CLAUDINEY DE MELO MARTINS

**Diferentes protocolos de superovulação com
inseminação artificial em tempo fixo em *Bos taurus* e
*Bos indicus***

São Paulo
2007

CLAUDINEY DE MELO MARTINS

**Diferentes protocolos de superovulação com
inseminação artificial em tempo fixo em *Bos taurus* e
*Bos indicus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

São Paulo
2007

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1881
FMVZ

Martins, Claudiney de Melo

Diferentes protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em *Bos taurus* e *Bos indicus* / Claudiney de Melo Martins. -- São Paulo: C. M. Martins, 2007.
115 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. *Bos taurus*. 2. *Bos indicus*. 3. Superovulação. 4. Transferência de embriões. 5. Produção de embriões. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Adequação do protocolo de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo para vacas da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*) de alta produção”, protocolado sob o nº867/2006, utilizando 16 (dezesesseis) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião do dia 17/05/2006.

(We certify that the Research “Adjustment of superovulation protocols with fixed time insemination for high producing Holstein (*Bos Taurus Taurus*) dairy cows”, protocol number 867/2006, utilizing 16 (sixteen) bovines, under the responsibility of Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 05/17/2006).

São Paulo, 18 de maio de 2006

Prof. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MARTINS, Claudiney de Melo

Título: Diferentes protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em *Bos taurus* e *Bos indicus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Aos meus queridos pais, Daniel e Reny, pelo apoio em todas as minhas decisões

A minha querida irmã, Ana Paula pela amizade

*Aos meus estimados avós paternos, Júlio (in memorian) e Bernardina (in memorian)
e avós maternos Joaquim e Luzia, pelos quais dedico meu respeito e carinho*

A minha namorada Priscila pelo apoio, carinho, companheirismo e compreensão

AGRADEÇO

A Deus, que através de minha fé tem me provado que a minha evolução como pessoa é perfeitamente possível e que tem me conduzido a uma auto superação a cada dia.

Ao Professor Titular Doutor Pietro Sampaio Baruselli, exemplo de integridade, seriedade e dedicação ao trabalho, pessoa que tanto contribuiu para minha formação profissional e pessoal.

A toda minha família, pelo incentivo e apoio, em especial a Vanessa, Adilson, Tia Vitória, Tia Nilva, Tio Romualdo, Tio Nilson, Tia Sônia, Tio Gilson e Tia Cida, a meu cunhado Samuel, além é claro, do meu companheiro de infância, meu primo Gilmar, sua esposa Regiane e meu afilhado Leonardo.

A todos os professores do Departamento de Reprodução Animal, em especial ao Prof. Titular Dr. José Antônio Visintin, , Prof^a Dr^a Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção e ao Prof. Dr. Ed Hoffman Madureira pelo profissionalismo e amizade.

Ao Prof. Dr. Marcelo Simão da Rosa, pelos primeiros ensinamentos ainda nos tempos de colégio agrícola e agora pela disponibilização das instalações e dos animais da Escola Agrotécnica Federal de Muzambinho – MG para a realização de um dos experimentos com resultados apresentados nesta dissertação.

Ao Prof. Dr. Luis Prado Júnior pela amizade, confiança e disponibilização das instalações e animais de sua propriedade (Fazenda VR Sant'Ana) em Cassilândia – MS para realização de inúmeros experimentos, alguns deles com resultados apresentados nesta dissertação. A seu pai Sr. Luis Prado Magalhães pelos ensinamentos e exemplo de vida, mostrando que através do trabalho e honestidade é possível alcançar reconhecimento e sucesso na vida.

Aos amigos Nélcio Antônio Tonizza de Carvalho, Everton Luiz Reis, Manoel Francisco de Sá Filho, José Ribamar de Souza Torres Júnior, Henderson Ayres, Lindsay Unno Gimenes, Alexandre Henry de Souza, Marcio Leão Ferraz, José Nélío Sales e Gabriel Crepaldi pelo convívio, inúmeros ensinamentos e pelo auxílio em todos os meus trabalhos realizados durante o mestrado.

A todos os estagiários que contribuíram para a realização de nossos trabalhos.

Aos médicos Veterinários Bolívar de Melo Ribeiro, Waldyr Paulino da Costa Neto, Luis Eduardo Paulino da Costa e especialmente Renato Ricci Grandinetti, pelos ensinamentos ainda no período de estágio pela graduação e agora pela oportunidade, durante o mestrado, de realizarmos alguns trabalhos em conjunto.

Aos Colegas Luiz Guilherme de Oliveira (Gui), Marcelo Gonçalves de Souza (Xexéu), Carlos Augusto Ribeiro (Bofo) e Denis Decato (Deninho), companheiros de tantas horas de dedicação ao trabalho entre outras coisas.

Ao Sr. David Manuel Curto Reis e a Sra. Maria das Dores Olímpio, pais de minha namorada, por me receberem em sua casa e em tão pouco tempo me fazer sentir como se eu estivesse em minha casa.

Aos professores de graduação Dr. Marcelo Landim Brisola, Dra. Cláudia Ribeiro do Vale, Dra. Fabíola Soares Zahm, Professor Flávio Elston, Professor Domingos Marcelo Cenachi Pesce e Dr. Carlos Henrique Cabral Viana, por todos os ensinamentos.

A secretária de pós-graduação Harumi Shiraishi pela enorme eficiência, competência e paciência em responder minhas incontáveis dúvidas.

A secretaria Thaís Soto pela dedicação e solicitude, além dos inúmeros favores prestados.

A Tecnopec, pela doação de fármacos utilizados em alguns dos experimentos cujos resultados serão apresentados nesta dissertação, em especial a Isabel e o Renato, que também colaboraram na interpretação de cada resultado apresentado a seguir.

Aos criadores, sem os quais não seria possível a execução deste trabalho, entre eles: Dr. Roberto Dias de Carvalho, Dr. Lindoalmir Alfredo Dornellas, João Bosco, José César, Antonio Carlos do Amaral, (Agropecuária 3A), Agropева, Rogério Dias, João Procópio, Fernando Piolli, Ideraldo Garcia, Fazenda Café Velho, Aníbal Vercesi, Fazenda Campestre, Fazenda Araquá, Fazenda do Sabiá, Fazenda Curitiba, Fazenda VRJO, Fazenda da Mata, Paraíso Embriões dentre outros...

A FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo indispensável suporte financeiro concedido através da bolsa de Mestrado. (Processo: 04/11477-3).

Enfim, a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para este projeto ou para minha formação, deixo aqui os meus sinceros agradecimentos.

A todos, muito OBRIGADO!

RESUMO

MARTINS, C. M. **Diferentes protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em *Bos taurus* e *Bos indicus*.** [Different superovulation protocols with fixed time artificial insemination in *Bos taurus* and *Bos indicus*]. 2007. 113 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Esse estudo está apresentado em Capítulo 1 (Protocolo de Superovulação com IATF em *Bos taurus*) e Capítulo 2 [Protocolos de superovulação com IATF em *Bos indicus*, com 3 experimentos; 1- Momento da administração de LH em vacas Nelore (*Bos indicus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo; 2- Efeito da administração de progesterona injetável no início do protocolo de sincronização para superovulação com IATF em vacas Nelore; 3- Efeito do número de inseminações em vacas Nelore superovuladas e inseminadas em tempo fixo]. No Capítulo 1 objetivou-se avaliar o momento da retirada do dispositivo de P4 (DIB[®]) e da administração de LH em vacas Holandesas. Dezesesseis vacas receberam DIB (D-1) e 2mg de BE (D0). Superovulou-se com 200mg de FSHp em 8 doses decrescentes a partir do D4. No D6, administrou-se PGF e estabeleceram-se quatro grupos: P24LH48 (retirada do DIB 24h e LH 48h pós PGF); P24LH60 (retirada 24h e LH 60h); P36LH48 (retirada 36h e LH 48h) e P36LH60 (retirada 36h e LH 60h; fatorial 2x2; cross-over). Realizou-se a IATF 12 e 24h pós LH. Os efeitos principais para P24vsP36 e LH48vsLH60 foram: taxa de ovulação (TO; $49,9 \pm 5,7$ vs $60,9 \pm 4,8\%$ e $53,1 \pm 5,3$ vs $57,5 \pm 5,4\%$; $P > 0,05$), estruturas totais (ETot; $4,4 \pm 0,9$ vs $5,0 \pm 0,9$ e $3,8 \pm 0,7$ vs $5,7 \pm 1,0$; $P > 0,05$), embriões transferíveis (ET; $3,0 \pm 0,7$ vs $4,1 \pm 0,9$ e $2,3 \pm 0,5^a$ vs $4,9 \pm 0,9^b$; $P < 0,05$) e embriões congeláveis (EC; $2,9 \pm 0,7$ vs $3,8 \pm 0,8$ e $2,1 \pm 0,5^a$ vs $4,7 \pm 0,9^b$; $P < 0,05$). O LH 60h pós PGF aumentou o número de ET e EC em Holandesas. No Capítulo 2, estudaram-se diferentes protocolos de superovulação com IATF em Nelore. No Experimento 1, vinte vacas foram superovuladas (P24) e tratadas com LH 48h (G-LH48) ou 60h (G-LH60) pós PGF (cross-over). Não houve diferença ($P > 0,05$) para: número de folículos $> 8\text{mm}$ no LH (FolLH; $12,5 \pm 1,5$ vs $9,4 \pm 1,0$) e TO ($71,0 \pm 4,2$ vs $64,6 \pm 4,0\%$). No entanto, verificou-se diferença ($P < 0,05$) para: intervalo primeira/última ovulação (IntOV; $15,0 \pm 2,1^a$ vs $21,0 \pm 1,7^b\text{h}$), ETot ($7,5 \pm 1,0^a$ vs

5,1±0,5^b), ET (6,2±1,0^a vs 3,1±0,5^b) e EC (5,9±0,9^a vs 2,5±0,5^b). O LH 48h pós PGF apresentou maior eficiência em Nelore. No Experimento 2, dez vacas receberam o protocolo P36LH48 e foram divididas em dois grupos no D0: Grupo BE (2mg) + P4 (50mg; G-BE+P4) ou Grupo BE (2mg; G-BE; cross-over). Os resultados para o G-BE+P4 e G-BE foram: emergência da onda folicular (EM; 3,6±0,2 e 4,0±0,1 d; P>0,05), variação da EM (2,5 a 4,5 vs 3,5 a 4,5d; P=0,06), FolLH (16,2±1,4 vs 18,5±1,1; P>0,05), IntOV (32,4±1,8 vs 33,6±1,6h; P>0,05), ETot (7,7±0,8 vs 9,2±1,2; P>0,05), ET (6,2±0,6 vs 7,2±1,1; P>0,05), EC (5,1±0,7 vs 6,3±1,0; P>0,05) e ED (0,6±0,2 vs 0,8±0,2; P>0,05). Não houve efeito da P4 i.m no D0. No Experimento 3, dez vacas foram divididas em: G-1IATF (16h pós LH) e G-2IATF (12 e 24h pós LH; cross-over). Os efeitos dos tratamentos G-1IATF e G-2IATF foram: FolLH (16,2±1,4 vs 14,8±1,2; P>0,05), ETot (8,2±0,9 vs 7,2±0,8; P>0,05), ET (4,3±0,7 vs 4,2±0,6; P>0,05), EC (2,9±0,6 vs 2,8±0,4; P>0,05) e estruturas não fertilizadas (0,6±0,2 vs 0,8±0,2; P>0,05). Não houve diferença na produção de embriões quando do emprego de uma ou duas IATFs

Palavras-chave: *Bos taurus*. *Bos indicus*. Transferência de embrião. Superovulação e Produção de embriões.

ABSTRACT

MARTINS, C. M. **Different superovulation protocols with fixed time artificial insemination in *Bos taurus* and *Bos indicus*.** [Diferentes protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em *Bos taurus* e *Bos indicus*.]. 2007. 113 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

This study is presented in Chapter 1 (Superovulations protocols with FTAI for *Bos taurus*) and Chapter 2 (Superovulation protocols with FTAI for *Bos indicus*), in this Chapter are included three experiments [1 - Moment of the application of LH in cows Nelore (*Bos indicus*); 2 - Effect of the injectable progesterone administration in the day 0 in Nelore cows; 3 - Effect of the number of inseminations in superstimulated and fixed-time inseminated Nelore cows]. On Chapter 1, it went to evaluate the time of intravaginal P4 device (DIB™) withdrawal and the application of LH in Holstein cows superstimulated with FTAI. Sixteen cows, treated with DIB (D-1) and 2mg of EB (D0) were assigned in four groups (superstimulation with 200mg of FSHp in 8 decreasing doses starting on D4). On D6, PGF was administered and the cows were accomplished in four groups: P24LH48; P24LH60; P36LH48 and P36LH60 (cross-over). The FTAIs were performed 12 and 24h after LH. The main effects for treatments P24 vs P36 and LH48vsLH60 were: ovulation rate (OR; 49.9 ± 5.7 vs $60.9 \pm 4.8\%$ and 53.1 ± 5.3 vs $57.5 \pm 5.4\%$; $P > 0.05$), total of structures (TS; 4.4 ± 0.9 vs 5.0 ± 0.9 and 3.8 ± 0.7 vs 5.7 ± 1.0 ; $P > 0.05$), transferable embryos (TE; 3.0 ± 0.7 vs 4.1 ± 0.9 and 2.3 ± 0.5^a vs 4.9 ± 0.9^b ; $P < 0.05$) and suitable to freezing embryos (FE; 2.9 ± 0.7 vs 3.8 ± 0.8 and 2.1 ± 0.5^a vs 4.7 ± 0.9^b ; $P < 0.05$). The LH 60h after prostaglandin increased the TE and FE in Holstein cows. In the Chapter 2, it was studied different superstimulation with FTAI protocols in Nelore. In the first Experiment cows (n=20) were superovulated and treated with LH 48h (G-LH48) or 60h (G-LH60) after prostaglandin. There were no significant ($P > 0.05$) differences in the variables between LH48 and LH60: number of follicles >8mm at the time of LH (FolLH 12.5 ± 1.5 and 9.4 ± 1.0), OR [$169/249$ ($71.0 \pm 4.2\%$) and $120/187$ ($64.6 \pm 4.0\%$)]. However, there were differences ($P < 0.05$) between G-LH48 and G-LH60 in the variables: interval first/last ovulation (IntOV 15.0 ± 2.1^a and 21.0 ± 1.7^b), TS (7.5 ± 1.0^a and

5.1±0.5^b), TE (6.2±1.0^a and 3.1±0.5^b), and FE (5.9±0.9^a and 2.5±0.5^b). The LH 48h after prostaglandin was more efficient in Nelore cows. In second experiment, ten Nelore cows were divided in two groups (D0): EB plus injectable progesterone group (G-BE+P4); or EB group (G-BE). The results for G-BE+P4 and G-BE were: follicular wave emergency in days (FE; 3.6±0.2 and 4.0±0.1; P>0.05), variation in FE [(2.5 to 4.5) and (3.5 to 4.5)], IntOV (32.4±1.8 and 33.6±1.6; P>0.05), TS (7.7±0.8 and 9.2±1.2; P>0.05), degenerated embryos (0.6±0.2 and 0.8±0.2; P>0.05), TE (6.2±0.6 e 7.2±1.1; P>0.05), and FE (5.1±0.7 and 6.3±1.0; P>0.05). The third Experiment, ten Nelore cows were divided in two groups: G-1IATF (16h after LH) or G-2IATF (12 and 24h after LH). The results for G-1IATF and G-2IATF were: FolLH (16.2±1.4 and 14.8±1.2; P>0.05), TS (8.2±0.9 and 7.2±0.8; P>0.05), TE (4.3±0.7 and 4.2±0.6; P>0.05), FE (2.9±0.6 and 2.8±0.4; P>0.05) and unfertilized structures (0.6±0.2 and 0.8±0.2; P>0.05). There was no difference on embryo production when the cows were inseminated one (16h) or two (12 and 24h) inseminations.

