vacas e cinco novilhas, previamente selecionadas (em função do histórico reprodutivo, condições sanitária, nutricional e trato reprodutivo sem anormalidades anatômicas) foram aleatoriamente distribuídas em três tratamentos de acordo com o método de sincronização da onda folicular previamente à superovulação: i) sincronização com GnRH; ii) sincronização com implante de progestágeno e aplicação de Benzoato de Estradiol; iii) sem sincronização (observação do cio base - Grupo Controle). Depois de submetidas ao tratamento para sincronização da onda folicular, as doadoras foram superovuladas com oito subdoses decrescentes de FSH, aplicadas duas vezes ao dia, por via intramuscular profunda (IM), com intervalos de 12 horas a cada aplicação, somando 133 mg por animal. A primeira inseminação foi realizada 12 horas após a aplicação do indutor da ovulação (GnRH) e a segunda inseminação realizada 12 horas após a primeira. A resposta superovulatória foi avaliada com auxílio de um aparelho de ultrassom (MINDRAY D2200 VET) para quantificar o número de corpos lúteos presentes nos ovários no dia da coleta assim como pelo número e qualidade dos embriões recuperados. Foi observado que a categoria animal e o grau de sangue influenciaram a resposta superovulatória ($p < 0.05$). As novilhas apresentaram uma maior resposta ao tratamento superovulatório (100% de resposta em todos os tratamentos) quando comparadas às vacas que apresentaram 85,7%, 57,1% e 57,1% de resposta superovulatória para os grupos cio base, GnRH e P4+BE, respectivamente. O grupo genético (grau de sangue) também mostrou influência na resposta superovulatória ($p < 0.05$) sendo que os animais 3/8 responderam melhor ao tratamento superovulatório do que os animais 3/4. Os tratamentos de sincronização da emergência da onda folicular não apresentaram diferenças na resposta superovulatória ($p > 0.05$), nas estruturas recuperadas e nas estruturas viáveis. Desta forma, conclui-se que os tratamentos de sincronização da onda folicular com GnRH ou com P4+BE podem ser utilizados em doadoras Girolando com a mesma eficiência do cio base. Além disso, conclui-se também que novilhas Girolando respondem melhor ao tratamento superovulatório do que vacas assim como as doadoras de grau de sangue 3/8 quando comparadas as 3/4.

Palavras-chave: Girolando, Transferência de Embrião, Emergência Folicular.

ABSTRAT

FERREIRA, Joaquim Esquerdo. **Effect of synchronization method of follicular wave on bovine superovulatory response**. 2012. 33p. Dissertation (Master of Science in Animal Science). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Although the bovine embryo transfer is a technique widely used around the world, the variability of donor response to superovulatory treatment is still an important limitation. The objective of this study was to evaluate the effect of the synchronization method of follicular wave on superovulatory response of bovine embryo donors. For this, seven Girolando cows and five Girolando heifers previously selected (depending on the reproductive history, sanitary conditions, nutritional and reproductive tract without anatomical abnormalities) were randomly assigned to three treatments according to the synchronization of follicular wave before the superovulation: i) synchronization with GnRH ii) synchronization with progestagen implant and application of estradiol benzoate iii) without synchronization (based on estrus detection - Control Group). After submitted to the treatment for synchronization of follicular wave, the donors were superovulated with eight decreasing FSH doses, applied twice daily by deep intramuscular injection (IM) with intervals of 12 hours for each application, with a total dose of 133 mg for each animal. The first insemination was conducted 12 hours after application of ovulation inducer (GnRH) and the second insemination conducted 12 hours after the first. The superovulatory response was measured with an ultrasound device (MINDRAY D2200 VET) to quantify the number of corpus luteum present in the ovaries on the day of embryo flushing and also assessed the number and quality of embryos recovered. It was observed that animal category and crossbred influenced the superovulatory response ($p < 0.05$). The heifers showed a higher response to superovulatory treatment (100% of response in all treatments) when compared to cows had showed 85.7%, 57.1% and 57.1% of superovulatory response to estrus based group, GnRH and P4+EB, respectively. The genetic group (crossbred) also showed influence on superovulatory response ($p < 0.05$) since the 3/8 animals responded better than 3/4 animals. The treatments for follicular wave emergence synchronization did not show differences for superovulatory response ($p > 0.05$), recovered structures and viable structures. So, we conclude that the treatments for follicular wave synchronization with GnRH or P4+BE can be used in Girolando donors with same efficiency of estrus based group. Besides, we conclude also that Girolando heifers have better superovulatory response than cows as well as 3/8 crossbred donors.

Keywords: Girolando, Embryo Transfer, Follicular Emergence.

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

ABCZ	Associação Brasileira de Criadores de Zebu
BE	Benzoato de Estradiol
BI	Blastocisto Inicial
BL	Blastocisto
BSA	Albumina Sérica Bovina
BX	Blatocisto Expandido
CL	Corpo Lúteo
eCG	Gonadotrofina Corinica Equina
EPE	Extrato de Pituitária Equina
FD	Folículo Dominante
FS	Folículo Subordinado
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
FSHO	Extrato de Pituitária Ovina
GnRH	Hormônio Liberador de Gonodotrofina
hCG	Gonadotrofina Corinica Humana
hMG	Gonadotrofina de Mulheres em Menopausa
IA	Inseminaao Artificial
IATF	Inseminaao Artificial em Tempo Fixo
IETS	Sociedade Internacional de Transferência de Embriões
IGF	Fator de Crescimento Semelhantes  Insulina
IGFBP	Proteínas de Ligao de Fator de Crescimento Semelhantes  Insulina
IM	Intramuscular Profunda
LH	Hormônio Luteinizante
MC	Mórula Compacta
MI	Mórula Inicial
P ₄	Progesterona
PBS	Soluo Tamponada com Fosfato
PESAGRO-RIO	Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro
PGF2 α	Prostaglandina F2alfa
SBTE	Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões
SOV	Superovulao
TE	Transferência de Embriões

LISTA DE TABELAS, QUADROS E FIGURAS

Tabela 1. Resposta superovulatória de novilhas e vacas Girolando de acordo com o tratamento empregado para sincronização da onda folicular.	19
Tabela 2. Média de corpos lúteos, total de estruturas e embriões viáveis por doadora de acordo com o tratamento de sincronização da onda folicular.	20
Tabela 3. Média de corpos lúteos, total de estruturas e embriões viáveis por doadora de acordo com o grupo genético.....	22
Quadro1. Delineamento experimental.	18
Figura 1. Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO). Área de Bovinos de Leite do Centro Estadual de Pesquisa em Agricultura Orgânica, Seropédica/RJ.	13
Figura 2. Doadoras de embriões da raça Girolando.....	14
Figura 3. Protocolo de superovulação das doadoras do grupo controle (Grupo 1).....	15
Figura 4. Protocolo de superovulação das doadoras do grupo implante de progestágeno + Benzoato de Estradiol (Grupo 2).....	15
Figura 5. Protocolo de superovulação das doadoras do grupo GnRH (Grupo 3).	16
Figura 6. Avaliação da resposta superovulatória realizada com aparelho ultrassonográfico (MINDRAY D2200 VET).....	16

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Fisiologia do Ciclo Estral	3
2.2 Dinâmica Folicular em Bovinos	4
2.2.1 Fase Pré antral.....	4
2.2.2 Fase Antral.....	5
2.2.3 Ovulação e Formação do Corpo Lúteo.....	8
2.3 Sincronização da Onda Folicular	8
2.4 Superovulação em Bovinos	10
2.4.1 Histórico e Panorama da Superovulação em Bovinos	10
2.4.2 Fatores que Influenciam a Resposta Superovulatória	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Local e período do experimento	13
3.2 Animais.....	13
3.3 Tratamentos para sincronização da onda folicular.....	14
3.4 Manejo reprodutivo e nutricional.....	14
3.5 Tratamento superovulatório.....	14
3.6 Avaliação da resposta superovulatória	16
3.7 Coleta, manipulação e avaliação dos embriões	17
3.8 Delineamento experimental	17
3.9 Análise estatística.....	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5 CONCLUSÕES	23
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

1 INTRODUÇÃO

A transferência de embriões (TE) é uma biotécnica que permite recolher embriões de uma fêmea doadora, transferindo-os para fêmeas receptoras as quais levarão a gestação a termo. Apesar da necessidade da utilização de procedimentos sofisticados para a implantação de um programa de TE, trata-se de uma técnica mundialmente conhecida, porém, a variabilidade da resposta de doadoras ao tratamento superovulatório ainda é uma importante limitação. Em bovinos, a primeira TE foi realizada somente em 1951 na Universidade de Cornell, Estados Unidos (WILLETT et al, 1951). A TE teve grande expansão a partir da década de 70 com a criação da IETS (Sociedade Internacional de Transferência de Embriões) no Colorado - EUA. No Brasil, somente a partir da década de 80, é que esta técnica foi realmente difundida, principalmente depois da criação, em 1985, da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões (SBTE), atualmente chamada de Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. A importância básica da TE para a produção animal consiste na possibilidade de uma fêmea produzir um número de descendentes superior ao que seria possível obter fisiologicamente durante sua vida reprodutiva, sendo desta forma comparada à técnica da Inseminação Artificial, mas na versão feminina. Além disso, esta biotécnica permite equacionar problemas de ordem genética e sanitária, contribuindo também para os conhecimentos de fisiologia, patologia e endocrinologia decorrente da relação entre embrião, órgãos genitais e sistema nervoso central. A TE também fornece base técnica para realizar a implementação de outras biotécnicas afins, como a produção de clones e de animais transgênicos, além da bipartição embrionária, sexagem de embriões, análise do genoma e criopreservação de embriões. Portanto, trata-se de uma importante ferramenta biotecnológica para o melhoramento zootécnico, pois acelera e confere maior precisão ao processo de seleção animal (BARUSELLI et al., 2000).

Segundo o último relatório da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE, 2011), apesar da crescente produção brasileira de embriões *in vitro* (208.904) a produção de embriões *in vivo* apresentou uma queda significativa (42.383) em 2009 (STROUD; BÓ, 2011), o que demonstra uma redução das superovulações neste ano. Esses resultados mostram que o Brasil, assim como outros países, está diminuindo a produção de embriões *in vivo* e aumentando a produção de embriões *in vitro*. E ainda, os protocolos básicos de superovulação que dependem do cio base ainda apresentam algumas limitações como: a necessidade de detecção de cio; a necessidade de iniciar o tratamento superovulatório em momento específico do ciclo estral; a impossibilidade de programar várias coletas em um mesmo dia; a inconsistência dos resultados e ainda, o fato de 20 a 30% das doadoras não responderem ao tratamento superovulatório (BARUSELLI et al., 2006).

Embora a TE seja uma técnica amplamente empregada em todo o mundo, a variabilidade da resposta ao tratamento superovulatório continua sendo uma importante limitação. Essa variabilidade pode ser minimizada levando em consideração os conhecimentos das funções e fisiologia ovarianas. Em bovinos, recentes protocolos para o controle da dinâmica folicular e luteínica permitem iniciar o tratamento superovulatório em momento pré-determinado. A aspiração folicular guiada por ultrassonografia (início do tratamento superovulatório 1 a 2 dias após) e o tratamento com estrógeno e progestágeno (início do tratamento superovulatório 4 dias após) têm sido amplamente utilizados em protocolos de superovulação, com produção embrionária equivalente a doadoras superovuladas com o sistema tradicional (início do tratamento superovulatório 8 a 12 dias após o cio base (BÓ et al., 2004).

A variabilidade na resposta das doadoras ao tratamento superovulatório com gonadotrofinas continua sendo um dos maiores problemas nos programas comerciais de TE (MAPLETOFT et al., 2002; BARROS; NOGUEIRA, 2004; BARUSELLI et al., 2006). Esta variação individual ao tratamento superovulatório foi relatada tanto em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*; BARUSELLI et al., 2003), quanto em vacas Holandesas de alta produção (*Bos taurus taurus*; MARTINS, 2005).

Alternativas para o controle da emergência da onda de crescimento folicular em momento aleatório do ciclo estral, sem a necessidade de detecção do estro para o estabelecimento do “cio base”, podem facilitar o manejo de doadoras tanto *Bos taurus taurus* quanto *Bos taurus indicus*, bem como aumentar a eficiência dos programas de transferência de embriões (BARUSELLI et al., 2006; BO et al., 2006). Neste sentido, a sincronização da onda folicular seria de grande importância para otimizar os protocolos atuais usados para superovulação de doadoras que além de facilitar o manejo com esses animais proporcionaria uma maior eficiência nos programas de transferência de embriões. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do método de sincronização da onda folicular na resposta superovulatória de doadoras de embrião bovino. Ainda buscou-se avaliar o efeito do grau de sangue e de diferentes categorias (vacas e novilhas) na resposta superovulatória de doadoras de embriões Girolando.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fisiologia do Ciclo Estral

O ciclo estral é o ritmo funcional dos órgãos reprodutivos das fêmeas de animais domésticos que se estabelece a partir da puberdade, sendo regulado por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos, principalmente pelos hormônios hipotalâmicos, as gonadotrofinas e os esteróides secretados pelos ovários. Compreende modificações cíclicas na fisiologia e na morfologia dos órgãos genitais e também no perfil dos hormônios sexuais relacionados. O ciclo estral se mostra diferente em cada espécie, onde se observa desenvolvimento e atresia dos folículos, manifestação de cio e ovulação. Pode acontecer de apenas um folículo amadurecer ou vários amadurecerem dependendo da espécie (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Os bovinos são animais poliétricos anuais (HAFEZ; HAFEZ, 2004), logo apresentam vários ciclos estrais ao longo de todo ano. A idade da puberdade nos bovinos ocorre, em média, aos doze meses de idade. O estro na vaca dura em média 18 horas e a ovulação ocorre entre 10 a 12 horas após o final do mesmo (AIELLO, 2001). Em fêmeas bovinas, o ciclo estral varia de 17 a 25 dias, sendo os intervalos médios de 20 dias para novilhas e 22 dias para vacas (SIROIS; FORTUNE, 1988).

O ciclo estral nos bovinos compreende quatro etapas, que são: proestro, estro, metaestro e diestro, sendo que também pode ser dividido em duas fases distintas, de acordo com o predomínio dos hormônios estrógeno (fase folicular) ou progesterona (fase luteal). A primeira fase, chamada de folicular ou estrogênica, que se estende do proestro ao estro, se caracteriza pelo desenvolvimento do folículo, estrutura ovariana na qual se desenvolve o oócito, e culmina com a liberação do mesmo (ovulação), predominando a produção e secreção do hormônio estrógeno (17- β estradiol). A segunda fase, denominada de fase luteínica ou progesterônica, que compreende o metaestro e o diestro, se caracteriza pelo desenvolvimento do corpo lúteo (CL), sendo a fase em que predomina a produção e secreção do hormônio progesterona (P4), que é o hormônio responsável pelo estabelecimento e manutenção da gestação, sendo o término desta fase caracterizado pela luteólise (REIS, 2004). O proestro é o período de desenvolvimento folicular, que é subsequente à regressão lútea e termina no estro que é o período de receptividade sexual; metaestro é o período do desenvolvimento inicial do CL e diestro é o período da fase madura do CL (CUNNINGHAM, 1999).

Caso tenha ocorrido a concepção, o embrião implantado no endométrio irá estimular a síntese de uma proteína chamada trofoblastina ou interferon Tau que será responsável pela manutenção do CL durante a gestação. A produção desta substância inicia-se entre o 15° e o 17° dia de gestação, considerado o período crítico da gestação, e mantém-se elevada até o 22° dia, aproximadamente, garantindo assim a manutenção do CL por todo o período gestacional. Caso não ocorra a concepção após o estro, poderá ser observado ao final do diestro (17° dia do ciclo) um rápido declínio dos níveis plasmáticos de P4 em função da lise do CL desencadeada pela síntese da prostaglandina no endométrio. Paralelamente, se desfaz o bloqueio do eixo hipotalâmico-hipofisário, podendo-se observar um aumento gradativo das concentrações dos hormônios folículo estimulante e luteinizante (respectivamente, FSH e LH), dando início ao período de pró-estro, que dura aproximadamente três dias, terminando com o estabelecimento de um novo estro (PALHANO, 2008).

2.2 Dinâmica Folicular em Bovinos

O crescimento folicular na espécie bovina exhibe padrão contínuo de crescimento e atresia dos folículos ovarianos (MATTON et al., 1981;) que se inicia na vida fetal, passa pela puberdade (EVANS et al., 1997) e continua na vida reprodutiva até a senilidade (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Este crescimento folicular pode ser dividido em duas fases, pré antral e antral.

2.2.1 Fase Pré-antral

A ativação folicular é marcada pela transição dos folículos primordiais para folículos primários. Este fenômeno é acompanhado principalmente pela proliferação e diferenciação das células da granulosa nos folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários), onde nos folículos primordiais, o oócito é rodeado por uma camada única de células da granulosa achatadas, nos folículos primários essa camada de células da granulosa se torna cuboidal e nos folículos secundários são caracterizados por duas ou mais camadas de células da granulosa e pelo início da formação da zona pelúcida (FAIR, 2003). Nas fases subsequentes do crescimento, o volume do oócito sofre expansão e uma zona pelúcida se desenvolve entre os oócitos e as células da granulosa (VAN WEZEL; RODGERS, 1996). A maioria dos folículos ativados evolui para a fase antral, caracterizada pela formação de uma cavidade ou 'antro', em seguida a maioria desses folículos ativados regride e sofre morte celular programada (apoptose), a menos que a presença de níveis suficientemente altos FSH mudem o seu destino incluindo-os em uma onda de crescimento folicular. Pouco se sabe sobre o gatilho responsável pela ativação do crescimento folicular pré-antral (OKTEM; OKTAY, 2008).

Os folículos primordiais são caracterizados por um oócito quiescente, preso em prófase I da meiose e rodeado por um número limitado (<10) de células achatadas da granulosa. Estes folículos primordiais constituem a reserva ovariana, a partir da qual os folículos são recrutados para o desenvolvimento. Um folículo primário é caracterizado por uma camada completa de células da granulosa cubóides e é delimitada por uma lâmina basal. Sendo a hipótese mais aceita que a maioria das espécies domésticas contém um número finito de folículos primordiais, enquanto que em roedores esta reserva ovariana desenvolve nos primeiros dias pós-parto (FORTUNE, 2003)

Os mecanismos que regem a ativação dos folículos primordiais ainda devem ser elucidados (OKTEM; OKTAY 2008). Presume-se que os folículos primordiais devem primeiro atingir a meiose antes de adquirir a capacidade de ativação (YANG; FORTUNE, 2008). In vivo, o FSH é conhecido por ser crucial para o desenvolvimento folicular. No entanto, in vitro não teve efeito proliferativo evidente em células purificadas (NILSSON; SKINNER, 2001). Como os receptores de FSH no folículo primordial estão restritos as células da granulosa, desenvolveu-se a hipótese que as células da granulosa participam na regulação do crescimento do oócito (SENBON et al. 2003), por exemplo, estimulando a produção de fatores de crescimento locais (NILSSON; SKINNER, 2001).

Segundo Braw-Tal (2002), a ativação do crescimento folicular pode ser subdividida em duas fases distintas. Em primeira fase, as células da granulosa sofrem uma transformação de achatadas para cuboidal. O aparecimento das células da granulosa cuboidal não é um evento aleatório, mas é influenciado pelo número de células da granulosa presente. A segunda fase de crescimento é marcada pela proliferação do número de células da granulosa e pela expansão do volume do oócito. Nas vacas, o primeiro crescimento significativo do oócito ocorre em folículos com, pelo menos, 40 células da granulosa na maior secção transversal.

As gonadotrofinas desenvolvem importante papel na cascata de eventos de desenvolvimento folicular e possuem atividades em um nível celular controladas por fatores de modulação locais como inibina e a ativina que são secretadas pelas células da granulosa.

Em cooperação com o estradiol, a inibina atua suprimindo o FSH através de um sistema de feedback negativo na glândula pituitária. Localmente, a inibina age sensibilizando as células da teca ao LH, resultando na produção de andrógenos. A ativina estimula a proliferação de células da granulosa, induz a expressão de receptores de FSH e a produção de estrógeno (KNIGHT; GLISTER, 2001). Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) têm um efeito sinérgico na atividade da gonadotrofina (ARMSTRONG et al., 2000). O mecanismo de IGF, no entanto, é feito com a complexidade devido à existência de proteínas de ligação (IGFBP), que impedem a interação do receptor do IGF com IGFBP-proteases, que neutralizam as proteínas de ligação.

O conhecimento dos mecanismos envolvidos na regulação das populações de folículos pré-antrais poderia ser de grande valia para a eficiência reprodutiva dos animais domésticos (CECCONI, 2002).

2.2.2 Fase Antral

O acompanhamento diário das estruturas ovarianas por ultra-sonografia mostrou que os bovinos apresentam ondas de crescimento folicular durante a fase antral do ciclo estral. Vacas e novilhas podem ter duas ou três ondas por ciclo, com um folículo tornando-se dominante em cada uma delas. Por isso, uma população de pequenos, médios e grandes folículos é encontrada em cada ovário, durante todos os dias do ciclo estral (BORGES et al., 2001).

O crescimento folicular durante o ciclo estral segue uma ordem cronológica passando primeiro pelo desenvolvimento pré-antral para depois atingir a fase antral. No entanto, nem todos os folículos antrais são capazes de progredir durante o ciclo estral, sendo que a grande maioria deles se degenera (AERTS; BOLS, 2010). O destino final de mais de 99,9% dos folículos primordiais que estão presentes nos ovários ao nascimento é a degeneração (MORITA; TILLY, 1999). Em bovinos, protocolos hormonais que controlam o desenvolvimento folicular e a função lútea permitem a inseminação artificial (IA) em momento pré-determinado, potencializando a eficiência reprodutiva (BARROS; ERENO, 2004; BÓ et al., 2004; BURATINI Jr., 2006).

Na vaca a duração total do desenvolvimento dos folículos primordiais até o estágio pré-ovulatório é em torno de 180 dias (LUSSIER; MATTON; DUFOUR, 1987). Os bovinos têm dois estágios de desenvolvimento folicular durante a fase antral, uma fase de crescimento lenta e uma fase rápida (FAIR, 2003; AERTS; BOLS, 2010). A primeira fase (lenta) abrange mais de 30 dias desde a formação do antro (folículos com aproximadamente 300 µm) até o estágio de folículos pequenos (entre 3 a 5 mm de diâmetro). A segunda fase usualmente abrange cerca de cinco a sete dias e inclui a emergência de uma onda de folículos, crescimento folicular, seleção de um folículo dominante e um período de dominância variável, seguido de ovulação ou regressão do folículo pré-ovulatório (LUSSIER, MATTON; DUFOUR, 1987; AERTS; BOLS, 2010).

Os trabalhos mais consistentes sobre o estudo da dinâmica folicular na fase antral em bovinos foram realizados por exames ultrassonográficos dos ovários. O advento da ultrassonografia possibilitou estudar com maior facilidade e detalhamento o crescimento folicular, sem a necessidade de se abater os animais experimentais (PIERSON; GINTHER, 1987). Essa técnica permitiu avaliar o surgimento das estruturas ovarianas e correlacioná-las com os eventos endocrinológicos em tempo real no decorrer do ciclo estral (BARUSELLI, 1997). E ainda relacionar a quantidade de folículos recrutados por onda folicular nos animais *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, que seria de 15 a 33 e 30 a 60, respectivamente (SARTORI et al., 2010).

Estudos em bovinos demonstraram que o diâmetro máximo dos folículos durante o ciclo estral varia conforme a raça e a espécie (BARUSELLI, 1997). Trabalhos demonstraram diâmetros de folículos ovarianos inferiores para *Bos taurus indicus* (BARROS et al., 1993; RHODES; DE'ATH; ENTWISTLE, 1995), quando comparados aos de *Bos taurus taurus* (GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989a). Em *Bos taurus taurus* com duas ondas de crescimento folicular são descritos diâmetros de 17,1 mm e 16,5 mm para a primeira e segunda onda, respectivamente (MACEDO, 2008). Já em *Bos taurus indicus* os diâmetros relatados foram de 11,3 mm e 12,1 mm, respectivamente, para fêmeas da raça Nelore (FIGUEIREDO et al., 1997); e 9,5mm e 10,5mm para fêmeas da raça Gir (GAMBINI et al., 1998). Cavalieri e colaboradores (2003) encontraram redução do diâmetro do folículo dominante após o tratamento com estrógeno e progestágeno em vacas leiteiras, indicando que o protocolo para sincronização da ovulação pode interferir no diâmetro folicular.

Entre uma ovulação e outra o desenvolvimento folicular se apresenta como uma seqüência dinâmica de eventos fisiológicos que envolvem o desenvolvimento e atresia de folículos antrais que se assemelham a ondas (PIERSON; GINTHER, 1987).