Keywords: *Bos taurus*. *Bos indicus*. Embryo transter. Superovulation and Embryo production.

LISTA DE FIGURAS

Figuras do Capítulo 1

- Figura 1 - Rebanho de vacas Holandesas da Escola Agrotécnica Federal de Muzambinho utilizadas no experimento 47
- Figura 2 - Representação esquemática do protocolo de superovulação e sincronização da ovulação e dos intervalos das avaliações ultra-sonográficas em vacas da raça Holandesa – Grupo P24/LH48 50
- Figura 3 - Representação esquemática do protocolo de superovulação e sincronização da ovulação e dos intervalos das avaliações ultra-sonográficas em vacas da raça Holandesa – Grupo P36/LH48..... 50
- Figura 4 - Representação esquemática do protocolo de superovulação e sincronização da ovulação e dos intervalos das avaliações ultra-sonográficas em vacas da raça Holandesa – Grupo P24/LH60 51
- Figura 5 - Representação esquemática do protocolo de superovulação e sincronização da ovulação e dos intervalos das avaliações ultra-sonográficas em vacas da raça Holandesa – Grupo P36/LH60 51
- Figura 6 - Distribuição das ovulações após a administração de PGF nos diferentes grupos experimentais - Muzambinho – MG, 2005 59

Figuras do Capítulo 2

Figura 1-Rebanho de vacas Nelore da Fazenda Pouso Alegre utilizadas no experimento	70
Figura 2 - Representação esquemática do protocolo de superovulação e sincronização da ovulação e dos intervalos das avaliações ultra-sonográficas em vacas da raça Nelore – Grupo P24/LH48	72
Figura 3 - Representação esquemática do protocolo de superovulação e sincronização da ovulação e dos intervalos das avaliações ultra-sonográficas em vacas da raça Nelore – Grupo P24/LH60	72
Figura 4 - Rebanho de vacas Nelore da Agropecuária Agropeva utilizadas no experimento	84
Figura 5 - Representação esquemática do protocolo de superovulação e sincronização da ovulação e dos intervalos das avaliações ultra-sonográficas em vacas da raça Nelore – Grupo BE	86
Figura 6 - Representação esquemática do protocolo de superovulação e sincronização da ovulação e dos intervalos das avaliações ultra-sonográficas em vacas da raça Nelore – Grupo BE + P4.....	86
Figura 7 - Rebanho de vacas Nelore da Fazenda VR Santana utilizadas no Experimento	96
Figura 8 - Grupo 1IATF: 16 horas após a aplicação do LH.....	98
Figura 9 - Grupo 2IATF: 12 e 24 horas após a aplicação do LH	98

LISTA DE GRÁFICOS

Gráficos do Capítulo 1

- Gráfico 1 - Distribuição das ovulações de acordo com o momento da administração do LH (48 ou 60 h após a PGF) em vacas Holandesas de alta produção (*Bos taurus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo 57
- Gráfico 2 - Distribuição das ovulações de acordo com tempo de permanência do dispositivo de progesterona (24 ou 36 h após PGF) em vacas Holandesas de alta produção (*Bos taurus*) superovuladas e inseminadas artificialmente em tempo fixo 58

Gráficos do Capítulo 2

- Gráfico 1 - Distribuição das ovulações de acordo com o momento da administração do LH (48 ou 60 h após PGF) em vacas Nelore (*Bos indicus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo 75
- Gráfico 2 - Distribuição do momento do início de crescimento folicular de acordo com o protocolo (Benzoato de estradiol associado a progesterona injetável vs. Benzoato de estradiol) em vacas Nelore (*Bos indicus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo 89
- Gráfico 3 - Distribuição das ovulações de acordo com o protocolo (Benzoato de estradiol associado a progesterona injetável vs. Benzoato de estradiol) em vacas Nelore (*Bos indicus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo ..90
- Gráfico 4 - Distribuição das ovulações de acordo com o momento da administração do LH para os dois grupos experimentais (1 ou 2 IATF) em vacas Nelore (*Bos indicus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo101

LISTA DE TABELAS

Tabelas do Capítulo 1

- Tabela 1 - Distribuição da aplicação de FSHp em todos os grupos experimentais 48
- Tabela 2 - Efeito do tempo de permanência do dispositivo intravaginal contendo progesterona (P4-24 ou 36 horas) e do momento da aplicação do LH (48 ou 60 horas) após a aplicação de prostaglandina em vacas Holandesas de alta produção superovuladas, Muzambinho, MG, 2005. 55
- Tabela 3 - Efeito do tempo de permanência do dispositivo intravaginal de progesterona (24 ou 36h) e do momento da aplicação do LH (48 ou 60h) após a aplicação de prostaglandina em vacas Holandesas de alta produção superovuladas. Muzambinho – MG, 2005 (efeitos principais)..... 56
- Tabela 4 - Correlação e nível de significância da correlação para o número de folículos no D4, número de folículos no momento do LH, número de CL no D15 e número de estruturas coletadas em vacas Holandesas..... 60
- Tabela 5 - Correlação e nível de significância da correlação para o número de folículos no D4, número de folículos no momento do LH, número de CL no D15 e número de estruturas coletadas em vacas Holandesas de acordo com o grupo experimental. 61

Tabelas do Capítulo 2

Tabela 1 - Efeito do momento da aplicação do LH (48 ou 60h) após a aplicação de prostaglandina em vacas Nelore. Poços de Caldas – MG, 2006	74
Tabela 2 - Correlação e nível de significância da correlação para o número de folículos no D4, número de folículos no momento do LH, número de CL no D15 e número de estruturas coletadas em vacas Nelore.....	76
Tabela 3 - Correlação e nível de significância da correlação para o número de folículos no D4, número de folículos no momento do LH, número de CL no D15 e número de estruturas coletadas em vacas Nelore de acordo com o grupo experimental.	77
Tabela 4 - Efeito do tempo de permanência do dispositivo intravaginal de progesterona (24 ou 36h) e do momento da aplicação do LH (48 ou 60h) após a aplicação de prostaglandina em vacas Holandesas de alta produção superovuladas. Muzambinho – MG, 2005	88
Tabela 5 - Efeito do número de inseminações na eficiência de programas de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em vacas Nelore (<i>Bos indicus</i>), Fazenda VR Santana, Cassilândia-MS.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
ANOVA	análise de variância
BE	benzoato de estradiol
D	dia
EMP	erro padrão da média
FD	folículo dominante
FS	folículo subordinado
FSH	hormônio folículo estimulante
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas
h	hora
hCG	gonadotrofina coriônica humana
IGF-1	fator de crescimento semelhante a insulina do tipo 1
IM	intra-muscular
Kg	kilograma
LH	hormônio luteinizante
Log ₁₀ X	logaritmo na base 10
mg	miligrama
mm	milímetro
n	número de animais
°C	graus Celsius
P	nível de significância
PGF	prostaglandina
PGF _{2α}	prostaglandina F dois alfa
pH	potencial hidroionico
SAS	statistical analysis system
US	ultra-som/ ultra-sonografia
vs.	versus

LISTA DE SÍMBOLOS

® marca registrada

% porcentagem

χ^2 qui-quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	CARACTERÍSTICAS DO ESTRO COMPORTAMENTAL	27
2.2	DESENVOLVIMENTO FOLICULAR	28
2.3	FISIOLOGIA DO PÓS-PARTO	32
2.4	FATORES QUE AFETAM A RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA EM BOVINOS	36
2.5	CONTROLE DA DINÂMICA FOLICULAR PARA A SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA EM BOVINOS	37
2.6	INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM PROGRAMAS DE SUPEROVULAÇÃO	39
2.7	EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE PROGESTERONA INJETÁVEL AO BENZOATO DE ESTRADIOL NO INÍCIO DO PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO	41
2.9	SUPEROVULAÇÃO NA PRIMEIRA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR	41
2.10	USO DE DIFERENTES DOSES DE FSH PARA SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA	43
	CAPÍTULO I – PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO COM IATF EM BOS TAURUS	44
1	EXPERIMENTO 1: PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA DE VACAS HOLANDESES A DIFERENTES PROTOCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO COM INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO	45
1.1	HIPÓTESE	45

1.2	OBJETIVOS	46
1.2.1	OBJETIVO GERAL	46
1.2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
1.3	MATERIAIS E MÉTODOS	47
1.3.1	Animais	47
1.3.2	Instalações e Manejo Nutricional	47
1.3.3	Protocolos para superovulação com inseminação artificial em tempo fixo	48
1.3.4	Avaliações ultra-sonográficas	52
1.3.5	Colheitas de embriões	52
1.3.6	Delineamento Experimental e Análise Estatística	52
1.4	RESULTADOS	54
1.5	DISCUSSÃO	62
1.6	CONCLUSÕES	66
CAPÍTULO II – PROTOCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO COM IATF EM <i>BOS INDICUS</i>		67
1	EXPERIMENTO 1: EFEITO DO MOMENTO DA APLICAÇÃO DO LH EM VACAS NELORE (<i>Bos indicus</i>) SUPEROVULADAS E INSEMINADAS EM TEMPO FIXO	68
1.1	HIPÓTESE	68
1.2	OBJETIVOS	69
1.3	MATERIAIS E MÉTODOS	70
1.3.1	Animais	70
1.3.2	Instalações e Manejo Nutricional	70

1.3.3	Protocolos para superovulação com inseminação artificial em tempo fixo	71
1.3.4	Avaliações ultra-sonográficas	73
1.3.5	Colheitas de embriões	73
1.3.6	Delineamento Experimental e Análise Estatística	73
1.4	RESULTADOS	74
1.5	DISCUSSÃO	78
1.6	CONCLUSÕES	81
2	EXPERIMENTO 2: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE PROGESTERONA INJETÁVEL NO MOMENTO DA INSERÇÃO DO DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA EM VACAS NELORE (<i>Bos Indicus</i>) SUPEROVULADAS E INSEMINADAS EM TEMPO FIXO	82
2.1	HIPÓTESE	82
2.2	OBJETIVOS	83
2.3	MATERIAIS E MÉTODOS	84
2.3.1	Animais	84
2.3.2	Instalações e Manejo Nutricional	84
2.3.3	Protocolos para superovulação com inseminação artificial em tempo fixo	85
2.3.4	Avaliações ultra-sonográficas	87
2.3.5	Colheitas de embriões	87
2.3.6	Delineamento Experimental e Análise Estatística	87
3	RESULTADOS	88
4	DISCUSSÃO	91

5	CONCLUSÕES	93
3	EXPERIMENTO 3: EFEITO DO NÚMERO DE INSEMINAÇÕES NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES EM VACAS NELORE (<i>Bos indicus</i>) SUPEROVULADAS E INSEMINADAS EM TEMPO FIXO	94
3.1	HIPÓTESE	94
3.2	OBJETIVOS	95
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS	96
3.3.1	Animais	96
3.3.2	Instalações e Manejo Nutricional	96
3.3.3	Protocolos para superovulação com inseminação artificial em tempo fixo	97
3.3.4	Avaliações ultra-sonográficas	99
3.3.5	Colheitas de embriões	99
3.3.6	Delineamento Experimental e Análise Estatística	99
4	RESULTADOS	100
5	DISCUSSÃO	102
6	CONCLUSÕES	104
4	CONSIDERAÇÕES GERAIS	105
	REFERÊNCIAS	106

1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem demonstrado crescimento econômico da ordem de 3,5 % ao ano, boa parte desse desenvolvimento se deve ao potencial de expansão da agropecuária do país, sendo observado aumento significativo nos índices de produtividade do rebanho bovino nacional, de forma a suprir a demanda do mercado interno e ainda possibilitando a exportação de produtos de origem animal, principalmente carne e leite (CARDOSO, 2006).

Em nosso território, o rebanho de bovinos de corte é representado principalmente pela raça Nelore (*Bos indicus*) e seus cruzamentos, que perfazem cerca de 80% dos 136 milhões de cabeças pertencentes a esta categoria (CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL, 2005).

Por outro lado, na cadeia produtiva do leite, a raça Holandesa (*Bos taurus*) assume papel de destaque, sendo responsável por 70% da produção total nacional deste produto (CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL, 2005).

Entretanto, pesquisadores têm relatado disparidades na fisiologia reprodutiva entre *Bos indicus* e *Bos taurus*, entre elas: menor requerimento de dosagem de FSH em protocolos de superovulação para doadoras *Bos indicus* (FERNANDES, 2000); maior intervalo de tempo entre a aplicação de LH e a ovulação em vacas *Bos taurus* (GIMENES, 2006); maior concentração de IGF-I, com conseqüente maior recrutamento folicular no início da onda em vacas *Bos indicus* (ALVAREZ, 2000); e diferenças no tempo de duração do estro (REA, 1999).

A transferência de embriões em bovinos (TE) é a técnica mais utilizada em todo o mundo para multiplicar animais de alto valor genético (BÓ et al., 2004). A Sociedade Internacional de Transferência de embriões relatou as estatísticas da TE no mundo em 2002 (THIBIER, 2003), atentando para o aumento de 20% no número de embriões bovinos produzidos por múltipla ovulação. Esta tecnologia aumenta o número de descendentes obtidos de doadoras com alto valor genético sendo, portanto, utilizada para multiplicar material genético desejável. Os programas tradicionais de superovulação apresentam algumas limitações como: 1) necessidade de iniciar o

tratamento superovulatório em momento específico do ciclo estral; 2) necessidade de detecção do cio para inseminação das fêmeas superovuladas; 3) baixa consistência na produção de embriões viáveis por doadora; 4) cerca de 20 a 30% das doadoras não produzem embriões (BARUSELLI et al., 2005).