Cada onda de crescimento folicular é dividida em quatro fases, sendo emergência, seleção, dominância e atresia ou ovulação (REIS, 2004). A emergência de uma onda é caracterizada por um crescimento de mais de vinte folículos pequenos que, sobre ação do FSH, iniciam o crescimento e destes folículos, apenas um continua seu desenvolvimento (folículo dominante) e os outros entraram em atresia (folículos subordinados), estabelecendo-se o fenômeno da divergência folicular (BARUSELLI et al., 2006).

Cada onda de crescimento folicular pode ser subdividida nas fases de recrutamento, seleção e dominância (LUCY et al., 1992). Sabe-se que as gonadotrofinas hipofisárias, FSH e LH, atuam na manifestação, manutenção e suspensão destes eventos (GINTHER et al., 1996; AERTS; BOLS, 2010). O recrutamento folicular foi definido como um processo dinâmico, por meio do qual um grupo de folículos inicia o desenvolvimento e maturação no ovário, estimulado pelo pico de liberação de FSH (ADAMS; MATTERI; GINTHER, 1992a) iniciando uma fase de crescimento comum por cerca de três dias (GINTHER et al., 2003; MELO, 2009). Neste momento, esses folículos apresentam aproximadamente 4 mm de diâmetro, sendo responsivos e dependentes do FSH (GINTHER et al., 2002; MELO, 2009). O número de folículos que são recrutados varia em função de diversos fatores, como raça, manejo, nutrição e idade. Nos animais *Bos taurus indicus*, são recrutados cerca de 30 folículos por onda de crescimento folicular (BARUSELLI; GIMENES; SALES, 2007).

O FSH permite que os folículos mantenham seu crescimento e proliferação celular, aumentando gradualmente sua capacidade esteroidogênica (ADAMS et al., 1992b; MELO, 2009). A regressão do folículo dominante durante a onda de crescimento, ou a ovulação no final do ciclo estral, causa uma elevação do FSH circulante. Esta regressão do folículo dominante é acompanhada pela diminuição dos níveis de hormônios sintetizados pelo folículo, tais como estrógeno e inibina, resultando em um aumento temporário na secreção de FSH pela hipófise. Em consequência, o FSH é o principal responsável pelo recrutamento de um novo grupo de folículos antrais para a próxima onda de crescimento folicular (AERTS; BOLS, 2010).

A seleção folicular é um processo no qual apenas um folículo é escolhido (FD), evitando a atresia até alcançar a ovulação, estabelecendo-se assim, o fenômeno da divergência folicular ou desvio (LUCY et al., 1992; BARUSELLI; GIMENES; SALES, 2007). A divergência folicular é definida pela diferença nas taxas de crescimento entre os dois maiores folículos, sendo marcada pela continuidade do desenvolvimento do maior folículo e declínio ou parada no crescimento dos outros (GINTHER et al., 1996). O diâmetro médio dos dois maiores folículos no início do desvio são 8,5 e 7,2 mm em novilhas *Bos taurus taurus*, e 6,2 e 5,9 mm em novilhas *Bos taurus indicus* (BARUSELLI; GIMENES; SALES, 2007).

Aparentemente, quando o maior dos folículos alcança certo estágio de crescimento, o rápido desenvolvimento do mecanismo do desvio bloqueia o crescimento do segundo maior folículo (subordinado) antes deste alcançar um diâmetro similar. Conseqüentemente, antes da seleção do folículo dominante, ocorre um processo de seleção que envolve uma ação contra os outros folículos na onda (GINTHER et al., 2003; AERTS; BOLS, 2010).

A fase de seleção do folículo dominante durante a primeira onda folicular foi observada por Ginther e colaboradores (1996), como a divergência na taxa de crescimento entre o futuro FD e o maior folículo subordinado (FS) 2,8 dias após a emergência da onda quando o futuro folículo dominante apresentou 8,5 mm de diâmetro e o maior subordinado 7,2 mm. CASTILHO; RENESTO; GARCIA (2003), estudando a seleção folicular em novilhas da raça Nelore, observaram que em média 84 horas após a ovulação o maior folículo subordinado medindo 5,5 mm cessa seu crescimento, enquanto o futuro dominante com 7,5 mm continua a se desenvolver. Nas novilhas da raça Nelore, 24 horas antes da divergência no crescimento folicular, foi observada a menor concentração plasmática de FSH. Existe uma relação funcional entre a concentração de estradiol e FSH em novilhas. O aumento ou decréscimo na concentração de estradiol no início da divergência resulta em decréscimo ou aumento, respectivamente, na concentração de FSH (KULICK, et al., 1999; GINTHER, et al., 2000). Provavelmente o responsável pela queda do FSH antes da seleção é a produção de estradiol e inibina, sobretudo pelas células da granulosa do folículo dominante, que atuam inibindo a liberação de FSH pela hipófise anterior (FINDLAY; CLARKE, 1987). As concentrações de FSH são mantidas em níveis basais até o folículo dominante da primeira onda perder sua dominância, resultando em aumento nos níveis de FSH e subseqüente emergência da segunda onda folicular (BODENSTEINER et. al., 1996). Alguns trabalhos têm demonstrado que qualquer folículo saudável ou em crescimento é capaz de se tornar dominante.

O aumento da concentração sérica de FSH, decorrente da destruição do folículo dominante após a divergência, resulta na dominância do maior folículo subordinado (GINTHER et al., 2000). Da mesma forma, um folículo aleatoriamente escolhido dentre um grupo de folículos de 5 mm, no início da onda folicular, pode ser direcionado para a dominância após a aspiração de todos os outros da onda (GIBBONS; GINTHER, 1997).

Tratamentos com FSH no início do desenvolvimento folicular estimulam muitos folículos a obterem diâmetro de dominância (ADAMS et al., 1994b), sendo à base dos protocolos de superovulação com FSH para coleta de embriões.

O exato mecanismo que diferencia e capacita um folículo a passar pelo processo de divergência e torna se o dominante, ainda não está completamente elucidado. Porém, acredita se que o sistema IGF exerça um dos papéis principais dentro deste processo, aumentando a sensibilidade do futuro folículo dominante às ações das gonadotrofinas e impedindo que isso ocorra com os subordinados (SIQUEIRA, 2007).

Ao contrário dos subordinados, o FD é capaz de produzir estrógenos mesmo em baixas concentrações de gonadotrofinas. Aparentemente, a maior quantidade de IGF-I livre no líquido folicular no momento da divergência seria o principal fator que lhe atribui tal capacidade (GINTHER et al., 2003), pois aumentaria sua sensibilidade ao FSH, permitindo a manutenção da esteroidogênese até que possa responder ao LH (SIQUEIRA, 2007). O folículo dominante em bovinos provavelmente será aquele que utilizar com sucesso ações recíprocas entre gonadotrofinas, IGF-I e estradiol visando estimular o seu crescimento e concomitantemente inibir o crescimento dos seus contemporâneos (SIQUEIRA, 2007).

2.2.3 Ovulação e Formação do Corpo Lúteo

O folículo ovulatório será formado a partir da última onda folicular do ciclo estral, sendo que folículos dominantes de ondas anteriores entram em atresia devido à presença de um corpo lúteo (CL) ativo no ovário, produzindo quantidades de progesterona adequada que inibe o pico de LH e conseqüentemente a ovulação de um folículo dominante (FD) (MELO, 2009). A progesterona exerce um efeito de retroalimentação negativa no eixo do sistema nervoso central – hipotálamo – hipófise – ovários, reduzindo a amplitude e freqüência dos pulsos de LH, o que inviabiliza os processos de maturação final do oócito, do folículo e ainda a ovulação deste folículo (GINTHER et al., 1996). Já o crescimento do folículo dominante, em ambiente com baixa concentração de progesterona, promove o aumento das concentrações de estrógenos, que desencadeia o mecanismo de retroalimentação positiva para a secreção do GnRH e o conseqüente pico de LH, seguido da ovulação (FORTUNE, 2003). Após a ovulação, as células que permanecem no folículo rompido proliferam formando o corpo lúteo, que será responsável por produzir adequadas quantidades de progesterona e manter uma gestação caso tenha ocorrido a fecundação. Sua função domina o ciclo do dia 4 ao dia 17, caso não ocorra gestação (BALL; PETERS, 2006 apud MACEDO, 2008). Em mamíferos, os pulsos pré-ovulatórios de LH são extremamente importantes para a maturação do folículo e ovulação (AERTS; BOLS, 2010). Em resposta ao surgimento do LH no meio do ciclo, prostaglandinas da série E são produzidas pelo folículo, sendo de extrema importância na ruptura do folículo e liberação do oócito (FILION et al., 2001). Além disso, sabe-se que o LH estimula e prepara as células da granulosa e teca para a luteinização (SMITH; MCLINTOSH; SMITH, 1994). As células do cumulus começam a sintetizar ácido hialurônico, o que permite a sua expansão através do alargamento do espaço entre as células da granulosa (EPPIG, 2001). Pulsos episódicos de LH são necessários para a formação do CL em bovinos, mas não são necessários para a manutenção da função luteal (AERTS; BOLS, 2010).

As freqüências dos pulsos de LH durante o ciclo estral bovino são de 9 – 16 pulsos/24 horas na fase luteal inicial; 6 pulsos/24 horas na fase luteal média e 14 – 24 pulsos/24 horas durante a fase folicular (GINTHER et al., 1998; MIHM; AUSTIN, 2002; AERTS; BOLS, 2010). O primeiro FD do ciclo estral inicia o crescimento enquanto o CL ainda está ativo e conseqüentemente secretando progesterona, com isso este CL afeta negativamente a freqüência pulsátil de LH, resultando em uma menor freqüência pulsátil na fase luteal média e atresia do FD dependente de LH. A luteólise durante a fase de dominância do segundo FD resultará na ovulação deste folículo. Contudo, se o CL permanecer ativo, a secreção de progesterona se manterá resultando na supressão de LH causando a regressão do segundo FD (AERTS; BOLS, 2010). O FD somente se beneficiará do aumento das freqüências pulsáteis de LH na fase folicular, quando ocorrerá maturação e finalmente ovulação do mesmo (MIHM; AUSTIN, 2002).

2.3 Sincronização da Onda Folicular

A emergência da onda folicular pode ser controlada mecanicamente, através da ablação folicular (BERGFELT et al., 1997) ou ainda pela manipulação farmacológica com o uso de GnRH (KOHRAM et al., 1998), LH, hCG ou estradiol associado com progestágeno (BÓ et al., 1995). De modo geral, o tratamento de eleição para a sincronização da emergência da onda folicular é o uso de estradiol associado com progestágeno, especificamente em vacas *Bos taurus indicus* por apresentarem um anestro prolongado, não respondendo de forma satisfatória ao GnRH aplicado em fase aleatória do ciclo estral (BARUSELLI et al., 2003). A eficácia do tratamento com estradiol associado com progestágeno em fases aleatórias do ciclo estral seguido com início da aplicação de FSH quatro dias mais tarde tem sido demonstrada

em vários estudos tanto em *Bos taurus taurus* (BÓ et al., 2006) como em *Bos taurus indicus* (NOGUEIRA et al., 2002). Independentemente da fase do ciclo estral, o tratamento com benzoato de estradiol junto com administração de progestágeno (implante auricular ou vaginal) induz a emergência de uma nova onda folicular sincronizada aproximadamente de três a quatro dias mais tarde (BARUSELLI et al., 2006).

Em todo mundo há relatos que indicam a baixa taxa de serviço em bovinos, devido principalmente a comprometimentos na eficiência da detecção de estros (MELO, 2009). Este problema é ainda mais destacado em rebanhos *Bos taurus indicus* ou em seus cruzamentos, devido às particularidades no comportamento reprodutivo, como estro de curta duração com elevada porcentagem de manifestação do estro durante a noite (BARUSELLI; MARQUES, 2002).

O uso de fármacos para o controle da emergência da onda folicular e ovulação, desprezando a detecção de cio, tem facilitado o manejo de doadoras e receptoras de embrião (BARUSELLI et al., 2011). Após a descoberta que os folículos ovarianos em bovinos crescem em distintos padrões de ondas, geralmente com um folículo se tornando dominante (FORTUNE et al., 1998) verificou se a possibilidade de controlar as ondas foliculares com uma única injeção de GnRH de forma aleatória em qualquer fase do ciclo estral induzindo a liberação de LH, que leva à ovulação ou luteinização deste folículo dominante $\geq 10,0$ mm (GARVERICK et al., 1980; BAO; GARVERICK, 1998; SARTORI et al., 2001). Conseqüentemente, uma nova onda folicular é iniciada 1,5 a 2 dias após a administração do GnRH, caso o folículo dominante tenha ovulado ou luteinizado em resposta a esta aplicação de GnRH (TWAGIRAMUNGU et al., 1995).

Apesar dos protocolos de sincronização de estro que utilizam estradiol e progestágeno serem efetivos em sincronizar os estros e as ovulações, estas são distribuídas em um intervalo de aproximadamente 48 horas, o que compromete os resultados de uma inseminação em tempo fixo. Por esse motivo, foram incorporados indutores da ovulação a esses protocolos. Os fármacos utilizados para a indução da ovulação agem por retroalimentação positiva na liberação pulsátil de LH (estrógenos e GnRH) ou agem diretamente nos receptores de LH das células da granulosa dos folículos (hCG e LH). Os indutores da ovulação, quando administrados isoladamente, não são capazes de sincronizar adequadamente a ovulação para inseminação em tempo fixo. No entanto, quando associados aos tratamentos com progestágenos, o estradiol e a PGF 2α , induzem a ovulação sincronizada do FD presente no final do tratamento, possibilitando o emprego da inseminação artificial em tempo fixo (BARUSELLI, 2004).

O tratamento com Benzoato de Estradiol (BE) promove a liberação de um pico de LH dentro de um intervalo de 16 a 30 horas (LAMMOGLIA et al., 1998). A administração de GnRH induz um pico de LH que se inicia em torno de 15 minutos após sua aplicação. Da mesma forma, os fármacos que agem diretamente nos receptores de LH (hCG e LH) têm sua ação estabelecida logo após a absorção (MELO, 2009).

Estudos recentes têm sido realizados para avaliar métodos para a manipulação do ciclo estral bovino com intuito de sincronizar a emergência de uma nova onda folicular, pois, pesquisas têm mostrado que a resposta superovulatória é maior quando o tratamento é iniciado precisamente no momento da emergência da onda folicular ao invés de um ou dois dias depois (NASSER et al., 1993; ADAMS et al., 1994). Protocolos de superovulação que são independentes da detecção do estro são de extrema importância especialmente quando se trabalha com *Bos taurus indicus* ou ainda quando se trabalha com *Bos taurus taurus* de alta produção, devido as dificuldades inerentes à detecção de estro nesses animais (LOPEZ et al., 2005; BARUSELLI et al., 2006). Para tanto, têm sido utilizados diferentes métodos, como remoção mecânica do folículo dominante (BERGFELT et al., 1997) e métodos farmacológicos como o uso de GnRH (PURSLEY; MEE; WILTBANK., 1995) e a utilização

de estrógeno associado a progestágenos (BÓ et al., 1995a). Porém o emprego de progesterona ou progestágenos em doses elevadas pode suprimir o suporte de LH para o folículo dominante e induzindo assim atresia deste folículo (THATCHER et al., 2001). E ainda o LH excessivo durante o tratamento de superovulação causa a ativação prematura dos oócitos. Em vacas superovuladas com FSH, a alta concentração de LH resultou em baixa fecundação (BÉNYEI; BARROS, 2000).

Com base em estudos anteriores, alguns protocolos foram desenvolvidos mostrando que a resposta ovulatória ao GnRH poderia ser otimizada com a administração de uma dose de prostaglandina que promoveria a regressão do corpo lúteo no momento da inserção do implante de progestágeno, levando ao surgimento de uma nova onda folicular um a dois dias após a aplicação do GnRH (SMALL et al., 2009)

O tratamento superovulatório deve ser realizado no começo de uma onda folicular, antes da seleção do folículo dominante, para obter-se a melhor resposta possível (BÓ et al., 2002).

2.4 Superovulação em Bovinos

Atualmente inúmeras pesquisas têm sido conduzidas na América do Sul envolvendo os aspectos fisiológicos da superovulação em programas de transferência de embrião. Nestes estudos os autores tem focado na redução do manejo dos animais e ainda na melhora da eficiência dos protocolos, utilizando GnRH ou estradiol associado com dispositivos de progestágenos para sincronização da onda folicular e ovulação tanto em gado *Bos taurus taurus* como *Bos taurus indicus* (BÓ et al., 2006; BARUSELLI et al., 2010; BARROS et al., 2010; BÓ et al., 2010).

2.4.1 Histórico e Panorama da Superovulação em Bovinos

Denomina-se superovulação ao aumento do número fisiológico de ovulações próprias da espécie provocado mediante a administração de gonadotrofinas. Em bovinos, considera-se que houve resposta ao tratamento superovulatório quando mais de duas ovulações são induzidas. A superovulação deve complementar-se com um regime ótimo de inseminação artificial, utilizando sêmen de boa qualidade (CABODEVILA; TORQUATI, 2001).

Donaldson (1984), em um estudo com 1263 doadoras, demonstrou que 68% das fêmeas superovuladas produziram embriões transferíveis e nas outras 32% foi observado que 7% não responderam; 7% não produziram nenhuma estrutura; 17% não produziram embriões transferíveis e 1% apresentaram cio antes da aplicação de PGF2alfa. A primeira transferência de embriões (TE) realizada em bovinos com sucesso foi em 1951, na Universidade de Cornell, Estados Unidos, com o pesquisador Willet et al (HAFEZ e HAFEZ, 2004) e a partir da década de 70 a técnica começou a ser utilizada comercialmente (NELSON; NELSON, 2001). Atualmente, a coleta por lavagem uterina através do cateter transcervical é mundialmente difundida permitindo que o número de descendentes de uma fêmea seja muito superior ao produzido fisiologicamente durante sua vida, promovendo uma seleção mais intensa nas fêmeas (MARTINS, 2007).

A TE apresenta-se como uma biotécnica de grande potencial para a seleção e a proliferação de animais geneticamente superiores, visto que em bovinos, dos aproximadamente 200.000 oócitos primordiais presentes no ovário de uma fêmea no momento de seu nascimento, poucos resultam naturalmente numa cria, principalmente devido às limitações de caráter biológico, tais como: intervalo de partos prolongado; gestações

simples, raramente gemelar; fatores ambientais, nutricionais, sanitários e econômicos (BARUSELLI et al., 2000).

Apesar da TE ser uma biotécnica de grande importância para disseminação da alta qualidade genética, existe uma contínua necessidade de simplificar os protocolos de superovulação, principalmente diminuindo o número de manejos das doadoras e controlando a emergência da onda folicular desprezando a detecção do estro (BARUSELLI et al., 2011).

2.4.2. Fatores que influenciam a Resposta Superovulatória

Apesar do crescimento eminente da TE alguns problemas ainda persistem. A variabilidade na resposta ao tratamento superovulatório com gonadotrofinas exógenas tem sido relatada tanto em *Bos taurus indicus* quanto em *Bos taurus taurus* (MARTINS, 2007), sendo este um dos maiores problemas enfrentados pelos veterinários que atuam na área, pois 20 a 30% das vacas superovuladas não respondem ao tratamento (BARUSELLI et al., 2006).

A variabilidade na resposta ovariana tem sido relacionada a diferenças nos tratamentos, como preparação, grupo e dose da gonadotrofina usada; duração e sincronismo do tratamento e o uso de hormônios além do FSH no protocolo. Fatores inerentes ao animal e seu ambiente parecem ser as fontes mais importantes de variabilidade. Estes fatores podem incluir a condição nutricional, histórico reprodutivo, idade, estação do ano, condição ovariana no início do tratamento e os efeitos de repetidas superovulações (MAPLETOFT; STEWARD; ADAMS, 2002). Segundo Baruselli et al (2011), há ainda diferenças entre vacas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* em relação a fisiologia reprodutiva, não podendo assumir assim, a certeza de alcançar respostas semelhantes.

A alta variabilidade de respostas aos tratamentos gonadotróficos tem motivado a realização de estudos com a finalidade de formular protocolos com capacidade de estabilizar e racionalizar os programas de superovulação (ANDRADE et al, 1999).

Alguns fatores muito importantes agem na variação da resposta ovariana, tais como o tratamento com gonadotrofinas por protocolo, a condição ovariana e o tempo de tratamento com gonadotrofinas (ALVAREZ et al., 2000).

Diferentes fontes hormonais têm sido utilizadas para a superovulação em bovinos, entre estas estão o FSH e a eCG. Atualmente a mais utilizada é o FSH, pelo fato de apresentar respostas mais consistentes. No mercado existem dois principais produtos comerciais à base de FSH, o Folltropin-V® (Bioniche Animal Health) e o Pluset® (Hertape-Calier). O primeiro é considerado FSH purificado, pois não contém LH em sua composição. Já o segundo contém a mesma concentração de LH/FSH. A eCG é uma glicoproteína produzida pelos cálices endometriais e se comprova biologicamente ativa entre os dias 35 e 140 da gestação da égua. A eCG permite que se consiga uma resposta superovulatória com apenas uma dose entre os dias 8 e 12 do ciclo estral. No entanto, sua permanência prolongada no sangue provoca um crescimento folicular disperso, com altos níveis de estrógeno, que afeta tanto a taxa de fertilização como a qualidade embrionária. A eCG também induz uma resposta imunológica, com produção de anticorpos anti-eCG, o que determina para tratamentos superovulatórios subsequentes, um aumento na dose para que se obtenha o mesmo efeito (BARUSELLI et al., 2008).

Bindon e Piper (1977) utilizaram um soro anti-eCG para eliminar os efeitos deste hormônio. O momento mais apropriado para administrar este soro é logo após o pico pré ovulatório de LH. Na prática, é administrado no momento da primeira inseminação artificial.

Donaldson (1984) relatou que a neutralização da eCG poucas horas após o pico de LH sincroniza a maturação folicular e sincroniza mais o momento das ovulações múltiplas. O hormônio mais usado em programas de TE é o FSH-p, com o qual o tratamento é feito através de duas doses diárias durante quatro dias consecutivos, começando a superovulação entre os

dias oito e doze do ciclo estral. Outros hormônios que comprovaram causar superovulação, mesmo sendo pouco utilizados são: EPE (extrato de pituitária equina), FSH-O (extrato de pituitária ovina) e uma gonadotrofina isolada da urina de mulheres em menopausa (hMG).

A variação do número de embriões após diferentes tratamentos superovulatórios tem sido atribuída a fatores individuais, uma vez que após tratamentos superovulatórios idênticos, as respostas (número de embriões produzidos) são altamente variáveis. Em relação às concentrações do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) presentes no extrato pituitário comumente usado para estimular a resposta ovulatória, alguns autores encontraram melhores resultados em preparações com baixa concentração de LH, salientando que as altas concentrações de LH causam ovulação prematura ou luteinização de folículos ocasionando baixa resposta superovulatória (VISINTIN et al., 1999).

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

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

Carvalho et al (2008) superovularam vacas Red Sindi com três doses de FSH (Folltropin-V®), 100; 133 e 200 mg e avaliaram a resposta ao tratamento pelo número de corpos lúteos. Verificou-se que não houve diferença estatística entre as três doses, mostrando ser possível a superovulação mesmo com baixa dose de FSH. Porém, foi encontrada uma baixa taxa de recuperação embrionária, ou seja, os animais apresentavam boa resposta ao tratamento, mas o número de estruturas coletadas era muito baixo.

Contudo, a variabilidade na resposta aos protocolos de superovulação, o tempo e o esforço necessários para administrar os tratamentos têm afetado a aplicação generalizada de transferência de embriões em programa de melhoramento genético (BÓ et al., 2008). Apesar dos esforços das pesquisas nos últimos anos não terem resultado em nenhum aumento no número de embriões transferíveis por tratamento, os protocolos que controlam a emergência da onda folicular (BÓ et al., 2002) e o momento da ovulação (BARUSELLI et al., 2006) têm permitido o tratamento de grupos de doadoras, independentemente da fase do ciclo estral, e permitido inseminação artificial em tempo fixo (IATF) de doadoras, sem a necessidade de detecção do estro. Isto teve um impacto positivo sobre a transferência de embriões comercial, porque facilitou o agendamento de protocolos de trabalho, sem ser dependente do conhecimento e da habilidade do pessoal para a detecção do estro. Neste contexto, a necessidade de injetar FSH duas vezes por dia é um fator de grande preocupação (BÓ et al., 1994). Além disso, o tratamento mais comumente usado para a sincronização da emergência da onda folicular para a superovulação envolve o uso de um dispositivo de liberação de progestágeno/progesterona (P4) e estradiol 17 β ou seus ésteres, (MAPLETOFT; STEWARD; ADAMS, 2002) o qual não pode ser usado em muitos países devido à preocupação com os efeitos dos hormônios esteróides na cadeia alimentar (LANE; AUSTIN; CROWE, 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e Período do Experimento

Este experimento foi desenvolvido na Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO) na área de Bovinos de Leite do Centro Estadual de Pesquisa em Agricultura Orgânica (Figura 1) localizado no município de Seropédica-RJ, (latitude: 22° 46'56. S; longitude: 43° 39'41.O), durante o período de novembro de 2010 a dezembro de 2011.