O intenso progresso observado na sincronização do crescimento folicular e da ovulação e na manipulação do ciclo estral tem facilitado o emprego da inseminação artificial, da transferência de embriões e da OPU-PIV. Esse avanço tem colaborado para rápida difusão de material genético superior, seja com finalidade de produção de carne ou de leite. Isto foi possível graças às pesquisas em áreas básicas, especialmente às relacionadas à fisiologia reprodutiva. Compreender os fenômenos fisiológicos associados ao crescimento folicular e à ovulação é fundamental para otimizar as biotécnicas da reprodução e, conseqüentemente, a eficiência reprodutiva dos rebanhos (BARUSELLI et al., 2005).

Existem particularidades reprodutivas de *Bos indicus* e de *Bos taurus* que devem ser levadas em consideração quando do emprego de técnicas de manejo, de inseminação artificial, de transferência de embriões e de aspiração folicular guiada por ultra-som aliada à produção *in vitro* de embriões (BARUSELLI et al., 2005).

O objetivo deste trabalho é adequar os protocolos de superestimulação ovariana em doadoras *Bos indicus* e *Bos taurus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS DO ESTRO COMPORTAMENTAL

Durante a fase do estro, as fêmeas bovinas apresentam manifestações comportamentais caracterizadas por imobilidade durante a monta, comportamento homossexual, mugidos freqüentes, intensa movimentação, aumento na freqüência de micção, entre outras características. Por um longo período estes sinais foram e ainda são empregados para a detecção convencional do estro. Contudo, as características do estro são influenciadas por uma série de fatores, entre os principais: idade (DE SILVA et al., 1981), produção de leite (VAN VLIET; VAN EERDENBURG, 1996), condições ambientais (WHITE et al., 2002) e fatores sociais, como hierarquia (GALINA et al., 1994, revisado em LANDAETA-HERNÁNDEZ¹ et al., 2004). Adicionalmente, existem diferenças observadas entre raças, e embora ainda não completamente elucidadas, entre grupos genéticos (REA et al., 1999).

Fêmeas *Bos indicus* geralmente apresentam estro de duração mais curta (aproximadamente 10 horas), o que dificulta sua detecção (GALINA; ARTHUR, 1990, revisado em BÓ et al., 2003). Somado a este fator, mais de 50% dos animais desse grupo genético iniciam a manifestação de cio no período noturno (entre 18:00 e 6:00 h); sendo que cerca de 30% iniciam e encerram o estro durante a noite (PINHEIRO et al., 1998), dificultando o manejo e reduzindo a eficácia da detecção de cio. Em condições brasileiras de manejo, o comportamento reprodutivo de vacas de corte foi avaliado com auxílio de radiotelemetria (Heat-Watch). Verificou-se que a duração do estro em *Bos indicus* é menor do que em *Bos taurus* ($12,9 \pm 2,9$ horas em Nelore vs. $16,3 \pm 4,8$ horas em Angus; MIZUTA, 2003). Apesar disso, o intervalo entre o estro e a ovulação não apresentou diferenças entre estas duas raças (Nelore, $27,1 \pm 3,3$ horas vs. Angus, $26,1 \pm 6,3$ horas). No entanto, estudos recentes indicam que vacas Holandesa (*Bos*

taurus) de alta produção também apresentam estro de curta duração. Existem relatos de que há uma relação negativa entre a produção de leite e a duração do estro (WILTBANK et al., 2006). Esses autores especulam que vacas de alta produção (acima de 40kg de leite por dia) apresentam diminuição das concentrações circulantes de estradiol, decorrente do aumento do metabolismo desse esteróide (WILTBANK et al., 2006). Esses dados são indicativos de que é necessário conhecer as características do estro comportamental e da ovulação para implantar eficientes programas de detecção de cio, levando em consideração as diferenças entre *Bos indicus* e *Bos taurus*.

2.2 DESENVOLVIMENTO FOLICULAR

O desenvolvimento folicular em bovinos ocorre em um padrão de ondas, sendo que cada onda de crescimento folicular é caracterizada por um grupo de pequenos folículos que são recrutados (emergência folicular) e iniciam uma fase de crescimento comum por cerca de três dias (GINTHER et al., 2003). Destes, apenas um continua seu desenvolvimento (folículo dominante), enquanto os outros sofrem decréscimo de tamanho (folículos subordinados; LUCY et al., 1992), estabelecendo-se então, o fenômeno da divergência folicular. Após a divergência, e na presença de altos níveis de progesterona, que promove redução da frequência na pulsatilidade de LH, o folículo dominante torna-se anovulatório. A partir desse momento começa o processo de atresia e perda da dominância, dando início a uma nova onda de crescimento folicular (GINTHER et al., 1989; WEBB et al., 1999). Contrariamente, o folículo dominante presente no momento da regressão luteínica culmina na ovulação (FORTUNE et al., 2004).

Existem diferenças na dinâmica folicular entre *Bos taurus* e *Bos indicus*. Uma particularidade observada entre zebuínos e taurinos diz respeito ao número de ondas de crescimento folicular por ciclo estral. Estudos realizados em animais da raça Holandesa demonstraram predominância de duas e três ondas de

crescimento folicular por ciclo estral (SAVIO et al., 1988; SIROIS; FORTUNE, 1988; GINTHER et al., 1989; WOLFENSON et al., 2004). Contudo, em zebuínos existem relatos que descrevem maior incidência de 3 ondas, sendo notificada a presença de até 4 ondas de crescimento folicular por ciclo estral (Brahman – RHODES et al., 1995; Nelore – FIGUEIREDO et al., 1997; Gir – VIANA et al., 2000).

Além da diferença no número de ondas, existem trabalhos que descrevem que fêmeas *Bos indicus* recrutam maior número de folículos por onda de crescimento folicular que fêmeas *Bos taurus* ($33,4 \pm 3,2$ vs. $25,4 \pm 2,5$; CARVALHO et al., 2007). Essa característica tem influência direta na eficiência da técnica de transferência de embriões e de OPU-PIV, indicando vantagem de fêmeas zebuínas sobre taurinas. Existem relatos de que o número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular apresenta diferenças entre indivíduos, e essa característica possui alta repetibilidade durante a vida reprodutiva da fêmea (BONI et al., 1997).

Esse aumento do número de folículos presentes nos ovários pode estar relacionado ao sistema IGF. Existem evidências de que o sistema IGF difere entre grupos genéticos. Estudos realizados com vacas Brahman foram sugestivos de que esses animais apresentam maiores concentrações plasmáticas de IGF-I (SIMPSON et al., 1994; ALVAREZ et al., 2000) e menores concentrações de FSH quando comparadas com vacas Angus (ALVAREZ et al., 2000). Alguns autores levantaram a hipótese de que o maior número de folículos presentes no ovário de *Bos indicus* pode ser devido à elevada concentração de IGF-I, mesmo na presença de baixos níveis de FSH (BÓ et al., 2003). Essa diferença nas concentrações de FSH e de IGF-I pode explicar a maior sensibilidade ao tratamento superovulatório em doadoras *Bos indicus* (BARROS; NOGUEIRA, 2001). Existem relatos que confirmam que é possível reduzir consideravelmente a dose de FSH para superovular fêmeas Nelore, empregando doses inferiores às usualmente utilizadas para *Bos taurus* (BARUSELLI et al., 2003).

A divergência (ou desvio) folicular é definida pela diferença nas taxas de crescimento entre os dois maiores folículos, sendo marcada pela continuidade no

desenvolvimento do maior folículo e declínio ou parada no crescimento dos outros (GINTHER et al., 1996, 2001). Em bovinos da raça Holandesa (*Bos taurus*), o desvio tem início por volta do dia 2,8 após a emergência, quando o folículo dominante atinge em média 8,5 mm e o folículo subordinado 7,2 mm (GINTHER et al., 1996). Já, em novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*), descreve-se período de 2,5 a 2,7 dias após a ovulação (GIMENES et al., 2005b; SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2006).

Embora não se tenha testado simultaneamente, os diâmetros do folículo dominante e subordinado parecem ser menores em *Bos indicus* do que em *Bos taurus*. Para *Bos indicus*, não há grande variação descrita quanto ao diâmetro do folículo subordinado (5,3 a 5,9 mm; GIMENES et al., 2005b; SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2006) e do folículo dominante (5,4 a 6,2 mm; GIMENES et al., 2005b; SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2006). Resumidamente, os dados de literatura são indicativos de que a divergência folicular em *Bos indicus* ocorre com diâmetros inferiores aos reportados para *Bos taurus*.

Contudo, apesar de relatos sobre a aquisição de receptores de LH pelo folículo dominante no momento da divergência, existem estudos demonstrando que este folículo ainda não é responsivo a um indutor de ovulação. Sartori et al. (2001) verificaram que a capacidade ovulatória em vacas Holandesas ocorre somente após os folículos alcançarem 10 mm de diâmetro. Recentemente foi realizado um experimento a fim de verificar o diâmetro no qual os folículos de novilhas *Bos indicus* (Nelore, Gir e cruzadas Nelore x Gir) adquirem capacidade ovulatória (GIMENES et al., 2005a). As fêmeas foram tratadas com 25 mg de LH quando o folículo dominante atingiu os seguintes diâmetros: 7,0 a 8,4 mm; 8,5 a 10,0 mm e >10,0 mm. Constatou-se que 33% das fêmeas *Bos indicus* ovularam com diâmetros entre 7,0 e 8,4 mm, e que essa responsividade ao LH aumentou quando os folículos alcançaram diâmetros entre 8,5 e 10,0 mm (80%) e superiores a 10,0 mm (90%). Esses dados são sugestivos de que a capacidade ovulatória em *Bos indicus* é adquirida com diâmetros inferiores aos observados em *Bos taurus*.

Estudos recentes sobre sincronização da ovulação em doadoras *Bos indicus* (Nelore) e *Bos taurus* (Holandês) parecem corroborar com a afirmação

acima (RODRIGUES et al., 2005; BARUSELLI et al., 2006). No trabalho de Rodrigues et al. (2005) as doadoras foram tratadas com implante auricular de progestágeno e divididas para receber GnRH, 12 ou 24 horas após a última aplicação de FSH. Foram realizadas duas inseminações artificiais 12 e 24 horas após o tratamento com LH. Em doadoras da raça Holandesa, a administração do indutor de ovulação 24 horas após o último FSH resultou em aumento na resposta ovulatória e maior número de embriões transferíveis do que doadoras tratadas com LH 12 horas após o último FSH (RODRIGUES et al., 2005; BARUSELLI et al., 2006)..

Outra diferença fisiológica entre *Bos taurus* e *Bos indicus* está relacionada ao diâmetro máximo alcançado pelo folículo dominante em cada onda de crescimento folicular. Em *Bos taurus* com duas ondas são descritos diâmetros de 17,1 e 16,5 mm para a primeira e segunda onda (GINTHER et al., 1989). Já, em *Bos indicus*, os diâmetros relatados foram de 11,3 e 12,1 mm, respectivamente (FIGUEIREDO et al., 1997). Para animais com três ondas de crescimento folicular os diâmetros máximos foram de 16,0; 12,9 e 13,9 mm para *Bos taurus* (GINTHER et al., 1989) e de 10,4; 9,4 e 11,6 mm para *Bos indicus* (FIGUEIREDO et al., 1997). A partir desses relatos pode-se verificar que o diâmetro do folículo dominante e do folículo ovulatório em zebuínos é menor do que em taurinos.

Também, o diâmetro do corpo lúteo parece ser menor em *Bos indicus* do que em *Bos taurus*. Corpos lúteos de zebuínos variam de 17 a 21 mm de diâmetro (RHODES et al., 1995; FIGUEIREDO et al., 1997), ao passo que em taurinos são relatados diâmetros entre 20 e 30 mm (GINTHER et al., 1989; KASTELIC et al., 1990).

Da mesma maneira, há relatos de que a concentração de progesterona produzida pelo CL também é inferior em zebuínos (SEGERSON et al., 1984). Segundo Randel (1976) fêmeas zebuínas puras e cruzadas apresentam menor concentração de progesterona por grama de tecido luteínico do que fêmeas taurinas.

Carvalho et al., (2007) realizaram estudo com sincronização de ovulação em novilhas *Bos indicus* (Nelore e Gir), *Bos taurus* (Angus e Holandês) e cruzadas

Bos indicus x *Bos taurus* (Nelore x Angus e Gir x Holandês), mantidas contemporaneamente durante o período experimental. O protocolo consistiu no emprego de dispositivo intravaginal de progesterona e Benzoato de estradiol no início do tratamento. Durante a permanência do dispositivo intravaginal, as concentrações de progesterona sérica foram estatisticamente superiores e permaneceram mais elevadas em novilhas *Bos indicus*. Os autores discutem que esse achado pode ser decorrente da diferença de metabolismo entre esses grupos genéticos, atribuindo menor velocidade metabólica em zebuínos.

Esse resultado deve ser levado em consideração quando do emprego de tratamentos com progesterona em *Bos indicus*. Elevadas concentrações de progesterona diminuem a pulsatilidade de LH e podem comprometer o crescimento folicular e a ovulação.

2.3 FISIOLOGIA DO PÓS-PARTO

A duração da gestação em *Bos indicus* (292 dias em média) é mais longa que a de *Bos taurus* (282 dias em média; PASCHAL et al., 1991). Portanto, para obtenção de intervalo entre partos de 12 meses, o período de serviço (intervalo parto/concepção) em *Bos indicus* deve ser 10 dias inferior ao de *Bos taurus*, para que a eficiência reprodutiva seja semelhante.

Após o parto, a fêmea bovina tem que criar um bezerro saudável e em seguida restabelecer uma nova gestação. O padrão de desenvolvimento folicular ovariano que prevalece durante a gestação deverá agora ser substituído por uma sequência de eventos que culminará no comportamento de cio, seguido de ovulação e formação de um corpo lúteo normal. Esses requisitos são necessários para o restabelecimento da fertilidade no período pós-parto nos diversos tipos de criação (RHODES et al., 2003). No entanto, o que se observa em muitos casos é um longo período de anestro pós-parto, tanto em *Bos indicus* quanto em *Bos*

taurus, apesar de haver crescimento folicular durante essa fase (WILTBANK et al., 2002).

Existem pesquisas que indicam que logo após o parto, verifica-se baixa quantidade de LH armazenado na hipófise, sendo essa característica fisiológica limitante para o restabelecimento da atividade ovariana no período pós-parto. Nesse período não foram relatadas alterações na liberação de FSH (YAVAS; WALTON, 2000).

No final da gestação ocorre diminuição da concentração de gonadotrofinas devido à intensa retroalimentação negativa da progesterona e do estrógeno. Logo após o parto, verifica-se elevação das concentrações de FSH e, conseqüentemente, emergência da primeira onda de crescimento folicular (2-7 dias após o parto; WILTBANK et al., 2002). No entanto, para que ocorra a ovulação do folículo dominante, a frequência dos pulsos de LH deve ser de aproximadamente 1 pulso por hora (revisado em BÓ et al., 2003). A ausência ou a inadequada pulsatilidade de LH faz com que essas estruturas não se desenvolvam além do diâmetro da divergência folicular. Wiltbank et al. (2002) especulam que zebuínos podem apresentar deficiência de FSH no período pós-parto. Os autores se basearam no estudo de Ruiz Cortez e Olivera-Angel (1999) no qual se verificou que folículos de vacas zebuínas não alcançavam diâmetros superiores a 6 mm durante o anestro pós-parto.