Figura 1. Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO). Área de Bovinos de Leite do Centro Estadual de Pesquisa em Agricultura Orgânica, Seropédica/RJ.

3.2 Animais

Foram utilizadas doze doadoras (Figura 2), sendo sete vacas e cinco novilhas Girolando, com grau de sangue variando de 3/8 a 3/4, não lactantes, não gestantes e com escore de condição escore corporal entre 3,0 e 4,0 (escala de 1 a 5), registradas na ABCZ (Associação Brasileira de Criadores de Zebu) e com idade variando de 3 a 10 anos.



Figura 2. Doadoras de embriões da raça Girolando.

3.3 Tratamentos para sincronização da onda folicular

Foram avaliados três tratamentos para sincronizar a emergência da onda folicular das doadoras antes do início da superovulação: Grupo 1: observação do “cio base” das doadoras e início da superovulação no décimo dia após o cio (GRUPO CONTROLE – Figura 3); Grupo 2: colocação de um implante contendo 1g de progestágeno (DIB®) e aplicação de 2mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol®) nas doadoras, sendo considerado este o dia zero (D0), iniciando a superovulação no D4 (Figura 4); Grupo 3: início da superovulação quatro dias após a aplicação de 25µg de GnRH (Gestran Plus®) nas doadoras (Figura 5).

3.4 Manejo reprodutivo e nutricional

Todas doadoras foram submetidas previamente a exame ginecológico por palpação retal para detecção da ciclicidade e anormalidades do trato reprodutivo 30 dias antes do início do tratamento superovulatório. Todos os animais foram mantidos em pastagem de capim-Braquiária (*Brachiaria decumbens*) e ainda tiveram acesso à água e sal mineral *ad libitum*. Foi realizado o controle de ecto e endoparasitas assim como controle sanitário seguindo metodologia utilizada na rotina do rebanho. Além do estado nutricional, para seleção das doze doadoras, foram levados em consideração outros critérios como o histórico reprodutivo, a idade, a condição sanitária e o grupo genético (“grau de sangue”).

3.5 Tratamento superovulatório

As doadoras de todos os grupos experimentais foram submetidas ao mesmo tratamento superovulatório com Hormônio Folículo Estimulante – FSH (Folltropin®). Para tanto, foram utilizados 133mg de FSH divididos em oito subdoses decrescentes, aplicadas duas vezes ao

dia, por via intramuscular profunda (IM), com intervalos de 12 horas entre cada aplicação. No início do terceiro dia do tratamento superovulatório, foi aplicado 0,5 mg de cloprostenol sódico (Sincrocio®) um análogo da PGF2 α por via IM. Doze horas após a última aplicação de FSH, foi aplicada uma dose de 25 μ g de GnRH (Gestran Plus®) como indutor da ovulação. O implante intravaginal de progestágeno, no grupo II, foi retirado ao final do tratamento superovulatório (última subdose de FSH). As inseminações artificiais durante todo o experimento foram realizadas 12 e 24 horas após aplicação do indutor da ovulação com a utilização de sêmen convencional proveniente de um mesmo touro e de uma mesma partida (Holandês Vermelho e Branco - Cenário).

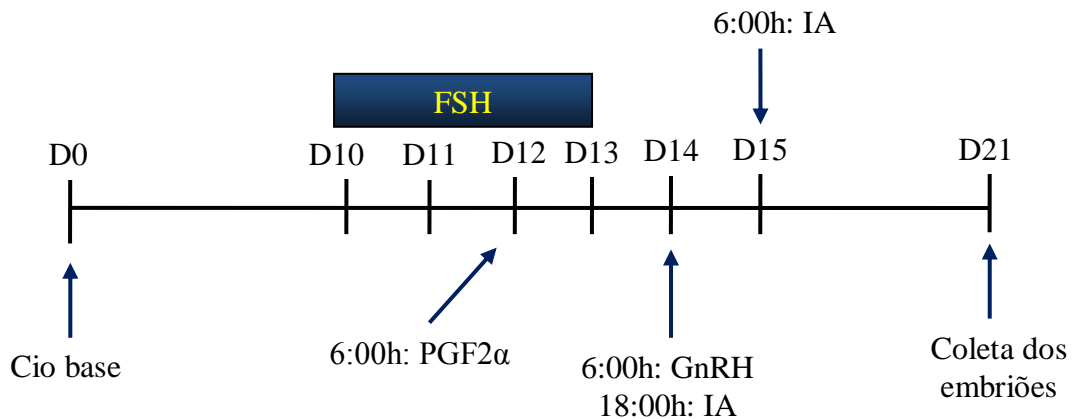


Figura 3. Protocolo de superovulação das doadoras do grupo controle (Grupo 1).

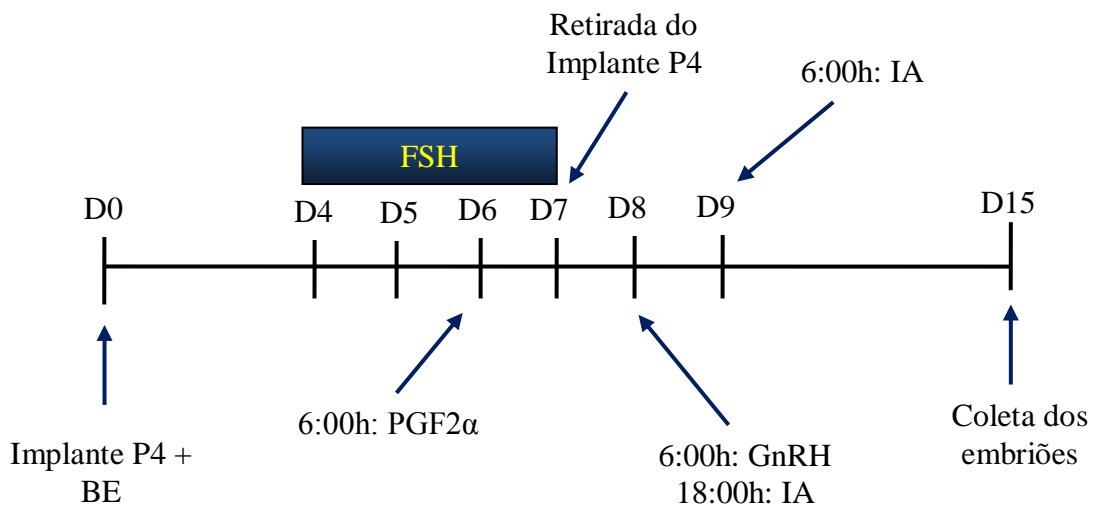


Figura 4. Protocolo de superovulação das doadoras do grupo implante de progestágeno + Benzoato de Estradiol (Grupo 2).

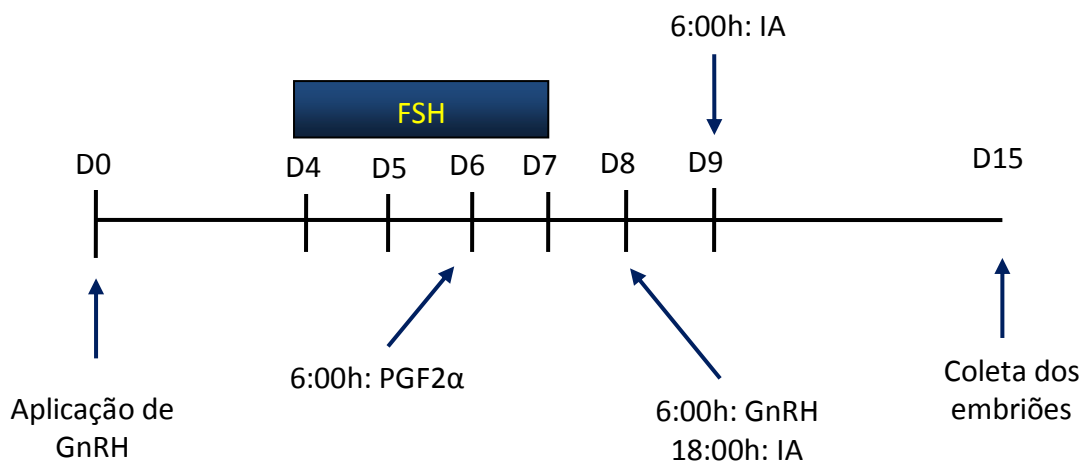


Figura 5. Protocolo de superovulação das doadoras do grupo GnRH (Grupo 3).

3.6 Avaliação da resposta superovulatória

A avaliação da resposta superovulatória foi realizada com auxílio de aparelho ultrassonográfico (MINDRAY D2200 VET), sete dias após a primeira inseminação artificial, sendo sempre realizada pelo mesmo técnico. Nesta avaliação, os ovários das doadoras foram examinados para determinação do número de corpos lúteos e observação de possíveis folículos anovulatórios (Figura 6). As lavagens uterinas para recuperação embrionária foram realizadas apenas nas doadoras que responderam ao tratamento superovulatório, ou seja, que apresentavam mais de dois corpos lúteos no dia da coleta.



Figura 6. Avaliação da resposta superovulatória realizada com aparelho ultrassonográfico (MINDRAY D2200 VET).

3.7 Coleta, manipulação e avaliação dos embriões

As coletas dos embriões foram realizadas por meio de lavagem uterina pelo método não cirúrgico sete dias após a primeira inseminação artificial sendo sempre realizadas pelo mesmo técnico. Para tanto, a doadora foi devidamente contida no brete, onde foi realizada a higiene da região perineal com água e sabão para posterior passagem da sonda de foley. Para isto, foi utilizado um mandril que conferiu rigidez a sonda permitindo sua passagem por toda a cérvix. A fixação da sonda no corpo do útero ocorreu após enchimento do *cuff* com ar. Após a fixação da sonda foi realizada a anestesia epidural com lidocaína (3 a 5 ml; Anestésico L - Pearson®) para facilitar a manipulação dos cornos uterinos durante a realização da lavagem. Para realização da lavagem foi utilizado um litro de solução salina tamponada com fosfato, (PBS - Nutricell®). Os dois cornos uterinos foram simultaneamente preenchidos com PBS, massageados e esvaziados por pelo menos 10 vezes para cada doadora. Após o fim da lavagem e a retirada da sonda foi realizada uma aplicação de 0,5 mg de cloprostenol sódico (Sincrocio®), um análogo da PGF₂ α por via IM, sendo esta aplicação repetida 7 dias após a aplicação da primeira. O copo coletor de embrião foi levado imediatamente, após o término da lavagem, ao laboratório para realização dos procedimentos necessários para localização e manipulação dos embriões. O conteúdo do copo coletor foi vertido cuidadosamente em uma placa de petri plástica descartável que foi levada até o estereomicroscópio (Neovet) para procura dos embriões em um aumento de 40x. A medida que os embriões foram sendo localizados, estes foram sendo transferidos para outra placa de petri menor contendo PBS acrescido 0,4% de BSA (TQC Holding®). Os embriões foram submetidos a lavagens nesse mesmo meio e então classificados morfológicamente sob estereomicroscópio em maior aumento (40x). A classificação quanto ao estágio de desenvolvimento (não fertilizado, 2-8 células, 8-16 células, mórula inicial-MI, mórula compacta-MC, blastocisto inicial-BI, blastocisto-BL e blastocisto expandido-BX) e a qualidade (Grau I – Excelente; II – Bom; III – Regular; IV – Pobre) foi realizada de modo subjetivo pelo mesmo técnico de acordo com o manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões - IETS (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1998). A quantidade dos embriões recuperados, assim como a qualidade destas estruturas, foi levada em consideração na comparação dos tratamentos de sincronização da ovulação das doadoras.

3.8 Delineamento experimental

As doze doadoras foram agrupadas por grupo de idade (nulíparas e multíparas) e por grupo genético (fração de sangue Holandês) em três tratamentos de maneira que cada doadora passasse pelos três tratamentos com intervalo de 40 dias entre as superovulações (Quadrado latino). No quadro 1 está representado o esquema de organização das doadoras em cada tratamento.