Contudo, em estudos recentes sobre divergência folicular em Nelore (GIMENES et al., 2005b; SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2006), constatou-se que o folículo de *Bos indicus* atinge a dominância em torno de 6 mm de diâmetro, menor do que o relatado para *Bos taurus* (8,5 mm). Portanto, condições anovulatórias freqüentemente verificadas em zebuínos não parecem estar associadas à deficiência de FSH, que promove o crescimento até a divergência. Esses dados são sugestivos de que o anestro pós-parto em zebuínos está ligado ao comprometimento da liberação de LH, responsável pela continuidade do crescimento e indução da ovulação do folículo dominante. Sendo assim, especula-se que em fêmeas zebuínas em anestro severo, com comprometimento na liberação de LH, os folículos não atingem diâmetros

superiores a 6 mm. Já, em fêmeas taurinas nas mesmas condições de anestro os folículos crescem até 8,5 mm de diâmetro.

Quanto ao padrão de liberação do LH no período pós-parto, existem indícios de que zebuínos e taurinos apresentem diferenças nas concentrações plasmáticas dessa gonadotrofina. Em um experimento, D'Occhio et al. (1990) observaram que, aos 30 dias pós-parto, vacas *Bos taurus* (Hereford x Shorthorn) apresentavam maior concentração plasmática de LH ($0,7 \pm 0,1$ ng/ml) do que vacas *Bos indicus* ($0,6 \pm 0,1$ ng/ml; Brahman). Essa diferença parece aumentar à medida que se distancia do parto. Nesse mesmo estudo, constatou-se que vacas *Bos taurus* tiveram maior secreção pulsátil de LH e taxa de prenhez entre 50 e 120 dias após o parto que vacas *Bos indicus*. Estudos realizados com finalidade de sincronizar a ovulação para IATF no período pós-parto em *Bos indicus* são indicativos de que o tratamento com eCG (que age estimulando os receptores de FSH e LH) apresenta significativo aumento na taxa de concepção, quando comparado aos animais não tratados (BARUSELLI et al., 2004). Especula-se que esse incremento se deve ao estímulo gonadotrófico da eCG, que aumenta as taxas de crescimento e de ovulação do folículo dominante de vacas *Bos indicus* em anestro. Vacas *Bos indicus* no período pós-parto apresentam comprometimento na pulsatilidade de LH e no crescimento do folículo dominante. Outro aspecto positivo do tratamento com eCG é o efeito luteotrófico desse fármaco. Existem trabalhos que apontam aumento significativo das concentrações circulantes de progesterona produzidas pelo CL formado após o tratamento com eCG (BARUSELLI et al., 2004). Vários trabalhos associam o aumento da concentração plasmática de progesterona com o desenvolvimento embrionário e o estabelecimento da gestação (BINELLI et al., 2001).

Após o restabelecimento dos estoques hipofisários de LH (15 a 30 dias de pós-parto; YAVAS; WALTON, 2000), os principais fatores que comprometem a ovulação é a condição nutricional e a amamentação (MONTIEL; AHUJA, 2005).

Quanto à nutrição, sabe-se que animais criados em regiões tropicais apresentam comprometimento na atividade ovariana pós-parto devido ao inadequado conteúdo energético fornecido pelas pastagens. Dessa maneira, a

energia ingerida pelo animal é priorizada para funções vitais de manutenção e de produção de leite, em detrimento das funções reprodutivas (revisado em MONTIEL; AHUJA, 2005). Os efeitos resultantes do comprometimento nutricional são a supressão na liberação de GnRH e, conseqüentemente, diminuição na frequência dos pulsos de LH (SCHILLO, 1992), reduzindo o diâmetro máximo do folículo dominante e a duração da onda de crescimento folicular (RHODES et al., 1995; WILTBANK et al., 2002). De acordo com esses achados, a avaliação do escore de condição corporal (ECC) e da nutrição do rebanho tornam-se importantes ferramentas do manejo reprodutivo (MONTIEL; AHUJA, 2005).

Outro fator que pode inibir a ovulação no pós-parto é a amamentação, por reduzir a liberação de GnRH e a secreção de LH (WILLIAMS, 1990). Essas alterações fisiológicas podem afetar a maturação final e ovulação do folículo dominante. Além do ato de amamentar, o olfato, a visão, o estímulo tátil e a audição podem também induzir essas alterações fisiológicas (WILLIAMS et al., 1996). Para atenuar o efeito da presença do bezerro, realiza-se desmame total, parcial (permitir ao bezerro acesso à mãe uma ou duas vezes ao dia) ou temporário (remoção do bezerro durante 48 a 96h; revisado em YAVAS; WALTON, 2000; MONTIEL; AHUJA, 2005). Essas técnicas de manejo podem ser empregadas para aumentar a pulsatilidade de LH e promover o crescimento folicular e a ovulação de rebanhos em anestro, isoladamente ou em conjunto com tratamentos hormonais.

Os dados acima apresentados demonstram a importância do conhecimento das particularidades da fisiologia reprodutiva de *Bos indicus* e de *Bos taurus* para implementar biotécnicas que buscam a multiplicação de indivíduos geneticamente superiores e a melhoria da eficiência reprodutiva.

2.4 FATORES QUE AFETAM A RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA EM BOVINOS

A variabilidade na resposta das doadoras ao tratamento superovulatório com gonadotrofinas continua a ser um dos maiores problemas nos programas comerciais de TE (NOGUEIRA et al., 2002; MAPLETOFT et al., 2002; BARROS; NOGUEIRA, 2004). Esta variação individual ao tratamento superovulatório foi também relatada em vacas Nelore (*Bos indicus*) utilizando delineamento experimental “cross over” (BARUSELLI et al., 2003). Os autores descrevem efeito significativo ($p < 0,05$) de doadora no número de corpos lúteos (CLs) no dia da colheita, na taxa de recuperação, no total de estruturas recuperadas e no número de embriões transferíveis e congeláveis, indicando que a doadora foi a principal fonte de variação dos resultados.

A resposta ovariana também está relacionada aos diferentes protocolos superovulatórios, bem como o tipo, partida ou dose total de gonadotrofina e do momento do início do tratamento. Existem outros importantes fatores que podem influenciar a resposta superovulatória, tais como: o status nutricional, idade, histórico reprodutivo, estação do ano e status ovariano no momento do início do tratamento (KAWAMATA, 1994; YAAKUB et al., 1999; MAPLETOFT et al., 2002).

No protocolo tradicional de superestimulação ovariana, o tratamento com gonadotrofinas é iniciado na metade do ciclo estral (8-12 dias após ovulação). Esta metodologia apresenta algumas dificuldades por requerer a detecção do “cio base” para o início do tratamento superovulatório. Essa característica pode afetar a eficiência dos protocolos de superestimulação ovariana (MAPLETOFT et al., 2002).

Diversos estudos têm demonstrado a importância do momento do início do tratamento superovulatório e o início da onda de crescimento folicular. A ausência do folículo dominante no início do tratamento com gonadotrofinas, aumenta a eficiência dos programas de superestimulação ovariana (ADAMS et al., 1994; MAPLETOFT et al., 2002). Nasser et al. (1993) obtiveram maior número de

folículos recrutados e maior taxa de ovulação quando o tratamento superovulatório foi realizado um dia antes ou no dia de início da emergência da onda de crescimento folicular que os tratamentos realizados um ou dois dias após o início da onda.

Sendo assim, alternativas para o controle da emergência da onda de crescimento folicular em momentos aleatórios do ciclo estral, sem a necessidade de detecção do estro para o estabelecimento do “cio base”, podem facilitar o manejo de doadoras, bem como possivelmente aumentar a eficiência dos programas de transferência de embriões em rebanhos zebuínos e taurinos.

2.5 CONTROLE DA DINÂMICA FOLICULAR PARA A SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA EM BOVINOS

Nos últimos 10 anos foram desenvolvidos alguns métodos para controlar o início da onda de crescimento folicular em bovinos. Entre estes se pode citar métodos mecânicos (remoção física do folículo dominante; BERGFELT et al., 1994, 1997; MARTINEZ et al., 2000) e métodos farmacológicos como o GnRH (PURSLEY et al., 1995) ou a associação de estrógeno e progesterona/progestágenos (BÓ et al., 1993, 1995). Estes métodos têm sido empregados com êxito para promover o início da onda de crescimento folicular em intervalo de tempo conhecido.

Em novilhas *Bos taurus* x *Bos indicus*, Baruselli et al., (2003a) observaram que a aplicação de GnRH em momentos aleatórios do ciclo estral induz a ovulação em apenas 45,7% (16/35) das fêmeas. Estas baixas taxas de ovulação, freqüentemente observadas em animais *Bos indicus* criados a pasto (BARUSELLI et al., 2004), questiona o emprego do GnRH para sincronizar a emergência folicular.

Em *Bos indicus*, o tratamento eletivo para a indução da emergência da nova onda de crescimento folicular é a associação de estradiol (E2) e progesterona (P4). A eficiência desta associação tem sido descrita em diversos trabalhos em fêmeas *Bos taurus* (BÓ et al., 1991, 1993, 1994, 1995; MARTINEZ et al., 2000; COLAZO et al., 2003, 2005). Carvalho (2004) estudou o efeito do tratamento com estradiol e progesterona na emergência da onda folicular em novilhas *Bos indicus*, *Bos taurus indicus* e *Bos taurus* mantidas nas mesmas condições de manejo. Não se observou diferença no intervalo entre o tratamento com Benzoato de estradiol e a emergência folicular entre *Bos indicus*, *Bos taurus indicus* e *Bos taurus*. Entretanto, novilhas *Bos indicus* apresentaram maior número de folículos recrutados no início da onda de crescimento folicular que novilhas *Bos taurus*, sugerindo maior resposta superestimulatória ovariana ao tratamento com gonadotrofinas em fêmeas *Bos indicus*.

Diferentes tipos de ésteres de estradiol, incluindo o Benzoato de estradiol (BE), Valerato de estradiol (VE) e Cipionato de estradiol (CE) estão disponíveis comercialmente na América do Sul. Todos estes ésteres são capazes de induzir a regressão de folículos antrais quando administrados na presença de elevadas concentrações de progesterona (BÓ et al., 1995). O Valerato de estradiol e o Cipionato de estradiol apresentam meia vida longa, resultando na indução de uma nova onda folicular mais tardia e menos sincronizada (BÓ et al., 1995; COLAZO et al., 2003, 2005) que o 17 β estradiol (BÓ et al., 1995) ou o Benzoato de estradiol (BÓ et al., 2002). Em trabalho recente, Sá Filho et al. (2005) avaliaram a administração de 2 mg de BE no momento da inserção do implante auricular contendo 3mg de Norgestomet (Crestar, Intervet, Brasil) ou do dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR; Pfizer, Brasil) em novilhas *Bos indicus*. O intervalo entre o tratamento e a emergência da nova onda folicular não foi influenciado pelo tratamento com CRESTAR ($2,9 \pm 0,1$ dias) ou com CIDR ($3,1 \pm 0,1$ dias). Em outro recente estudo (SÁ FILHO et al., 2006; *in press*) avaliaram o efeito do BE ou de duas diferentes doses de VE no momento e na sincronização da emergência da onda folicular em vacas e novilhas *Bos indicus* tratadas com implante auricular de Norgestomet. Foi observado efeito significativo de

tratamento, no entanto, não foi observada interação entre tratamento e categoria animal (vaca ou novilha) para o intervalo e dispersão do momento da indução da emergência da nova onda de crescimento folicular.

Estudos recentes avaliaram a necessidade do uso da progesterona injetável no início do tratamento com dispositivo intravaginal de progesterona (DIB) em vacas Nelore (*Bos indicus*). Martins et al. (2005) observaram maior sincronização na emergência e atraso no dia de início da onda de crescimento folicular quando se utilizou a associação progesterona injetável mais BE ($4,2 \pm 0,1^{a,y}$) que em animais que receberam somente BE no início do tratamento com dispositivos intravaginais novos ($3,1 \pm 0,2^{b,x}$) ou reutilizados ($2,8 \pm 0,2^{b,x}$; usados uma vez). Este estudo concorda com o descrito para fêmeas *Bos taurus* (MORENO et al., 2001). Em outro estudo Sá Filho et al., (2005a) testaram o efeito de diferentes doses (2 ou 3 mg) e/ou momentos (Dia 0 ou Dia 1) da aplicação de BE ou a associação de BE mais progesterona injetável no início do tratamento com dispositivo intravaginal de progesterona (Dia 0) em vacas Nelore. O tratamento com BE+P4 no Dia 0, apresentou melhor sincronização da emergência da onda de crescimento folicular ($4,0 \pm 0,0^{ab,y}$) que os tratamentos com apenas BE (2mg no D0= $3,6 \pm 0,2^{b,x}$; 2mg no D1= $4,3 \pm 0,2^{a,x}$; 3mg no D0= $4,0 \pm 0,2^{ab,x}$ e 3mg no D1 $4,2 \pm 0,3^{a,x}$). Portanto, pode-se concluir que o tratamento com Benzoato de estradiol associado a progesterona injetável no início do tratamento promove menor dispersão do momento do início da emergência da nova onda folicular.

2.6 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM PROGRAMAS DE SUPEROVULAÇÃO

Mesmo com a possibilidade do controle da onda de crescimento folicular para o início do tratamento superovulatório, o momento da inseminação artificial continua dependente da detecção do estro. A manifestação do estro em *Bos indicus* apresenta grande variabilidade devido principalmente a peculiaridades

como: curto período de aceitação de monta e alta incidência de cios noturnos (BO et al., 2003), o que aumenta a possibilidade de erros na detecção e dificulta a programação prévia da data da colheita dos embriões. Sendo assim, diversos estudos têm procurado avaliar a possibilidade do controle farmacológico da ovulação, com o objetivo de viabilizar a inseminação artificial em tempo fixo de fêmeas *Bos indicus* superovuladas (NOGUEIRA et al., 2002; ZANENGA et al., 2003; BARUSELLI et al., 2003).

Em vacas Nelore, Nogueira et al. (2003) demonstraram a possibilidade da inseminação artificial em tempo fixo em vacas *Bos indicus* superovuladas. Neste estudo os autores utilizaram durante os protocolos de superovulação dispositivo intravaginal de P4 (CIDR), que foi removido 36 horas após a administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$ (P-36) e a ovulação induzida 12 horas após a remoção do dispositivo (48h após a $\text{PGF}_{2\alpha}$) utilizando LHp (Lutropin-V, Bioniche Animal Health, Canadá). As ovulações ocorreram entre 24 e 36 h após o tratamento com LHp e as inseminações em tempo fixo foram realizadas 12 e 24 h após o LHp.

Zanenga et al. (2003) delinearam um experimento para avaliar a retirada antecipada do dispositivo de P4 em vacas Nelore superovuladas e inseminadas em tempo fixo (IATF). Para isso, foram utilizadas dez vacas Neloeres mantidas a pasto em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, divididas ao acaso em dois tratamentos. As doadoras foram superovuladas utilizando delineamento “cross-over”, e o tratamento foi invertido após 35 dias. No primeiro grupo (P24) o CIDR foi retirado 24 horas após a aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$, administrada juntamente com a sexta dose de FSH. Administrou-se 25 mg de LHp (Lutropin, Vetrepharm, Canadá) 48 horas após a $\text{PGF}_{2\alpha}$. O segundo grupo (P36) recebeu protocolo semelhante ao do primeiro, exceto a retirada do CIDR, que foi realizada 36 horas após a administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Todas as doadoras foram inseminadas 12 e 24 horas após o LH. Sete dias após o tratamento com LH foram realizadas a colheita e a classificação dos embriões.

Os resultados são sugestivos de que a retirada do dispositivo de progesterona 24 ou 36 após a administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$, seguido da indução da

ovulação com LH (48h após a PGF2 α) com a IATF 12 e 24 horas após o LH é um protocolo viável para programas de superovulação e transferência de embriões em *Bos indicus*, eliminando a necessidade de detecção de estro e possibilitando a programação precisa das atividades de sincronização, de colheita e transferência dos embriões.

2.7 EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE PROGESTERONA INJETÁVEL AO BENZOATO DE ESTRADIOL NO INÍCIO DO PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO

Como discutido anteriormente, o tratamento com Benzoato de estradiol associado a progesterona injetável no início do tratamento com dispositivo intravaginal de progesterona promove menor dispersão do momento da emergência da nova onda folicular em fêmeas *Bos indicus* (MARTINS et al., 2005; SÁ FILHO et al., 2005;). Nasser et al. (1993) obtiveram maior número de folículos recrutados e maior taxa de ovulação quando o tratamento superovulatório foi realizado um dia antes ou no dia de início da emergência da onda de crescimento folicular que os tratamentos realizados um ou dois dias após o início da onda. Neste sentido, estudos adicionais deverão ser realizados para avaliar o efeito da associação entre início da onda folicular e o início do tratamento superestimulatório em doadoras Nelore.

2.8 SUPEROVULAÇÃO NA PRIMEIRA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR

Nasser et al. (1993) utilizando novilhas *Bos taurus*, demonstraram que é possível obter satisfatória resposta superovulatória na primeira onda de desenvolvimento folicular, iniciando o tratamento superovulatório próximo ao pico endógeno de FSH, responsável pelo recrutamento folicular. A idéia de se utilizar à

primeira onda em relação às outras ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral é que o dia do estro e da ovulação poderiam ser determinados de maneira mais consistente para prever a emergência da onda e o início do tratamento superovulatório. Adams et al. (1994) compararam a resposta à superovulação durante a primeira e a segunda onda de crescimento folicular em novilhas *Bos taurus* e verificaram resultados equivalentes entre os grupos no número de estruturas recuperadas ($5,2 \pm 0,7$ vs $5,1 \pm 0,8$) e no número de embriões fertilizados ($2,8 \pm 0,6$ vs $3,0 \pm 0,6$).

Recentemente Nasser et al. (2003) avaliaram a utilização da primeira onda de crescimento folicular para a superovulação de vacas Nelore (*Bos indicus*). Objetivou-se comparar a eficiência dessa metodologia com os protocolos que utilizam associação de estrógeno e progesterona para induzir a emergência de uma nova onda de crescimento folicular. Avaliou-se também, a necessidade do tratamento com progesterona durante a superovulação na primeira onda de crescimento folicular. Diferentemente do primeiro trabalho de superovulação na primeira onda de crescimento folicular (Nasser et al., 1993) os animais dessa investigação tiveram a ovulação induzida por LH exógeno.

Pode-se concluir que é possível superovular vacas Nelore na primeira onda de crescimento folicular, desde que suplementadas com progesterona exógena durante o tratamento superovulatório. Estes resultados discordam dos encontrados anteriormente por Nasser et al. (1993) em *Bos taurus*, que não empregaram suplementação exógena com progesterona durante o tratamento superovulatório e obtiveram resultados comparáveis ao protocolo tradicional. Os dados indicam que possivelmente exista diferença na resposta superovulatória entre *Bos taurus* e *Bos indicus*.

2.9 USO DE DIFERENTES DOSES DE FSH PARA SUPEROVULAÇÃO

Dentre as diferenças fisiológicas e comportamentais entre *Bos indicus* e *Bos taurus* destaca-se a reduzida capacidade para secreção de LH e maior sensibilidade de vacas *Bos indicus* a gonadotrofinas exógenas (RANDEL, 1984)

Em um experimento realizado por Baruselli et al. (2003), objetivou-se avaliar a resposta superovulatória de vacas Nelore a diferentes doses de FSH (Folltropin-V, Vetrepfarm, Canadá), foram utilizados 23 animais tratados com 3 diferentes doses (100, 133, ou 200mg) durante o protocolo de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo (P24). Empregou-se o delineamento experimental “cross-over” para se evitar o efeito individual na resposta aos tratamentos. Os resultados para embriões transferíveis foram respectivamente $7,7 \pm 7,4$; $5,6 \pm 4,1$ e $6,5 \pm 7,7$ para os grupos 100, 133 e 200 mg.

CAPÍTULO I

Protocolo de Superovulação com IATF em *Bos taurus*

1. EXPERIMENTO 1: PRODUÇÃO DE EMBRIÕES DE VACAS HOLANDESAS A DIFERENTES PROTOCOLOS DE SUPEROVULÇÃO COM INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

1.1 HIPÓTESE

A hipótese do presente experimento é de que o atraso na remoção do dispositivo de progesterona e na administração de LH aumenta a produção de embriões em vacas *Bos taurus* submetidas ao protocolo de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

- Adequar o protocolo de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo para vacas Holandesas (*Bos taurus*) de alta produção.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Acompanhar a resposta superovulatória de vacas holandesas submetidas à remoção do dispositivo intravaginal de progesterona e à administração de LH em diferentes momentos;
- Avaliar a sincronização da ovulação dos diferentes protocolos;
- Avaliar a produção de embriões nos diferentes protocolos;
- Avaliar a correlação entre o número de folículos recrutados no início da onda de crescimento folicular, a resposta superovulatória e a produção de embriões nos diferentes protocolos.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizadas 16 vacas da raça Holandesa, puras de origem (PO, Figura 1), com idade e peso médios, respectivamente, de quatro anos e meio e 530 kg, paridas a no mínimo há 100 dias e com produção leiteira diária média de $32,0 \pm 4,5$ kg.

Figura 1 - Rebanho de vacas Holandesas da Escola Agrotécnica Federal de Muzambinho utilizadas no experimento

3.2 Instalações e Manejo Nutricional

Os animais, pertencentes à Unidade de Educação e Produção UEP – Zootecnia III da Escola Agrotécnica Federal de Muzambinho, sul de Minas Gerais, foram mantidos sob as mesmas condições de ambiente e alimentação, em sistema de confinamento “*Loosing House*”, recebendo dieta total balanceada de acordo com as exigências de manutenção e produção, fornecidas pelo NRC (2001).

3.3 Protocolos de sincronização para superovulação e inseminação artificial em tempo fixo

Os animais foram tratados no dia -1 (D-1) com dispositivo intravaginal contendo P₄ (DIB[®], 1 g de P₄, SYNTEX, Buenos Aires, Argentina) e 2 mg de benzoato de estradiol (RIC BE[®], SYNTEX, Buenos Aires, Argentina) intramuscular um dia após a inserção do dispositivo (D0). As vacas foram submetidas a tratamento para superovulação com FSHp – Hormônio Folículo Estimulante - (FOLLTROPIN-V[®], Bioniche, Bellenville, Ontário, Canadá), com 200mg por animal, diluídas em 20 ml de solução fisiológica, de modo a receber a dose em 2 injeções diárias, uma pela manhã e outra no período da tarde, em doses decrescentes, durante quatro dias, a partir do dia 4 do protocolo, totalizando oito aplicações, conforme tabela 1.

Tabela 1 – Protocolo de superovulação com 200mg de FSH em vacas holandesas

Dia do protocolo	Manhã (7:00 horas)	Tarde (19:00 horas)
4	20% da dose total de FSH	20% da dose total de FSH
5	15% da dose total de FSH	15% da dose total de FSH
6	10% da dose total de FSH	10% da dose total de FSH
7	5% da dose total de FSH	5% da dose total de FSH

No D6 os animais receberam duas aplicações de 0,15 mg de D-cloprostenol (PGF; manhã e tarde; PROLISE[®] ARSA, Buenos Aires, Argentina). Nas vacas do grupo P24/LH48 o dispositivo foi retirado 24 h após a aplicação de

PGF e foram administrados 25 mg de LH (LUTROPIN-V[®], Bioniche, Bellenville, Ontário, Canadá) 48 h após a aplicação de PGF (Figura 2). No grupo P36/LH48 o dispositivo foi removido 36 h após a aplicação de PGF e 25 mg de LH foram administrados 48 h após a aplicação de PGF (Figura 3). Os animais do grupo P24/LH60 tiveram os dispositivos retirados 24 h após a aplicação de PGF e receberam 25 mg de LH 60 h após a aplicação de PGF - (Figura 4). Nas vacas do grupo P36/LH60 os dispositivos foram retirados 36 h após a aplicação de PGF e a administração de 25 mg de LH ocorreu 60 h após a aplicação de PGF (Figura 5). Todas as vacas do experimento foram inseminadas com sêmen proveniente do mesmo touro da raça Holandesa e da mesma partida (7H5255 Na-Lar Elton Kenneth - ET, partida nº071201 – Select Sires Inc., Madson, USA).

Figura 2 - Grupo P24/LH48: Retirada do dispositivo 24 h após a administração de PGF e aplicação de LH 48 h após a administração de PGF

Figura 3 - Grupo P36/LH48: Retirada do dispositivo 36 h após a administração de PGF e aplicação de LH 48 h após a administração de PGF

Figura 4 - Grupo P24/LH60: Retirada do dispositivo 24 h após a administração de PGF e aplicação de LH 60 h após a administração de PGF

Figura 5 - Grupo P36/LH60: Retirada do dispositivo 36 h após a administração de PGF e aplicação de LH 60 h após a administração de PGF

3.4 Avaliações ultra-sonográficas

Foram realizados exames ultra-sonográficos (Pie Medical FALCO 100®, Netherlands) no D4 para mensuração da quantidade de folículos no início da onda de crescimento folicular e do D7 ao D10 (a cada 12 h) para avaliação da dinâmica folicular e determinação do momento das ovulações e no D15 para quantificar os corpos lúteos formados para a determinação da taxa de ovulação.

3.5 Colheitas de embriões

Os embriões foram colhidos 6,5 dias após a primeira inseminação artificial, utilizando-se o método trans-cervical, através de *flush* uterino. O meio de colheita utilizado foi o DPBS - Flush® (NUTRICEL – Campinas, Brasil), o meio de cultivo dos embriões usado foi o Holding EN CARE® (TECNOPEC, São Paulo, Brasil). As estruturas foram quantificadas para efetivação do cálculo da taxa de recuperação. Os embriões viáveis classificados de acordo com os padrões de morfologia estrutural da IETS (IETS, 1998). Aferiu-se a quantidade de embriões transferíveis (graus 1, 2 e 3) e quantidade de embriões congeláveis (graus 1 e 2) por tratamento.

3.6 Delineamento Experimental e Análise Estatística

Os animais (n=16) foram divididos em quatro grupos experimentais (delineamento *cross-over* 2x2 - dois tempos de retirada do dispositivo contendo P₄ X dois tempos de aplicação do LH). Todos os animais foram submetidos a todos os tratamentos, objetivando evitar efeitos individuais no resultado. Realizaram-se as análises de interações estatísticas para avaliação dos efeitos principais de cada

fator. As medidas de tendência central (média $\pm$ epm) foram analisadas pelo teste de média. As comparações entre proporções foram realizadas pelo teste de Qui-quadrado. As correlações entre variáveis foram analisadas com o proc CORR do SAS. Foi utilizada a correlação de Spearman devido à característica não paramétrica dos dados. Empregou-se para as análises o programa estatístico SAS for Windows (SAS, 2000).

4 RESULTADOS

Os resultados dos grupos experimentais estão apresentados na tabela 2. Não houve interação entre os tratamentos. Assim, foram avaliados os efeitos principais para os tratamentos P24 vs P36 e LH48 vs LH60. Não foram observadas diferenças tanto para o momento da retirada do dispositivo de P4 quanto para o momento da administração de LH para as seguintes variáveis: taxa de ovulação; taxa de recuperação; estruturas totais; embriões degenerados ($p>0,05$). No entanto, foram observadas diferenças estatísticas para as variáveis: embriões Grau 1; embriões transferíveis; embriões congeláveis ($p\leq 0,05$). Houve efeito do momento da administração de LH (LH60) no número embriões Grau 1, transferíveis e congeláveis. Quanto à remoção do dispositivo de P4 não foi verificado nenhuma diferença significativa entre os tratamentos para as variáveis analisadas.

Tabela 2 Efeito do tempo de permanência do dispositivo intravaginal contendo progesterona (P4-24 ou 36 horas) e do momento da aplicação do LH (48 ou 60 horas) após a aplicação de prostaglandina em vacas Holandesas de alta produção superovuladas, Muzambinho, MG, 2005.

Variáveis analisadas	Grupos Experimentais				Interações	
	P24LH48	P24LH60	P36LH48	P36LH60	Grupos	Replicas
Número observações	12	12	12	11		
Número de folículos (D4)	14,0±1,8	13,5±1,4	13,8±0,8	12,4±1,5	0,7342	0,8617
Número de folículos >8mm (LH)	10,2±1,3	13,2±2,9	8,8±1,2	13,6±3,3	0,7009	0,8486
Número de corpos lúteos (D15)	5,6±1,4	7,2±1,9	5,4±1,1	8,8±1,9	0,5692	0,7550
Taxa de ovulação (%)	49,7±8,3	50,0±8,1	56,5±7,0	65,7±6,7	0,5623	0,2018
Taxa de recuperação (%)	63,7±9,4	71,5±6,7	65,2±9,5	74,6±8,8	0,9263	0,6091
Total de estruturas	4,0±1,2	4,8±1,3	3,6±0,9	6,5±1,5	0,3935	0,7080
Embrião grau 1	1,9±0,6	2,9±1,1	1,3±0,5	5,3±1,1	0,0913	0,4210
Embrião grau 2	0,4±0,2	0,6±0,3	0,7±0,4	0,6±0,3	0,7376	0,4896
Embrião grau 3	0,1±0,1	0,2±0,1	0,3±0,2	0,4±0,2	0,9201	0,4558
Embriões degenerados	1,0±0,3	0,8±0,2	1,0±0,5	0,1±0,1	0,2653	0,3657
Embriões transferíveis	2,4±0,8	3,7±1,1	2,2±0,7	6,3±1,4	0,1641	0,4435
Embriões congeláveis	2,3±0,8	3,5±1,1	1,9±0,7	5,9±1,3	0,1587	0,3591
Intervalo entre 1 ^a e ultima ovulação	17,5±3,7	15,6±3,1	17,5±3,0	6,5±1,9	0,1402	0,4202

Tabela 3 - Efeito do tempo de permanência do dispositivo intravaginal contendo progesterona (P4-24 ou 36 horas) e do momento da aplicação do LH (48 ou 60 horas) após a aplicação de prostaglandina em vacas Holandesas de alta produção superovuladas, Muzambinho, MG, 2005 (EFEITOS PRINCIPAIS).