Quadro1. Delineamento experimental

Grupo Genético	Doadoras Categoria Animal	Tratamento (1ª repetição)	Tratamento (2ª repetição)	Tratamento (3ª repetição)
3/4	Vaca	1	2	3
3/8	Vaca	2	3	1
3/4	Vaca	3	1	2
3/8	Novilha	1	2	3
3/4	Novilha	2	3	1
3/8	Novilha	3	1	2
3/4	Vaca	1	2	3
1/2	Vaca	2	3	1
1/2	Novilha	3	1	2
3/4	Vaca	1	2	3
3/4	Novilha	2	3	1
1/2	Vaca	3	1	2

Grupo 1: Controle com observação do cio base

Grupo 2: Implante + Benzoato de Estradiol

Grupo 3: GnRH

3.9 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o programa estatístico ASSISTAT (UFCG, 2011). Para testar a influencia do grupo genético na resposta superovulatória foi utilizado o teste de Tukey. O número de corpos lúteos, de estruturas recuperadas assim como de estruturas viáveis foram avaliadas pelo Teste de Tukey. A porcentagem de animais que não responderam ao tratamento foi avaliada pelo teste de Shapiro–Wilk. Em todas as análises foi considerado um nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 estão apresentados o número de superovulações e a resposta superovulatória de novilhas e vacas Girolando de acordo com o tratamento empregado para sincronização da onda folicular. Para novilhas e vacas, após um total de 12 superovulações por tratamento, as respostas superovulatórias foram de 100% e 85,7%; 100% e 57,1%; 100% e 57,1% para os grupos cio base, GnRH e P4+BE, respectivamente. Houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre novilhas e vacas quando se comparou a resposta superovulatória dentro de cada grupo, sendo que as novilhas mostram uma resposta significativamente maior do que as vacas em todos os três tratamentos. Quando se comparou a resposta superovulatória de novilhas e vacas entre os grupos, não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$).

Tabela 1. Resposta superovulatória de novilhas e vacas Girolando de acordo com o tratamento empregado para sincronização da onda folicular.

Tratamentos	Novilhas (5)		Vacas (7)	
	Nº SOVs	Reposta superovulatória	Nº SOVs	Reposta superovulatória
Cio base	5	100% ^a	7	85,7% ^b
GnRH	5	100% ^a	7	57,1% ^b
P4+BE	5	100% ^a	7	57,1% ^b

Médias seguidas pela mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Shapiro-Wilk a 5%

P4 = Implante de progestágeno

BE = Benzoato de estradiol

SOVs = Superovulações

Os resultados mostrados na tabela 1 diferem daqueles encontrados por Hasler et al (1981) onde vacas e novilhas Holandesas não apresentaram diferença estatística na resposta superovulatória. A diferença entre os resultados do presente trabalho e aqueles publicados por Hasler et al (1981) pode ser explicada pelo menor número de doadoras utilizadas no presente estudo, pela diferença das raças ou ainda pelas diferenças nos protocolos de superovulação empregados em ambos os experimentos. Em um trabalho realizado por Lima (2007), também não foi encontrada diferença entre as categorias animais (vacas e novilhas) em relação à resposta superovulatória, o que difere do presente experimento. Esses achados podem ser explicados pela diferente raça utilizada por Lima et al (2007), que utilizaram animais Raça Limousin e ainda pelo número superior de superovulações realizadas (244 versus 30). No entanto, em oposição aos achados de Hasler et al (1981) e Lima et al (2007), Lange e Reichenbach (1997) observaram que a idade das doadoras tem influência na resposta superovulatória. Estes autores observaram que novilhas e vacas de primeira lactação tiveram menor número de oócitos e embriões coletados do que vacas mais velhas, de quinta ou sexta lactação. Estes resultados diferem do presente experimento em relação à resposta superovulatória, que foi melhor nas novilhas comparadas com as vacas. Esta diferença entre os resultados dos trabalhos pode ser explicada pela diferença dos protocolos de superovulação

sendo que no presente experimento foi utilizada a mesma dosagem de FSH (133 mg) para todas categorias animais.

Em um experimento realizado por Lerner et al (1986), com 339 doadoras Holandesas, foi relatado que o aumento de idade das doadoras diminui o número de estruturas recuperadas e de embriões viáveis. Uma alternativa proposta por estes autores para reverter esta situação seria o aumento da dose de FSH, porém este aumento não representou o mesmo resultado em novilhas. A diminuição no número de estruturas recuperadas com o aumento da dose de FSH em novilhas poderia ser atribuída, segundo os autores, à superestimulação dos ovários, que gerando uma estimulação dos folículos causaria uma limitação física dentro do próprio ovário. Esta limitação física diminuiria o suprimento sanguíneo para folículos individuais ou alteraria os mecanismos endócrinos normais levando a uma produção excessiva de esteróides ovarianos, o que poderia interferir com o apropriado desenvolvimento folicular e/ou com a ovulação. Com isso, maior número de folículos seria estimulado a continuar o desenvolvimento com altas doses de FSH, mas poucos seriam capazes de ovular e sofrer luteinização ou tornar-se atresícos em animais mais novos. Tais resultados corroboram com os achados no presente experimento, onde as novilhas foram superiores as vacas em relação à resposta superovulatória. As novilhas respondem de forma melhor ao tratamento superovulatório e, como tem sido mostrado, ainda são mais férteis quando comparadas às vacas sendo preferencialmente utilizadas em programas que envolvam as biotécnicas da reprodução.

A tabela 2 apresenta a média de corpos lúteos, total de estruturas e de embriões viáveis por doadora de acordo com o tratamento de sincronização da onda folicular. Para os grupos cio base, GnRH e P4+BE, as médias foram de 6,7; 5,0 e 8,2 corpos lúteos por doadora, respectivamente. Em relação à média do total de estruturas e de embriões viáveis por doadora, os tratamentos cio base, GnRH e P4+BE proporcionaram 3,2; 1,9; 5,5 estruturas e 2,8; 1,8; 4,3 embriões viáveis, respectivamente. Não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre os tratamentos para nenhum dos parâmetros avaliados.

Tabela 2. Média de corpos lúteos, total de estruturas e embriões viáveis por doadora de acordo com o tratamento de sincronização da onda folicular.

Tratamentos	Parâmetros avaliados		
	CL	Total de estruturas	Embriões viáveis
Cio base	6,7 ^a	3,2 ^a	2,8 ^a
GnRH	5,0 ^a	1,9 ^a	1,8 ^a
P4+BE	8,2 ^a	5,5 ^a	4,3 ^a

Médias seguidas pela mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%

P4 = Implante de progestágeno

BE = Benzoato de estradiol

CL = Corpo lúteo

A possibilidade de sincronizar a emergência da onda folicular, visando a superovulação em fase conhecida do ciclo estral tem implicações importantes para os programas de transferência de embriões (BÓ et al., 1996), como por exemplo, concentrar as coletas de embriões de várias doadoras para um mesmo dia e desprezar a necessidade de detectar o cio nas fêmeas superovuladas.

De acordo com Moor et al (1984), diferenças e particularidades na dinâmica folicular de cada doadora, como o tamanho, a distribuição e as condições dos folículos antrais no momento da administração do FSH podem afetar a resposta superovulatória frente ao tratamento hormonal. Os resultados apresentados na tabela 2 estão de acordo com os achados

de Nasser et al (2011) que, ao compararem o cio base frente à sincronização da onda com progestágeno e BE na superovulação de vacas Nelore, não observaram diferença quanto ao número de estruturas recuperadas e de embriões viáveis. Bó et al (1996) também não encontraram diferença na resposta superovulatória, nas estruturas recuperadas e nos embriões viáveis quando compararam o cio base com a sincronização da onda utilizando dispositivo de progestágeno e benzoato de estradiol em vacas de corte mestiças (Angus, Simental, Limousin e Charolês). Portanto, os dados do presente estudo corroboram os achados de Bó et al (1996).

No entanto, resultados do presente trabalho diferem daqueles encontrados por Fischdick et al (2009) que relataram diferenças significativas entre os métodos de sincronização da emergência da onda folicular na resposta superovulatória de vacas Simental, Limousin e Red Angus. No estudo destes pesquisadores, um dos grupos sincronizados apresentou um número significativamente maior de estruturas recuperadas e de embriões viáveis. Essa diferença pode ser explicada pelo fato dos métodos empregados para sincronização da emergência da onda folicular terem sido diferentes aos utilizados no presente trabalho. Fischdick et al (2009) avaliaram a eficiência da punção folicular associada ao dispositivo de progestágeno como método de sincronização da onda folicular antes da superovulação. Os demais tratamentos utilizados no experimento destes autores não mostraram diferenças entre si e nem quando comparados ao grupo controle que foi a observação do cio base. Protocolos de sincronização da ovulação baseados no emprego de dispositivos de progestágeno associados à aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol tem sido amplamente discutido na literatura (PORTO FILHO, 2004). Os efeitos atribuídos a este tratamento hormonal, como a atresia dos folículos FSH e LH dependentes e a ovulação em momento pré-determinado, resultando na emergência de uma nova onda de crescimento folicular e na sincronização da ovulação, tem sido relatados por vários pesquisadores (BÓ et al., 1994; BÓ et al., 1995b; DRIANCOURT, 2000; ROCHA, 2000; LANE et al., 2001).

A sincronização da emergência de uma nova onda de crescimento folicular permite iniciar a superovulação no momento desejado, realizando, por exemplo, a coleta de embrião em dia pré determinado, além de concentrar as coletas num mesmo dia ou em dias próximos, facilitando assim o manejo com doadoras e receptoras. Logo, os resultados encontrados neste experimento mostraram que, não havendo diferença entre doadoras superovuladas após observação do cio base frente às que tiveram a emergência da onda sincronizada (GnRH e P4+BE), pode-se programar a coleta dos embriões em datas pré definidas, não sendo necessária a detecção do estro que representa um dos maiores problemas no manejo reprodutivo das propriedades. E ainda, como mostrado por Assumpção et al (1999), a superovulação realizada na ausência de um folículo dominante resulta em melhores taxas de recuperação embrionária em vacas Nelore.

A tabela 3 mostra a média de corpos lúteos, estruturas recuperadas e embriões viáveis por doadora de acordo com o grupo genético. O número médio de corpos lúteos por doadora para animais 3/8, 1/2 e 3/4 de sangue foi de 10,3; 6,1 e 4,9, respectivamente. O número de superovulações para animais 3/8, 1/2 e 3/4 de sangue foi de 9, 9 e 18, respectivamente. As médias de estruturas recuperadas e de embriões viáveis por doadora foram 6,5; 3,7; 1,9 e 5,1; 3,2; 1,7, respectivamente para animais 3/8, 1/2 e 3/4 de sangue. Houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos genéticos em relação ao número de corpos lúteos, sendo que doadoras 3/8 de sangue Holandês (consequentemente 5/8 de sangue Gir) apresentaram maior resposta ao tratamento superovulatório quando comparadas com as doadoras 3/4 de sangue Holandês (1/4 de sangue Gir). Esta melhor resposta foi representada pelo maior número médio de corpos lúteos entre os grupos genéticos. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) para as doadoras 1/2 sangue Holandês/Gir em relação aos outros dois grupos genéticos. Não foi encontrada diferença estatística ($p > 0,05$) em relação às estruturas recuperadas e embriões viáveis para os três grupos genéticos.

Tabela 3. Média de corpos lúteos, total de estruturas e embriões viáveis por doadora de acordo com o grupo genético.

Grupo Genético (número de SOVs)	CL	Total de estruturas	Embriões viáveis
3/8	10,3 ^a	6,5 ^a	5,1 ^a
1/2	6,1 ^{ab}	3,7 ^a	3,2 ^a
3/4	4,9 ^b	1,9 ^a	1,7 ^a

Médias seguidas pela mesma letra, dentro da mesma coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%
SOVs = Superovulações
CL = Corpo lúteo

Diferenças na fisiologia reprodutiva têm sido descritas entre raças *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* o que pode, em parte, explicar as variações na resposta superovulatória entre raças pertencentes a esses grupos genéticos. Entre estas diferenças se destacam, por exemplo, o diâmetro do folículo dominante e do ovulatório, a duração do período de expressão do estro e uma maior sensibilidade a gonadotrofinas exógenas nos zebuínos (BARUSELLI et al., 2006). Estes relatos podem sustentar os resultados apresentados na tabela 3, onde além de encontrarmos diferenças significativas entre os grupos genéticos, os animais com maior grau de sangue zebuíno (3/8 Girolando) responderam melhor ao tratamento superovulatório quando comparados ao de maior sangue taurino (3/4 Girolando).

Esta diferença na resposta superovulatória pode ser explicada pelo fato de ter sido utilizada uma mesma dosagem de FSH (133mg) para superovular todos os animais e como os animais *Bos taurus indicus* mostram-se mais sensíveis as gonadotrofinas, responderam de forma melhor. No entanto, seria mais interessante se protocolos superovulatórios fossem desenvolvidos especificamente para cada raça, otimizando assim o potencial reprodutivo de cada grupo genético em um programa de transferência de embriões. Por exemplo, poderia ser realizado um ajuste na administração de FSH, aumentando a dosagem para os animais taurinos em relação aos zebuínos. Esta idéia foi comprovada por Barati et al (2006), que demonstraram uma dose necessária para superovular vacas *Bos taurus taurus* maior do que a usada para vacas *Bos taurus indicus*. Contudo, essa diferença entre os grupos genéticos não seria o único fator limitante porque ainda existe o fator individual que seria determinante, tanto em zebuínos como em taurinos.

Hasler (1992) descreveu uma grande variação na resposta superovulatória de vacas Holandesas, sendo de 0 a 101 estruturas recuperadas e de 0 a 50 embriões recuperados por doadora. Esta variação individual também foi relatada em vacas Nelore por Baruselli et al (2003). Estes autores verificaram que a doadora foi a maior fonte de variação em um programa de transferência de embriões, mostrando efeito do indivíduo na taxa de recuperação, nas estruturas recuperadas, nos embriões transferíveis e no número de corpos lúteos. Borges et al (2003), comparando a dinâmica folicular de vacas Nelore e Gir, verificaram diferenças na taxa de crescimento folicular e no tamanho do folículo ovulatório. Contudo faz se necessário o conhecimento da fisiologia reprodutiva dessas raças a fim de adequar melhor os protocolos utilizados para cada grupo genético, otimizando a resposta superovulatória das doadoras, além de diminuir o custo exagerado com hormônios quando se trata de animais mais sensíveis a gonadotrofinas, que é o caso dos zebuínos. Dentro de uma mesma raça, possíveis variações reprodutivas podem ser encontradas como mostrou o presente experimento em relação a diferentes respostas superovulatórias quando comparou animais 3/8 com 3/4 Girolando. A correta interpretação dos vários fatores que influenciam a resposta superovulatória é de extrema importância para viabilizar cada vez mais o uso desta biotécnica.

5 CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu as seguintes conclusões:

- A sincronização da emergência da onda folicular, previamente ao início da superovulação, pode ser utilizada com sucesso em um programa de transferência de embriões Girolando.
- O uso do GnRH ou da associação de P4+BE são tão eficientes quanto a utilização do cio base na superovulação de doadoras de embrião Girolando.
- Doadoras Girolando 3/8 respondem melhor ao tratamento superovulatório quando comparadas às fêmeas Girolando 3/4.
- Novilhas Girolando respondem melhor ao tratamento superovulatório quando comparadas às vacas, independente do método de sincronização da onda folicular.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; GINTHER, O.J. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 95, p. 627-640, 1992a.

ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H.; GINTHER, O. J. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, p. 177-188, 1992b.

ADAMS, G.P.; NASSER, L.F.; BÓ, G.A.; GARCIA, A.; DEL CAMPO, M.R.; MAPLETOFT, R.J. Superovulatory response of ovarian follicles of wave 1 versus wave 2 in heifers. **Theriogenology**, v. 42, p. 1103-1113, 1994.

AERTS, J.M.J.; BOLLS, P.E.J. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 180-187, 2010.

AIELLO, S.E. **Manual Merck de Veterinária**. Sistema Reprodutivo - Introdução. 8 ed. São Paulo: Roca, p. 1861, 2001.

ALVAREZ, P.; SPICER, L.J.; CHASE J.R. C.C.; PAYTON, M.E.; HAMILTON, T.D.; STEWART, R.E.; HAMMOND, A.C.; WETTEMAN, R.P. Ovarian and endocrine characteristics during the estrous cycle in Angus, Brahman and Senepol cows in a subtropical environment. **Journal of Animal Science**, v.78, p.1291-1302, 2000.

ANDRADE, J.C.O.; OLIVEIRA, M.A.L.; SANTOS FILHO, A.S.; WISCHRAL, A.; LIMA, P.F.; SOUZA, D.M.B. Diferentes protocolos de superovulação em vacas Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** v. 23, p. 317-318, 1999.

ARMSTRONG, D.G.; GUTIERREZ, C.G.; BAXTER, G; GLAZYRIN, A.L.; MANN, G.E.; WOAD, K.J.; HOGG, C.O.; WEBB, R. Expression of mRNA encoding IGF-I, IGF-II and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. **Journal of Endocrinology**. v.165, p. 101-113, 2000.

ASSISTAT Versão 7.6 beta (2011) - Homepage <http://www.assistat.com> Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG – Atualizado 21/01/2012.

ASSUMPÇÃO, M.E.O.A.; MADUREIRA, E.H.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; GUMÕES, P.P.G.; CANDINI, P.H.; VISINTIN, J.A. Influence of the development phase of the dominant follicle on the superovulatory response in Nelore heifers. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.36, p. 300-303, 1999.

BALL, P.J.H.; PETERS, A.R. **Reprodução em bovinos**. 3.ed. São Paulo: Roca, 2006. 232p.

BAO, B.; GARVERICK, H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 1903-1921, 1998.

BARATI, F.; NIASARI-NASLAJI, A.; BOLOURCHI, M.; SARHADDI, F.; RAZAVI, K.; NAGHZALI, E.; THATCHER, W.W. Superovulatory response of Sistani cattle to three different doses of FSH during winter and summer. **Theriogenology**, v. 66, p. 1149–1155, 2006.

BARROS, C.M.; FIGUEIREDO, R.A.; PAPA, F.O.; ROCHA, G. Follicular growth in Nellore cows (*Bos indicus*) after PGF2 administration. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 216, 1993. Supplement 1.

BARROS, C.M.; ERENO, R.L. Avanços em tratamentos hormonais para a inseminação artificial com tempo fixo (IATF) em bovinos de corte. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p. 23-34, 2004.

BARROS, C.M.; ERENO, R.L.; SIMÕES, R.A.L.; FERNANDES, P.; BURATINI, J.; NOGUEIRA, M.F.G. Use of knowledge regarding LH receptors to improve superstimulatory treatments in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22 p.132-37, 2010.

BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. Superovulação em zebuínos de corte. **In: 1º. Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. Londrina, p. 212-222, 2004.

BARUSELLI, P. S. **Dinâmica folicular durante o ciclo estral e resposta superovulatória em fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*)**. 1997. 96f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1997.

BARUSELLI, P.S.; FERREIRA, R.M.; SÁ FILHO, M.F.; NASSER, L.F.T.; RODRIGUES, C.A.; BÓ, G.A. Bovine embryo transfer recipient synchronization and management in tropical environments. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p.67–74, 2010.

BARUSELLI, P.S.; FERREIRA, R.M.; SALES, J.N.S.; GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; MARTINS, C.M.; RODRIGUES, C.A.; BÓ, G.A. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. **Theriogenology**, v. 76, p. 1583–1593, 2011.

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

BARUSELLI, P.S.; JACOMINI, J.O.; SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A. Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. **In: III Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, Londrina-PR. Anais, p. 146-167, 2008.

BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O. Programas de sincronização da ovulação em gado de corte: **In: I Simpósio de Reprodução Bovina – Sincronização de estros em bovinos**, Porto Alegre – RS. Anais, p. 41-60, 2002.

BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; CARVALHO, N.A.T.; MADUREIRA, E.H.; COSTA NETO, W.P. Dinâmica folicular em novilhas receptoras de embrião bovino submetidas à sincronização da ovulação para inovulação em tempo-fixo. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 28, p. 217, 2000.

BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; REIS, E.L.; NASSER, L.F.T.; SILVA, R.C.P.; MENEGATTI, J.A.; VALENTIN, R.; SANTOS, I.C.C. Adequação da dose de FSH (Folltropin-v) em protocolos de superovulação de vacas Nelore (*Bos indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo (SOTF). **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p.244- 245, 2003.

BARUSELLI PS, REIS EL, MARQUES MO, NASSER LF, BÓ GA. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v.82/83, p.479-486, 2004.

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

BÉNYEI, B.; BARROS, C.C.W. Efeito da superovulação sobre o desempenho de bovinos doadores de embrião importados de clima temperado para clima tropical nos dois primeiros anos de adaptação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 366-371, 2000

BERGFELT, D.R.; BÓ, G.A.; MAPLETOFT, R.J.; ADAMS, G.P. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 49, p. 1-12, 1997.

BINDON, B.; PIPER, L. Induction of ovulation in sheep and cattle by injection of PMSG and ovine anti-PMSG immune serum. **Theriogenology**, v. 4, p. 171, 1977.

BO, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Effect of progestogen plus estradiol-17beta treatment on superovulatory response in beef cattle. **Theriogenology**, v. 45, p. 897-910, 1996.

BÓ, G.A.; HOCKLEY, D.K.; NASSER, L.F.; MAPLETOFT, R.J. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of a porcine pituitary extract in beef cattle. **Theriogenology**, v. 42, p. 963-975, 1994.

BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v. 43, p. 31-40, 1995.

BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; CACCIA, M.; MARTÍNEZ, M.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 39, p. 193-204, 1995.

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRÍBULO, R.; TRÍBULO, H.; MAPLETOFT, R.J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 53-72, 2002.

BÓ, G.A.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L. Manipulação hormonal do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32 p. 1-22, 2004.

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; CHESTA, P.M.; MARTINS, C.M. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. **Theriogenology**, v. 65, p. 89-101, 2006.

BÓ, G.A., GUERRERO, D.C.; ADAMS, G.P. Alternative approaches to setting up donor cows for superovulation. **Theriogenology**, v. 69, p. 81-87, 2008.

BÓ, G.A.; TRÍBULO, A.; RAMOS, M.; GUERRERO, D.C.; TRIBULO, R.; TRIBULO, H.; ROGAN, D.; MAPLETOFT, R.J. Simplification of superovulation protocols in cattle. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, p. 278–286, 2010.

BODENSTEINER, K.J.; KOT, K.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Synchronization of emergence of follicular wave in cattle. **Theriogenology**, v. 45, p. 1115-1128, 1996.

BORGES, Á.M.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M.; ROCHA JÚNIOR, V.R.; CARVALHO, G.R. Dinâmica folicular ovariana em novilhas mestiças Holandês-Zebu. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 595-604, 2001.

BORGES, A.M.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M.; ROCHA JÚNIOR, V.R.; CARVALHO, G.R.; MARCATTI NETO, A.; ASSIS, A.J. Características da dinâmica folicular e regressão luteal de vacas das raças Gir e Nelore após tratamento com cloprostenol sódico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 85-92, 2003.

BRAW-TAL, R. The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells? **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, p. 11–18, 2002.

BURATINI, J. Foliculogênese em bovinos. In: **II Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, Londrina - PR. Anais, p. 55- 62, 2006.

CABODEVILA, J.; TORQUATI, S. Superovulación de hembras bovinas. In: PALMA, G.A. **Biotecnología de La Reproducción**. Balcarce, Argentina: Ediciones, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, cap.VI, p. 79- 108, 2001.

CARVALHO, B.P. MELLO, M.R.B., DIAS, A.J.B. Resposta ovariana de vacas Red Sindi superovuladas com diferentes doses de FSH. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, p. 452, 2008.

CASTILHO, C.; RENESTO, A.; GARCIA, J.M. Divergência no crescimento folicular em novilhas da raça Nelore. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p.606-607, 2003.

CAVALIERI, J.; HEPWORTH, G.; PARKER, K.I.; WRIGHT, P.J.; MACMILLAN, K.L. Effect of treatment with progesterone and oestradiol when starting treatment with an intravaginal progesterone releasing insert on ovarian follicular development and concentrations in Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, v. 76, p. 177-193, 2003.

CECCONI S. Growth and differentiation of small ovarian follicles in mammals: problems and future perspectives. **Journal Reproduction Development**, v. 48, p. 431–445, 2002.

CUNNINGHAM, J.G. Ciclos Reprodutivos. In: AUTUMN, P.; GEORGE, H. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.,1999. Cap. 36, p. 368-376.