Variáveis analisadas	Efeitos Principais				Efeitos			
	P4		LH		P4	LH	Vaca	Replica
	P24	P36	LH48	LH60				
Número observações	24	23	24	23				
Número de folículos (D4)	13,8±1,1	13,1±0,8	13,9±1,0	13,0±1,0	-----	-----	-----	0,016
Número de folículos >8mm (LH)	11,7±1,6	11,1±1,8	9,5±0,9	13,4±2,1	-----	0,053	0,0131	0,003
Número de corpos lúteos (D15)	6,4±1,1	7,0±1,1	5,5±0,9	8,0±1,3	-----	0,088	0,0282	-----
Taxa de ovulação (%)	49,9±5,7	60,9±4,8	53,1±5,3	57,5±5,4	-----	-----	-----	-----
Taxa de recuperação (%)	67,4±5,8	69,9±6,4	64,4±6,5	73,1±5,5	-----	-----	-----	0,050
Total de estruturas	4,4±0,9	5,0±0,9	3,8±0,7	5,7±1,0	-----	-----	-----	-----
Embrião grau 1	2,4±0,6	3,2±0,7	1,6±0,4	4,0±0,8	-----	0,004	-----	-----
Embrião grau 2	0,5±0,2	0,7±0,2	0,5±0,2	0,6±0,2	-----	-----	-----	-----
Embrião grau 3	0,1±0,1	0,3±0,1	0,2±0,1	0,3±0,1	-----	-----	-----	-----
Embriões degenerados	0,9±0,2	0,6±0,3	1,0±0,3	0,5±0,1	-----	-----	-----	-----
Embriões transferíveis	3,0±0,7	4,1±0,9	2,3±0,5	4,9±0,9	-----	0,007	-----	-----
Embriões congeláveis	2,9±0,7	3,8±0,8	2,1±0,5	4,7±0,9	-----	0,007	-----	-----
Intervalo 1 ^a e última ovulação (h)	16,6±2,4	12,0±2,1	17,5±2,3	10,9±2,0	-----	0,047	-----	-----

Gráfico 1 - Distribuição das ovulações de acordo com o momento da administração do LH (48 ou 60 após a PGF) em vacas Holandesas de alta produção (*Bos taurus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo

No gráfico 1 está apresentado o número total de ovulações de acordo com o momento do tratamento com LH. Foi observado maior sincronização das ovulações quando as doadoras foram submetidas aos tratamentos com aplicação do LH 60 horas após a administração de PGF ($p \leq 0,05$).

Entretanto, os diferentes momentos de remoção do dispositivo de P4 não influenciaram a distribuição das ovulações, como pode ser melhor visualizado no gráfico 2.

Gráfico 2 Distribuição das ovulações de acordo tempo de permanência do dispositivo de progesterona (24 ou 36 após PGF) em vacas Holandesas de alta produção (*Bos taurus*) superovuladas e inseminadas artificialmente em tempo fixo

A distribuição das ovulações nos diferentes grupos experimentais está apresentada na figura 6.

Quando foram analisadas todas as doadoras, o número de folículos no início do tratamento superovulatório foi positivamente correlacionado com o número de folículos no momento do LH, o número de CL no dia da colheita dos embriões (D15) e o número total de estruturas (Tabela 4). No entanto, essa correlação não foi verificada quando analisada por grupo experimental (Tabela 5).

Figura 6 - Distribuição das ovulações após a administração de PGF nos diferentes grupos experimentais - Muzambinho – MG, 2005

Tabela 4. Correlação e nível de significância da correlação para o número de folículos no D4, número de folículos no momento do LH, número de CL no D15 e número de estruturas coletadas em vacas Holandesas.

	Número de folículos no momento do LH	Número de CL no D15	Total de estruturas
Número de folículos no D4	0,32 0,0265	0,34 0,0210	0,26 0,0721
Número de folículos no momento do LH	---	0,90 <,0001	0,81 <,0001
Número de CL no D15	---	---	0,92 <,0001

Tabela 5. Correlação e nível de significância da correlação para o número de folículos no D4, número de folículos no momento do LH, número de CL no D15 e número de estruturas coletadas em vacas Holandesas de acordo com o grupo experimental.

	Número de folículos no momento do LH				Número de CL no D15				Total de estruturas			
	P24LH4 8	P24LH60	P36LH48	P36LH60	P24LH48	P24LH60	P36LH48	P36LH60	P24LH48	P24LH60	P36LH48	P36LH 60
Número de folículos no D4	0,33099 0,2933	0,42857 0,1645	-0,0816 0,8011	0,52791 0,0951	0,56283 0,0568	0,41031 0,1852	-0,1277 0,6924	0,57640 0,0634	0,41994 0,1741	0,25618 0,4216	0,11072 0,7319	0,4490 0,1659
Número de folículos no momento do LH			---			0,93265 <,0001	0,85081 0,0005	0,96992 <,0001	0,75714 0,0044	0,92064 <,0001	0,56073 0,0579	0,9305 <,0001
Número de CL no D15			---				---		0,95189 <,0001	0,93962 <,0001	0,75364 0,0046	0,8871 0,0003

3 DISCUSSÃO

No presente estudo, o atraso na indução da ovulação com administração do LH 60 horas após a PGF aumentou o número de embriões transferíveis, congeláveis, além de aumentar o número de embriões de qualidade 1. Associado a este fato, foi observado também maior sincronização das ovulações. No entanto, não se verificou efeito do momento da remoção do dispositivo intravaginal de progesterona sobre as variáveis analisadas.

Corroborando com estes resultados, Rodrigues et al. (2005) utilizaram quarenta vacas da raça Holandesa, tratadas com 1 ou 2 implantes de Norgestomet associados a administração intramuscular de 3 mg de benzoato de estradiol e 100 mg de P4 no Dia 0. O tratamento superovulatório com FSH foi iniciado no dia 4 e a aplicação de PGF (dose) ocorreu no Dia 6, uma dose de manhã e outra à tarde. Os implantes de progestágeno foram removidos no período da tarde no Dia 7 (P36) e a aplicação de GnRH ocorreu no Dia 8 de manhã (Grupo GnRH 48 horas após PGF) ou de tarde (Grupo GnRH 60 horas após a PGF). As inseminações ocorreram 12 e 24 horas após a aplicação do GnRH. O grupo GnRH 60 horas apresentou menor número de folículos anovulatórios (>10mm) no dia da colheita dos embriões (D15). Entretanto, diferentemente dos resultados do presente experimento, não foi observada diferença significativa com relação ao número de embriões transferíveis ($3,05 \pm 0,89$ vs $3,80 \pm 1,22$) e congeláveis ($1,50 \pm 0,52$ vs $2,95 \pm 1,04$) quando o tratamento com GnRH foi realizado com atraso de 12 horas, embora o grupo GnRH 60 horas tenha apresentado vantagem numérica.

O presente experimento utilizou delineamento experimental *cross-over* na tentativa de diminuir o efeito de doadora na resposta aos tratamentos. Também, empregou-se apenas uma partida de sêmen de um único reprodutor para evitar o efeito do sêmen no resultado. Esse modelo estatístico pode ter aumentado a acurácia, indicando diferenças que não foram detectadas no estudo de Rodrigues et al. (2005).

Respostas superovulatórias inconsistentes foram associadas a ovulações prematuras durante tratamento com FSH, as quais originariam um CL prematuro, que por sua vez, secreta baixos níveis de progesterona prejudicando a liberação pré-ovulatória de LH. Além disso, a assincronia no crescimento folicular foi observada em fêmeas superovuladas. Vos et al. (1995) observaram que apenas 25% dos folículos estimulados por FSH exógeno seriam capazes de ovular no momento do pico pré-ovulatório de LH endógeno. Isto ocorre provavelmente devido a grande variação nos diâmetros foliculares. Alguns folículos maiores podem induzir a liberação endógena de LH em um momento em que boa parte dos demais folículos (particularmente os de menor diâmetro) ainda não possui condições de responder ao estímulo do LH com maturação folicular e ovulação. Essas observações, em parte, corroboram com os resultados deste estudo, de que o tratamento antecipado com LH poderia diminuir a eficiência da superovulação. Ainda, o protocolo de sincronização da emergência folicular e a permanência do dispositivo de P4 até o final do tratamento com FSH poderia padronizar o crescimento dos folículos e evitar liberação prematura do pico pré-ovulatório de LH.

Os resultados do presente experimento são semelhantes aos apresentados por D'Occhio et al. (1998), no qual, pela administração de LH 60 horas após a PGF, foi possível visualizar maior produção de embriões transferíveis ($p=0,01$) e embriões congeláveis ($p=0,01$).

Houve menor dispersão entre as ovulações, portanto maior sincronização, quando as doadoras foram submetidas ao tratamento com indução da ovulação 60 horas após a PGF ($p=0,05$). Verifica-se que fêmeas *Bos indicus* atingem a divergência folicular com diâmetro inferior a fêmeas *Bos taurus* (6,3mm; GIMENES et al., 2005 para *Bos indicus* e 8,5mm; GINTHER et al., 1996 para *Bos taurus*). Em novilhas Nelore a capacidade ovulatória do folículo dominante após a administração de 25mg de LH_p começa a partir de 7 a 8,4mm (30%; 3/9). Verificou-se aumento linear na taxa ovulatória quando o folículo alcança o diâmetro de 8,5mm a 10mm (80,0%; 8/10) e >10mm (90%; 9/10; GIMENES et al., 2005a). Estes resultados diferem dos obtidos por Sartori et al. (2001) que

verificaram capacidade ovulatória somente após os folículos atingirem 10mm de diâmetro em *Bos taurus*. Desta forma, acredita-se que o atraso da administração do LH proporcionou tempo adicional para o crescimento dos folículos aumentando o número de folículos no momento do tratamento com LH. Além disso, supõem-se que os folículos tenham adquirido maior capacidade ovulatória, demonstrado pela tendência de aumento do número de CL no grupo tratado com LH 60 h após a PGF ($P=0,08$)

Bó et al. (2006) trabalhando com vacas da raça Red Angus e Brangus, adotaram protocolos semelhantes aos descritos no presente experimento, porém o indutor de ovulação utilizado foi o GnRH. As doadoras foram divididas de acordo com a condição corporal em quatro tratamentos (fatorial 2x2 – GnRH 48 e 60 horas após a PGF e retirada do dispositivo intravaginal de P4 24 e 36 horas após a PGF). Estes autores também não observaram diferença significativa em relação ao tempo de permanência do dispositivo intravaginal de P4 sobre a taxa de ovulação e dispersão das ovulações. Entretanto houve menor intervalo entre as ovulações no grupo que recebeu a aplicação de GnRH 60 horas após a PGF, quando a remoção do dispositivo de P4 ocorreu 36 horas após a PGF ($P<0,05$). Este fato também foi observado no presente estudo, no qual o atraso na aplicação do LH também proporcionou menor dispersão das ovulações ($10,9\pm 2,0$ hs e $17,5\pm 2,3$ hs, respectivamente para LH 60 e LH48 h após PGF). O trabalho de Bó et al. (2006) também discute que o atraso no indutor de ovulação em doadoras *Bos taurus* aumenta a sincronização da ovulação após o tratamento superovulatório e melhora a produção de embriões, semelhantemente ao observado nesse estudo.

No presente estudo foi verificada correlação positiva no número de folículos no início do tratamento superovulatório com a eficiência do protocolo de transferência de embriões. Esses dados corroboram com os de Romero et al. (1991) que encontraram correlações positivas entre o número de pequenos folículos no início do tratamento superovulatório e a resposta superovulatória. No entanto, no presente experimento não se verificou correlações positivas quando

essa análise foi realizada por grupo experimental. Esse resultado pode ser devido ao pequeno número de animais por grupo experimental.

6 CONCLUSÕES

A hipótese de que o atraso na administração de LH aumenta a produção de embriões em *Bos taurus* foi aceita. No entanto, não foi confirmada a hipótese de que o atraso na retirada do dispositivo intravaginal de progesterona aumenta a produção de embriões.

Dentro dos objetivos propostos é possível concluir que:

- Houve aumento do número de folículos > 8mm no momento do tratamento com LH nas vacas tratadas com LH 60 horas após a administração de PGF.
- As vacas tratadas com LH 60 horas após a PGF apresentaram maior sincronização das ovulações.
- O tratamento com LH 60 horas após PGF aumentou a produção de embriões transferíveis e congeláveis, além de aumentar o número de embriões grau 1.
- Não houve efeito significativo do momento da retirada do dispositivo de progesterona sobre as variáveis analisadas.
- Houve correlação significativa e positiva entre o número de folículos no início do tratamento superovulatório, o número de folículos no momento da aplicação de LH, o número de corpos lúteos no dia da colheita e o número total de estruturas.

CAPÍTULO II

Protocolo de Superovulação
com IATF em *Bos indicus*

1. EXPERIMENTO 1: MOMENTO DA ADMINISTRAÇÃO DE LH EM VACAS NELORE (*Bos indicus*) SUPEROVULADAS E INSEMINADAS EM TEMPO FIXO

1.1 HIPÓTESE

A hipótese deste experimento é de que o atraso na administração de LH aumenta a produção de embriões em vacas Nelore (*Bos indicus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo.

1.2 OBJETIVOS

- Acompanhar a dinâmica folicular de fêmeas bovinas da raça Nelore (*Bos indicus*) após a administração de LH, em diferentes momentos (48 ou 60 h após a administração de LH);
- Avaliar a produção de embriões nos diferentes protocolos;
- Avaliar a correlação entre o número de folículos presentes no início do tratamento, a resposta superovulatória e a produção de embriões nos diferentes protocolos.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Animais

Foram utilizadas 20 vacas da raça Nelore (*Bos indicus*, Figura 7), puras de origem (PO), com idade e peso médios, respectivamente, de cinco anos e, $550 \pm 32,2$ kg e paridas a um intervalo mínimo de $70 \pm 19,5$ dias.