DONALDSON, L.E. Dose of FSH-P as a source of variation in embryo production from superovulated cows. **Theriogenology**, v. 22, p. 205-212, 1984.

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 54, p. 1211-1239, 2000.

EPPIG, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, p. 829-838, 2001.

EVANS, A.C.O.; KOMAR, C.M.; WANDJI, S.A.; FORTUNE, F.E. Changes in androgen secretion and luteinizing hormone pulse amplitude are associated with recruitment and growth of ovarian follicles during the luteal phase of the bovine estrus cycle. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 349-401, 1997.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 203-216, 2003.

FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L.; SOLER, J.M.P. Ovarian follicular dynamics in Nellore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 1489-1505, 1997.

FILION, F.; BOUCHARD, N.; GOFF, A.K.; LUSSIER, J.G.; SIROIS, J. Molecular cloning and induction of bovine prostaglandin E synthase by gonadotropins in ovarian follicles prior to ovulation in vivo. **Journal of Biology Chemistry**, v. 276, p. 34323-34330, 2001.

FINDLAY, J.K.; CLARKE, I.J. Regulation of the secretion of FSH in domestic ruminants. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 34, p. 27-37, 1987.

FISCHDICK, R.O.; RODRIGUES, C.F.M.; PINHO, T.G.; BRANDÃO, F.Z.; CAVALCANTI, A.S.; BOITÉ, M.C.; NOGUEIRA, L.A. Comparação de diferentes técnicas de sincronização da emergência da onda folicular visando a superovulação em bovinos. **Revista brasileira de Ciência Veterinária**, v. 16, p. 119-123, 2009.

FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 135-163, 2003.

FORTUNE, J.E.; KITO, S.; WANDJI, S.A.; SRSEN, V. Activation of bovine and baboon primordial follicles in vitro. **Theriogenology**, v. 49, p. 441-449, 1998.

GAMBINI, A.L.G.; MOREIRA, M.B.P.; CASTILHO, C.; BARROS, C.M. Desenvolvimento folicular e sincronização da ovulação em vacas da raça Gir. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 22, p. 201-210, 1998.

GARVERICK H.A.; ELMORE R.G.; VAILLANCOURT D.H.; SHARP A.J. Ovarian response to gonadotropin-releasing hormone in postpartum dairy cows. **American Journal of Veterinary Research**, v.41, p.1582-1585, 1980.

GIBBONS JR, WILTBANK MC, GINTHER OJ. 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.

GINTHER, O.J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycle with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 223-30, 1989.

GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1187-1194, 1996.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; KULICK, L.J.; KOT, K. Pulsatility of systemic FSH and LH concentrations during follicular-wave development in cattle. **Theriogenology**, v. 50, p. 507-519, 1998.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; KULICK, L.J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 383-389, 2000.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, B.R.; BEG, M.A.; KOT, K. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 124, p. 475-482, 2002.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; DONADEU, F.X.; BERGFELT, B.R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 239-257, 2003.

HAFEZ, E.S.; HAFEZ, B. Hormônios, Fatores de Crescimento e Reprodução. In: HAFEZ, E. S.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7 ed. Barueri, SP. Ed Manole, p. 37-38, 2004.

HASLER, J.F.; BROOKE, G.P.; McCAULEY, A.D. The relationship between age and response to superovulation in Holstein cows and heifers. **Theriogenology**, v. 15, p. 109, 1981.

HASLER, J.F. Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 2857-2879, 1992.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/> acessado em 15/12/2011.

KELLY P.; DUFFY P.; ROCHE J.F.; BOLAND M.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.

KNIGHT, P.G.; GLISTER, C. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatins in the ovary. **Reproduction**, v.121, p. 503-12, 2001.

KOHRAM, H.; TWAGIRAMUNGU, H.; BOUSQUET, D.; DUROCHER, J.; GUILBAULT LA. Ovarian superstimulation after follicular wave synchronization with GnRH at two different stages of the estrous cycle in cattle. **Theriogenology**, v. 49, p. 1175-86, 1998.

KULICK, L.J.; KOT, K.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. **Theriogenology**, v. 52, p. 913-921, 1999.

LAMMOGLIA, M.A.; SHORT, R.E.; BELLOWS, S.E.; BELLOWS, R.A.; MACNEIL, M.D.; HAFS H.D. Induced and synchronized estrus in cattle: dose titration of estradiol

benzoate in peripubertal heifers and postpartum cows after treatment with an intravaginal progesterone-releasing insert and prostaglandin F2alpha. **Journal of Animal Science**, v.76, p.1662-1670, 1998.

LANE, E.A.; AUSTIN, E.J.; ROCHE, J.F.; CROWE, M.A. The effect of estradiol benzoate on synchrony of estrus and fertility in cattle after removal progesterone-releasing intravaginal device. **Theriogenology**, v. 55, p. 1807-1818, 2001.

LANE E.A., AUSTIN E.J.; CROWE M.A. Estrus synchronisation in cattle-Current options following the EU regulations restricting use of estrogenic compounds in food-producing animals: A review. **Animal Reproduction Science**, v. 109, p. 1-16, 2008.

LANGE, H.; REICHENBACH, H.D. Bovine superovulatory treatments: Follicle stimulating hormone (FSH) preparations and superovulation treatment protocols as sources of variation in embryo transfer practice. Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS. **Reunião anual da sociedade brasileira de transferência de embriões**, Acta Scientiae Veterinariae v. 25, p. 127-144, 1997.

LERNER, S.P.; THAYNE, W.V.; BAKER, R.D. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. **Journal of Animal Science**, v. 63, p. 176-183, 1986.

LOPEZ, H.; CARAVIELLO, D.Z; SATTER, L.D.; FRICKE, P.M.; WILTBANK, M.C. Relationship between level of milk production and multiple ovulations in lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 88, p. 2783–2793, 2005.

LUCY, M.C.; SAVIO, J.D.; BADINGA, R.L.; DE LA SOTA, R.L.; THATCHER, W.W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3615-1626, 1992.

LUSSIER, J.G.; MATTON, P.; DUFOUR, J.J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, p. 301-307, 1987.

MACEDO, D.B. **Dinâmica folicular ovariana em fêmeas bovinas *Bos indicus***. Revisão de literatura apresentada no Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Campo Grande - MS, 16p. 2008.

MAPLETOFT, R.J.; STEWARD, K.B.; ADAMS, G.P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, p. 601-11, 2002.

MARTINS, C.M. **Adequação do protocolo de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em *Bos taurus***. 2005, 85p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MARTINS, C.M. **Diferentes protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em *Bos taurus* e *Bos indicus***. 2007, 113p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MATTON, P.; ADELAKOUN, V.; COUTURE, Y.; DUFOUR, J.J. Growth and replacement of the bovine ovarian follicles during the estrous cycle. **Journal of Animal Science**, v. 52, p. 813-820, 1981.

MELO, C.L. **Sincronização da ovulação de vacas de corte tratadas com três protocolos de sincronização da ovulação**. 2009 41 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

MIHM, M.; AUSTIN, E.J. The final stages of dominant follicle selection in the cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 155-166, 2002.

MOOR, R.M.; KRUIP, T.A.; GREEN, D. Intraovarian control of folliculogenesis: limit to superovulation? **Theriogenology**, v. 21, p.103-16, 1984.

MORITA, Y.; TILLY, J.L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. **Development of Biology**, v. 213, p. 1-17, 1999.

NASSER, L.; ADAMS, G.P.; BÓ, G.A.; MAPLETOFT, R.J. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. **Theriogenology**, v. 40, p. 13-724, 1993.

NASSER, L.F.; SÁ FILHO, M.F.; REIS, E.L., REZENDE, C.R.; MAPLETOFT, R.J.; BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 76, p. 320-327, 2011.

NELSON, L.D.; NELSON, C.F. Handling and culture of bovine embryos: survey of media used by 26 embryo transfer companies in the USA. **Theriogenology**, v. 56, p. 1377-1382, 2001.

NILSSON, E.; SKINNER, M.K.; Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 8, p. 17–20, 2001.

NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, B.J.P.; TEIXEIRA, A.B.; TRINCA, L.A.; D'OCCHIO, M.J.; BARROS, C.M. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed-time insemination in superstimulated beef cows. **Theriogenology**, v. 57, p. 1625–34, 2002.

OKTEM, O.; OKTAY, K.; The ovary: anatomy and function throughout human life. **Ann N. Academy of Science**, 1127, p. 1–9, 2008.

PALHANO, H.B. Fisiopatologia da Reprodução. In: PALHANO, H. B. **Reprodução em Bovinos**, 2 ed. Rio de Janeiro, RJ. Ed L.F. Livros de Veterinária, p. 44-45, 2008.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Reliability of diagnostic ultrasonography for identification and measurement of follicles and detecting the corpus luteum in heifers. **Theriogenology**, v. 28, p. 929-36, 1987.

PORTO FILHO, R.M. **Sincronização da ovulação para a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) durante a estação reprodutiva desfavorável em fêmeas bubalinas.** 2004, 97p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

PURSLEY, J.R.; MEE, M.O.; WILTBANK; M.C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2, and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, p. 915-923, 1995.

REIS, E.L. **Efeito da dose e do momento da administração de gonadotrofina coriônica eqüina no protocolo de sincronização da ovulação para TETF.** 2004. 101f. Dissertação (Mestrado em Medicina veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

RHODES, F.M.; DE'ATH, G.; ENTWISTLE, K.W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 38, p. 265-77, 1995.

ROCHA, J.L. **Sincronização hormonal da onda folicular e do estro em novilhas de corte mestiças monitoradas por radiotelemetria.** 2000. 125 p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

SARTORI, R; BASTOS, M.R.; BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; ERENO, R.L.; BARROS, C. M. Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. **Society of Reproduction and Fertility**, v. 67, p. 357-375, 2010.

SARTORI, R.;FRICKE, P.M.; FERREIRA, J.C.P.; GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1403-1409, 2001.

SCHERZER, J.; GHUMAN, S.P.; POPE, M.; ROUTLY, J.E.; WALTER, I.; SMITH, R.F.; DOBSON, H. **Theriogenology**, v.71, p.817-828, 2008.

SENBON, S.; HIRAO, Y.; MIYANO, T. Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lessons from in vitro culture. **Journal Reproduction Development**, v. 49, p. 259–269, 2003.

SIQUEIRA, L.C. **Esteróides no controle da regressão de folículos de diferentes diâmetros para uso em sistemas de inseminação artificial em tempo fixo de vacas de corte no pós parto.** 77p, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências veterinárias). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle monitored by real-time ultrasonography. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 308–317, 1988.

SMALL, J.A, COLAZO, M.G, KASTELIC, J.P, MAPLETOFT, R.J. Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. **Theriogenology**, v. 71, p. 698–706, 2009.

SMITH, M.F.; MCLINTOSH, E.W.; SMITH, G.W. Mechanisms associated with corpus luteum development. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 1857-1872, 1994.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. Manual of the International Embryo Transfer Society: a procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures, 3rd ed., Savoy, IL: **International Embryo Transfer Society**, 1998.

STROUD, B.; BO, G.A. Estatísticas Mundiais de 2009 para Transferência Embrionária em Animais Domésticos de Fazenda; Resumo do Relatório da Comissão de Recuperação de Dados da Sociedade Internacional para Transferência de Embriões (IETS). **XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, 2011, Cumbuco, CE, Brasil Acta Scientiae Veterinariae 18-20 de Agosto de 2011.

THATCHER, W.W.; GUZELOGLU, A.; MATTOS, R.; BINELLI, M.; HANSEN, T.R.; PRU, J.K. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1435-1450, 2001.

TWAGIRAMUNGU, H.; GUILBAULT, L.A.; PROULX, J.G.; DUFOUR, J.J. Buserelin alters the development of the corpora lutea in cyclic and early postpartum cows. **Journal of Animal Science** v. 73, p. 805-811, 1995.

VAN WEZEL, I.L.; RODGERS, R.J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1003–1011, 1996.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: Uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 915-924, 2007.

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

WAGNER, M.L. **Resposta superovulatória após ablação folicular usando um dispositivo simplificado em bovinos (*Bos taurus taurus*)**. 2007. 25p. Dissertação (Mestrado em Ciências veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2007.

WILLET, E.L. Successful transplantations of fertilized bovine ovum. **Science**, v. 113, p.247, 1951.

YANG, M.Y.; FORTUNE, J.E. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. **Biology of Reproduction**, v.78, p. 1153-1161, 2008.