Figura 1 - Rebanho de vacas Nelore da Fazenda Pouso Alegre utilizadas no experimento

1.3.2 Instalações e Manejo Nutricional

Os animais eram pertencentes à Fazenda Pouso Alegre, localizada no município de Poços de Caldas, sul de Minas Gerais, foram mantidos sob as mesmas condições de ambiente e alimentação, em sistema extensivo, recebendo suplementação mineral *ad libitum* em cocho coberto, de acordo com as exigências de manutenção e produção, fornecidas pelo NRC (2001).

1.3.3 Protocolos para superovulação com inseminação artificial em tempo fixo

As doadoras (n=20) foram divididas em dois grupos de acordo com o momento da aplicação de 25 mg de LH [48 horas (G-LH48) ou 60 horas (G-LH60) após a administração de prostaglandina]. Adotou-se o delineamento experimental *cross-over* para evitar a influência individual dos animais sobre os resultados. As vacas receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (1 g P₄; DIB[®], Syntex, Argentina) no Dia -1 e 2 mg de Benzoato de estradiol (BE; RIC BE[®], Syntex, Argentina) no Dia 0. A superovulação foi induzida com FSH-p (100mg de Folltropin-V[®], Bioniche, Canadá) em 8 doses decrescentes de 12/12 horas, a partir do Dia 4 (Tabela 1, capítulo 1, pág. 47). No Dia 6, administrou-se 150 µg de PGF₂ α (D-cloprostenol; Prolise[®] Syntex, Argentina). Os dispositivos de P₄ foram retirados 24 horas após a administração da PGF₂ α . Nas vacas do grupo LH 48 a administração de LH (25mg de LH, Lutropin-V[®], Bioniche, Canadá) foi realizada 48 horas após a PGF, conforme demonstrado na figura 1, enquanto que as doadoras do grupo LH6 após a PGF, de acordo com o descrito na figura 2. Foram realizadas duas inseminações 12 horas e 24 horas após a aplicação do LH. Foram mantidos os acasalamentos para cada vaca em todas as réplicas do experimento.

Figura 2 - Grupo LH48: Retirada do dispositivo 24 h após a administração de PGF e aplicação de LH 48 h após o tratamento com PGF

Figura 3 - Grupo P24/LH60: Retirada do dispositivo 24 h após a administração de PGF e aplicação de LH 60 h após o tratamento com PGF

1.3.4 Avaliações ultra-sonográficas

No dia do início do tratamento superovulatório (D4) foram quantificados os folículos > 3mm. Foram realizados exames ultra-sonográficos (Pie Medical FALCO 100®, Netherlands) do D7 ao D10 (a cada 12 h) para avaliação da dinâmica folicular e determinação do momento das ovulações e no D15 para quantificar os corpos lúteos formados para a determinação da taxa de ovulação.

1.3.5 Colheitas de embriões

Empregou-se a mesma metodologia apresentada no experimento 1 do capítulo 1.

1.3.6 Delineamento Experimental e Análise Estatística

Os animais (n=20) foram divididos em dois grupos experimentais. Todos os animais foram submetidos a todos os tratamentos possíveis (delineamento “cross-over”), objetivando evitar efeitos individuais no resultado. Foram realizadas as devidas análises de interações estatísticas para avaliação dos efeitos principais de cada fator analisado. As variáveis foram analisadas por ANOVA, a homogeneidade das variâncias (dispersão do momento das ovulações), pelo teste de Bartlett e a comparação das proporções pelo teste de Qui-quadrado. As correlações entre variáveis foram analisadas com o proc CORR do SAS. Foi utilizada a correlação de Spearman devido à característica não paramétrica dos dados. Empregou-se para as análises o programa estatístico SAS for Windows (SAS, 2000). Adotou-se o nível de significância de 5%.

1.4 RESULTADOS

Neste experimento não se verificou interação entre réplica e tratamento. Não foi observada diferença estatística ($P > 0,05$) nas seguintes variáveis analisadas para LH48 e LH60: número de folículos $>8\text{mm}$ no momento do LH, taxa de ovulação, taxa de recuperação e estruturas não fertilizadas. No entanto, para as seguintes variáveis verificou-se diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$): intervalo entre a primeira e a última ovulação, estruturas totais, embriões degenerados, embriões transferíveis e embriões congeláveis, os dados podem ser melhor observados na tabela 1.

Tabela 1 - Efeito do momento da aplicação do LH (48 ou 60) após a aplicação de prostaglandina em vacas Nelore. Poços de Caldas, MG, 2006.

	Efeitos Principais		Efeitos Valor P (teste F)		
	Aplicação LH		Tratamento	Vaca	Réplica x Tratamento
	LH48	LH60			
Número de observações	20	20			
Folículos $> 8\text{ mm}$ D8 (LH)	12,5 $\pm$ 1,5	9,4 $\pm$ 1,0	0,11	0,001	0,88
CL D15 (colheita embriões)	9,1 $\pm$ 1,4	6,0 $\pm$ 0,7	0,08	0,01	0,49
Taxa de ovulação (%)	71,0 $\pm$ 4,2	64,6 $\pm$ 4,0	0,33	0,23	0,29
Taxa de recuperação (%)	87,1 $\pm$ 3,1	88,2 $\pm$ 3,1	0,74	0,41	0,28
Total estruturas	7,5 $\pm$ 1,0	5,1 $\pm$ 0,5	0,05	0,006	0,25
Embriões transferíveis	6,2 $\pm$ 1,0	3,1 $\pm$ 0,5	0,004	0,02	0,49
Embriões congeláveis	5,9 $\pm$ 0,9	2,5 $\pm$ 0,5	0,002	0,04	0,46
Estruturas não fertilizadas	0,7 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,2	0,63	0,51	0,17
Embriões degenerados	0,6 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,3	0,008	0,05	0,44
Intervalo entre a 1ª e a última ovulação (h)	15,0 $\pm$ 2,1	21,0 $\pm$ 1,7	0,02	0,04	1,00

Gráfico 1 - Distribuição das ovulações de acordo com o momento da administração do LH (48 ou 60 após a PGF) em vacas Nelore (*Bos indicus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo

O gráfico 1 demonstra a distribuição das ovulações ocorridas de acordo com o momento da aplicação do LH. Foi observado maior sincronização das ovulações quando as doadoras foram submetidas aos tratamentos com aplicação do LH 48 horas após a administração de PGF ($p \leq 0,05$).

Quando foram analisadas todas as doadoras, o número de folículos no início do tratamento superovulatório foi positivamente correlacionado com o número de folículos no momento do LH, o número de CL no dia da colheita dos embriões (D15) e o número total de estruturas (Tabela 2). Essa correlação foi também significativa quando a análise foi realizada por grupo experimental (Tabela 3).

Tabela 2. Correlação e nível de significância da correlação para o número de folículos no D4, número de folículos no momento do LH, número de CL no D15 e número de estruturas coletadas em vacas Nelore.

	Número de folículos no momento do LH	Número de CL no D15	Total de estruturas
Número de folículos no D4	0,76 <,0001	0,78 <,0001	0,77 <,0001
Número de folículos no momento do LH	---	0,89 <,0001	0,88 <,0001
Número de CL no D15	---	---	0,97 <,0001

Tabela 3. Correlação e nível de significância da correlação para o número de folículos no D4, número de folículos no momento do LH, número de CL no D15 e número de estruturas coletadas em vacas Nelore de acordo com o grupo experimental.

	Número de folículos no momento do LH		Número de CL no D15		Total de estruturas	
	P24LH48	P24LH60	P24LH48	P24LH60	P24LH48	P24LH60
Número de folículos no D4	0,90 <,0001	0,47 0,04	0,84 <,0001	0,67 0,0011	0,81 <,0001	0,58 0,0068
Número de folículos no momento do LH	---		0,89 <,0001	0,85 <,0001	0,87 <,0001	0,82 <,0001
Número de CL no D15		---		---	0,96 <,0001	0,92 <,0001

1.5 DISCUSSÃO

Neste experimento, o atraso de 12 hs na indução da ovulação com 25 mg de LH proporcionou diminuição na produção de estruturas totais, embriões transferíveis e embriões congeláveis, além de aumento dos embriões degenerados. Verificou-se, também menor sincronização das ovulações.

Estudos demonstraram a possibilidade da inseminação artificial em tempo fixo em vacas *Bos indicus* superovuladas. Neste estudo, Nogueira et al., 2003 utilizaram durante os protocolos de superovulação dispositivo intravaginal de P4 (CIDR), o qual foi removido 36 horas após a administração da PGF (P-36). A ovulação induzida 12 horas após a remoção do dispositivo (48h após a PGF) utilizando LHp (Lutropin-V, Bioniche Animal Health, Canadá). Os autores verificaram que as ovulações ocorreram entre 24 e 36 h após o tratamento com LHp e as inseminações em tempo fixo foram realizadas 12 e 24 h após o LHp. De forma semelhante, no presente experimento, no grupo LH 48 horas após a PGF, 90% das ovulações ocorreram entre 24 e 36 horas após a administração de LH. No grupo LH 60 h após a PGF foi observado maior dispersão ente as ovulações ($P=0,02$), o que pode ter contribuído para a diminuição da eficiência desse protocolo.

Em outro experimento para avaliar o momento da retirada do dispositivo de P4 em vacas Nelore superovuladas e inseminadas em tempo fixo (IATF), utilizou-se dez vacas Nelores. As doadoras foram superovuladas utilizando delineamento “cross-over”, e os tratamentos foram realizados com intervalo de 35 dias. No primeiro grupo (P24) o CIDR foi retirado 24 horas após a aplicação da $PGF2\alpha$, administrada juntamente com a sexta dose de FSH. Administrou-se 25 mg de LHp 48 horas após a $PGF2\alpha$. O segundo grupo (P36) recebeu protocolo semelhante ao do primeiro, exceto a retirada do CIDR, que foi realizada 36 horas após a administração de $PGF2\alpha$. Todas as doadoras foram inseminadas 12 e 24 horas após o LH. Sete dias após o tratamento com LH. Os resultados de embriões transferíveis para o P24 e o P36 foram respectivamente $9,3 \pm 7,5$ e $10,3 \pm 5,9$ ($p>0,05$), o que sugere que a retirada do dispositivo de progesterona 24 ou 36

após a administração de $\text{PGF}_2\alpha$, seguido da indução da ovulação com LH (48h após a $\text{PGF}_2\alpha$) com a IATF 12 e 24 horas após o LH é um protocolo viável para programas de superovulação e transferência de embriões em *Bos indicus*, eliminando a necessidade de detecção de estro e possibilitando a programação precisa das atividades de sincronização, de colheita e transferência dos embriões (ZANENGA et al., 2003).

Em outro estudo Nogueira et al. (2000) trabalhando com vacas Nelore, avaliou os efeitos de se atrasar o pico endógena de LH sobre o número de embriões transferíveis. O pico de LH foi suprimido pelo tratamento com agonista de GnRH (Deslorelin, Peptech Saúde Animal Pty Limited, Sydney, a Austrália) ou por um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR-B[®], 1.9 g de progesterona, InterAg, Hamilton, Nova Zelândia) e ovulação foi induzida pela administração exógena de LH (25 mg, im, Lutropin, Vetrepharm, Ontário, o Canadá). O LH foi administrado 48 h ou 60 h após o tratamento com PGF. As vacas Nelore foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos experimentais: controle (n=18), P48 (n=18), P60 (n=18) e D60 (n=18). As vacas do grupo controle receberam um dispositivo de CIDR-B e benzoato de estradiol em momento aleatório do ciclo estral (Dia -5). A superovulação com FSHp (Folltropin-V, dose total = 200 mg, duas vezes por dia, durante 4 dias sucessivos) teve início no Dia 0. Quarenta oito horas depois do início do tratamento com FSH (Dia 2), foi administrada PGF e 12 h depois o CIDR foi removido. Todos os animais foram inseminados 10, 20, 30 e 40 h depois de ocorrência do cio. As vacas dos grupos P48 e P60 receberam o mesmo tratamento do grupo controle, com exceção do CIDR-B que foi removido 48 h (Grupo P48) ou 60 h (Grupo P60) depois de administração de PGF. As vacas receberam 25 mg de LHp ao mesmo tempo de remoção de CIDR-B (Dia 4 manhã ou tarde, respectivamente para grupos P48 e P60), e foram inseminadas 10 e 20 h após. Os animais do grupo D60 receberam um implante na orelha (SC) contendo 6 mg de Deslorelin (Dia - 7) e o mesmo tratamento superovulatório descrito acima (iniciado em Dia 0). Sessenta horas após a injeção de PGF, a ovulação foi induzida com LH e os animais foram inseminados 10 e 20 h depois. Os autores concluíram que não houve diferença significativa na produção de embriões

transferíveis entre os tratamentos ($P>0,05$), embora tenha sido observada vantagem numérica em favor do G P48 em relação aos grupos P 60 e D60 ($7,17\pm1,08$; $5,78\pm1,34$; $5,06\pm1,79$ respectivamente). Esses resultados corroboram com o presente estudo que apontam maior eficiência quando do tratamento LH 48 h após a administração de PGF.

Como verificado em vacas holandesas no Capítulo 1 desse trabalho, nas doadoras Nelore do presente estudo também foi observada correlação positiva entre o número de folículos no início do tratamento superovulatório e a eficiência do protocolo de transferência de embriões. Fato este já observado por Romero et al., (1991) que encontraram correlações positivas entre o número de pequenos folículos no início do tratamento e a resposta superovulatória. Nas doadoras Nelore do presente estudo as correlações foram mais significativas do que em doadoras holandesas. Esse relato pode ser explicado pela diferença na fisiologia reprodutiva entre *Bos taurus* e *Bos indicus*. Existem evidências de que o sistema IGF difere entre esses grupos genéticos. Estudos realizados com vacas Brahman foram sugestivos de que esses animais apresentam maiores concentrações plasmáticas de IGF-I (Simpson et al., 1994, Alvarez et al., 2000) e menores concentrações de FSH quando comparadas com vacas Angus (Alvarez et al., 2000). Alguns autores levantaram a hipótese de que o maior número de folículos presentes no ovário de *Bos indicus* pode ser devido à elevada concentração de IGF-I, mesmo na presença de baixos níveis de FSH (Bó et al., 2003). Essa diferença nas concentrações de FSH e de IGF-I pode explicar a maior sensibilidade ao tratamento superovulatório em doadoras *Bos indicus* (Barros e Nogueira, 2001) e explicar em parte a maior correlação encontrada no presente experimento.

Os resultados desse experimento são indicativos de que em *Bos indicus* a aplicação do LH 48 horas após a administração de PGF não só aumentou a produção de embriões transferíveis ($p=0,004$), como também, induziu maior sincronização entre as ovulações ($p=0,02$), do que a aplicação de LH 60 horas após a PGF.

1.6 CONCLUSÕES

A hipótese de que o atraso na administração de LH aumenta a produção de embriões em vacas Nelore (*Bos indicus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo foi rejeitada.

Dentro dos objetivos propostos é possível concluir que:

- A aplicação de LH 48 horas após a administração de PGF promoveu redução do intervalo entre a primeira e a última ovulação
- A aplicação de LH 48 horas após a injeção de PGF aumentou o número de estruturas totais, o número de embriões transferíveis e congeláveis, além de diminuir o número de embriões degenerados.
- Verificou-se correlação positiva e significativa entre o número de embriões no início do tratamento superovulatório e o número de folículos no momento do LH, o número de CL no dia da colheita e o número total de estruturas em todos os grupos experimentais.

2 EXPERIMENTO 2 :EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE PROGESTERONA INJETÁVEL NO INÍCIO DO PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO PARA SUPEROVULAÇÃO COM INSEMINAÇÃO EM TEMPO FIXO EM VACAS NELORE (*Bos indicus*)

2.1 HIPÓTESE

A hipótese do presente estudo é de que o tratamento intramuscular com benzoato de estradiol associado à progesterona no início do protocolo sincroniza mais eficientemente a emergência da nova onda de crescimento folicular e aumenta a produção de embriões em vacas Nelore (*Bos indicus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo.

2.2 OBJETIVOS

- Acompanhar a dinâmica folicular e a produção de embriões de fêmeas bovinas da raça Nelore submetidas ou não à administração de progesterona injetável no início do protocolo de superovulação.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Animais

Foram utilizadas 10 vacas da raça Nelore (*Bos indicus*, figura 4) , puras de origem (PO), com idade e peso médios, respectivamente, de cinco anos e, $540 \pm 44,3$ kg e paridas a um intervalo mínimo de $100 \pm 19,6$ dias.

Figura 4 - Rebanho de vacas Nelore da Agropecuária Agropeva utilizadas no experimento

2.3.2 Instalações e Manejo Nutricional

Os animais eram pertencentes a Agropeva Empresa Agrícola , localizada no município de Uberaba, triângulo mineiro, foram mantidos sob as mesmas condições de ambiente e alimentação, em sistema extensivo, recebendo suplementação mineral *ad libitum* em cocho coberto, de acordo com as exigências de manutenção e produção, fornecidas pelo NRC (2001).

2.3.3 Protocolos para superovulação com inseminação artificial em tempo fixo

As doadoras foram divididas em dois grupos: Grupo Benzoato de estradiol associado a Progesterona injetável (G-BE+P4, Figura 5) ou Grupo Benzoato de estradiol (G-BE, Figura 6). Adotou-se o delineamento experimental *cross-over*, para evitar a influência da variação individual nos resultados. Os animais do G-BE+P4 receberam no Dia 0 um dispositivo intravaginal de progesterona (1 g P₄; DIB[®], Syntex, Argentina), 2 mg de Benzoato de estradiol (BE; RIC BE[®], Syntex, Argentina) e 50 mg de progesterona injetável (Syntex, Argentina). As vacas do G-BE receberam um dispositivo intravaginal de P₄ associado a 2 mg de BE. A superestimulação folicular foi induzida com FSH-p (133mg de Folltropin-V[®], Bioniche, Canadá) em 8 doses decrescentes de 12/12 horas, a partir do Dia 4. No Dia 6, administrou-se 150µg de PGF2 α (D-cloprostenol; Prolise[®] Syntex, Argentina). Os dispositivos de P₄ foram retirados 36 horas após a administração de PGF2 α , e o LH (25mg de LH, Lutropin-V[®], Bioniche, Canadá) aplicado 48 horas após a PGF2 α (12 h após o último FSH). Foram realizadas duas inseminações artificiais 12 e 24 horas após o LH. A colheita dos embriões foi realizada no Dia 15.

U.S. – acompanhamento do desenvolvimento folicular por ultra-sonografia.

Figura 5 - Grupo BE: Aplicação de benzoato de estradiol no Dia 0

U.S. – acompanhamento do desenvolvimento folicular por ultra-sonografia.

Figura 6 - Grupo BE+P4: Aplicação benzoato de estradiol associado a P4 no Dia 0

2.3.4 Avaliações ultra-sonográficas

Foram realizados exames ultra-sonográficos (SCANNER 200, Pie Medical, Holanda) com intervalos de 12 horas a partir do momento da inserção do dispositivo até a emergência da nova onda de crescimento folicular. Também, foram realizados exames ultra-sonográficos com intervalos de 12 horas a partir do momento da administração do LH até 72 horas após, com intuito de avaliar o número de folículos aptos à ovulação (> 8 mm) e no D15 para quantificar os corpos lúteos formados para a determinação da taxa de ovulação.

2.3.5 Colheitas de embriões

Empregou-se a mesma metodologia apresentada no experimento 1 do capítulo 1.

2.3.6 Delineamento Experimental e Análise Estatística

Os animais ($n=10$) foram divididos em dois grupos experimentais. Todos os animais foram submetidos a todos os tratamentos possíveis (delineamento “cross-over”), objetivando evitar efeitos individuais no resultado. As variáveis foram analisadas por ANOVA, a homogeneidade das variâncias (dispersão do momento das ovulações), pelo teste de Bartlett e a comparação das proporções pelo teste de Qui-quadrado. Adotou-se nível de significância de 5%. Não foram observadas interações. O programa estatístico utilizado foi o SAS for Windows.

2.4 RESULTADOS

Não foram observadas interações, sendo os efeitos dos tratamentos BE+P4 e BE: emergência da onda folicular ($P > 0,05$), variação do dia de emergência folicular ($P = 0,06$), número de folículos $> 8\text{mm}$ no momento do LH ($P > 0,05$) taxa de ovulação ($P > 0,05$), intervalo entre a primeira e a última ovulação ($P > 0,05$), estruturas totais ($P > 0,05$), embriões degenerados ($P > 0,05$), embriões transferíveis ($P > 0,05$) e embriões congeláveis ($P > 0,05$), conforme o demonstrado na tabela 4.

Tabela 4 - Efeito da associação de progesterona injetável com Benzoato de estradiol no início do tratamento de sincronização de emergência de onda de crescimento folicular em vacas Nelore (*Bos indicus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo. Uberaba – MG, 2006

	BE (n=10)	BE+P4 (n=10)	Efeito Valor P (Teste F)	
			Tratamento	Vaca
Emergência da onda folicular (dia)	3,6±0,2	4,0±0,1	0,10	0,29
Variação da emergência folicular (dia)	2,5-4,5	3,5-4,5	0,06	—
Número de folículos $> 8\text{mm}$ (LH)	18,5±1,1	16,2±1,4	0,21	0,39
Número de corpos lúteos (D15)	12,4±0,9	11,1±1,1	0,44	0,81
Taxa de ovulação (%)	68,1±4,7	69,1±3,6	1,00	0,18
Taxa de recuperação (%)	72,5±8,7	75,5±8,9	0,70	0,06
Total de estruturas	9,2±1,2	7,7±0,8	1,15	0,25
Estruturas não fertilizadas	1,2±0,2	0,9±0,3	0,21	0,25
Embriões degenerados	0,8±0,2	0,6±0,2	0,45	0,44
Embriões transferíveis	7,2±1,1	6,2±0,6	0,10	0,29
Embriões congeláveis	6,3±1,0	5,1±0,7	0,16	0,52
Intervalo entre 1ª e última ovulação (h)	33,6±1,6	32,4±1,8	0,59	0,26

A fim de ilustrar a dispersão do início da onda de crescimento folicular os dados foram agrupados no Gráfico 2. Verificou-se tendência estatística ($P=0,06$) para maior sincronização do início da onda de crescimento folicular no grupo tratado com BE+P4 no Dia 0.

Gráfico 2 - Distribuição do momento do início da onda de crescimento folicular de acordo com o tratamento no início do protocolo de sincronização (BE+P4 vs. BE) em vacas Nelore (*Bos indicus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo

Gráfico 3 - Distribuição das ovulações de acordo com o tratamento no início do protocolo de sincronização (BE+P4 vs. BE) em vacas Nelore (*Bos indicus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo

No Gráfico 3 está apresentada a distribuição das ovulações conforme o tratamento. Não se verificou diferenças entre os grupos.

2.5 DISCUSSÃO

O estudo da dinâmica folicular indicou tendência de maior sincronização da emergência da onda de crescimento folicular ($P=0,06$) no grupo tratado com progesterona injetável associada ao benzoato de estradiol (BE), quando comparado ao grupo que recebeu somente BE. Porém, este achado não influenciou a eficiência do protocolo de superovulação com IATF em doadoras Nelore.

O método farmacológico mais empregado para a sincronização de início de onda de crescimento folicular é a associação de estrógeno com progesterona/progestágenos (BÓ et al., 1993; 1995). Estudos recentes indicaram que o uso da progesterona injetável no início do tratamento com dispositivo intravaginal de progesterona (DIB) sincroniza mais eficientemente a onda de crescimento folicular em vacas Nelore (*Bos indicus*). Martins et al. (2005) observaram, de forma semelhante ao ocorrido neste trabalho, maior sincronização na emergência e atraso no dia de início da onda de crescimento folicular quando se utilizou a associação progesterona injetável mais BE ($4,2 \pm 0,1^{a,y}$) que em animais que receberam somente BE no início do tratamento com dispositivos intravaginais novos ($3,1 \pm 0,2^{b,x}$) ou reutilizados ($2,8 \pm 0,2^{b,x}$; usados uma vez). Este estudo apresentou resultados semelhantes aos descritos para fêmeas *Bos taurus* (MORENO et al., 2001).

Em outra investigação Sá Filho et al. (2005a) testaram o efeito de diferentes doses (2 ou 3 mg) e/ou momentos (Dia 0 ou Dia 1) da aplicação de BE ou a associação de BE e progesterona injetável no início do tratamento com dispositivo intravaginal de progesterona (Dia 0) em vacas Nelore. O tratamento com BE+P4 no Dia 0 apresentou melhor sincronização da emergência da onda de crescimento folicular ($4,0 \pm 0,0^{ab,y}$) que os tratamentos com apenas BE (2mg no D0= $3,6 \pm 0,2^{b,x}$; 2mg no D1= $4,3 \pm 0,2^{a,x}$; 3mg no D0= $4,0 \pm 0,2^{ab,x}$ e 3mg no D1 $4,2 \pm 0,3^{a,x}$). Nos resultados do presente experimento não se verificou atraso do início da onda de crescimento folicular ($P=0,10$; $3,6 \pm 0,2$ para G BE vs. $4,0 \pm 0,1$

para G BE+P4). No entanto, houve tendência de variação da emergência folicular ser menor para o grupo tratado com progesterona ($p=0,06$). Entretanto, como era esperado, este fato não influenciou o momento da ovulação, a taxa de ovulação e a produção embrionária. Esses dados não corroboram com os estudos de Nasser et al. (1993), que verificaram maior eficiência da superovulação quando o tratamento é realizado no início da onda de crescimento folicular.

Pode-se supor que a sincronização da emergência folicular com o tratamento somente com BE no Dia 0 do protocolo seja suficiente para eficiente superestimulação ovariana.

2.6 CONCLUSÕES

A hipótese de que o tratamento intramuscular com benzoato de estradiol associado à progesterona no início do protocolo sincroniza mais eficientemente a emergência da nova onda de crescimento folicular e aumenta a produção de embriões em vacas Nelore (*Bos indicus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo foi rejeitada.

Dentro dos objetivos propostos é possível concluir que:

- O tratamento com progesterona injetável no dia 0 não aumentou a eficiência do protocolo de superovulação em doadoras Nelore.

3 EXPERIMENTO 3: EFEITO DO NÚMERO DE INSEMINAÇÕES EM VACAS NELORE (*Bos indicus*) SUPEROVULADAS E INSEMINADAS EM TEMPO FIXO

3.1 HIPÓTESE

Como ocorre pequena dispersão das ovulações com uso de protocolo de sincronização em vacas Nelore superovuladas, a hipótese do presente experimento é de que o emprego de uma inseminação artificial em tempo fixo não compromete a produção de embriões.

3.2 OBJETIVOS

- Avaliar a produção de embriões em doadoras Nelore que receberam uma ou duas inseminações em protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Animais

Foram utilizadas 10 vacas da raça Nelore (*Bos indicus*, Figura 7), puras de origem (PO), com idade e peso médios, respectivamente, de cinco anos e, 550 kg e paridas a um intervalo mínimo de $70 \pm 18,4$ dias.

Figura 7 - Doadoras Nelore da Fazenda VR Santana utilizadas no experimento.

3.3.2 Instalações e Manejo Nutricional

Os animais eram pertencentes à Fazenda VR Santana, localizada no município de Cassilândia, Bolsão do Matogrosso do Sul, foram mantidos sob as mesmas condições de ambiente e alimentação, em sistema extensivo, recebendo suplementação mineral *ad libitum* em cocho coberto, de acordo com as exigências de manutenção e produção, fornecidas pelo NRC (2001).

3.3.3 Protocolos para superovulação com inseminação artificial em tempo fixo

As doadoras foram divididas homogeneamente em dois grupos: G-1IATF (Figura 8) e G-2IATF (Figura 9). Os animais receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (P_4 ; DIB[®], Syntex, Argentina) associado a 2 mg de benzoato de estradiol (BE; Ric BE[®], Syntex, Argentina) no Dia 0. A superestimulação folicular com FSHp (133mg, Folltropin[®], Bioniche, Canadá) teve início no Dia 4 (8 doses decrescentes de 12/12 horas). No dia 6, administrou-se uma dose de PGF2 α (Prolise[®], Syntex, Argentina). Os dispositivos de P_4 foram removidos 36 horas após a aplicação de PGF2 α e o LH (25 mg de LH, Lutropin-V[®], Bioniche, Canadá) foi aplicado 48 horas após a PGF2 α (12h após o último FSH). No G-2IATF as vacas receberam 2 inseminações 12 e 24 horas após o tratamento com LH. As vacas do G-1IATF receberam apenas 1 inseminação 16 horas após a aplicação do LH. Todas as vacas do experimento foram inseminadas com uma única partida de sêmen.

U.S. – acompanhamento do desenvolvimento folicular por ultra-sonografia.

Figura 8 - Grupo 1IATF: 16 horas após a aplicação do LH

U.S. – acompanhamento do desenvolvimento folicular por ultra-sonografia.

Figura 9 - Grupo 2IATF: Inseminações 12 e 24 horas após LH

3.3.4 Avaliações ultra-sonográficas

Foram realizados exames ultra-sonográficos (SCANER 200, Pie Medical, Holanda) com intervalos de 12 horas a partir do momento da inserção do dispositivo até a emergência da nova onda de crescimento folicular. Também, foram realizados exames ultra-sonográficos com intervalos de 12 horas a partir do momento da administração do LH até 72 horas após, com intuito de avaliar o número de folículos aptos à ovulação (> 8 mm), a taxa de ovulação e o momento das ovulações e no D15 para quantificar os corpos lúteos formados para a determinação da taxa de ovulação.

3.3.5 Colheitas de embriões

Empregou-se a mesma metodologia apresentada no experimento 1 do capítulo 1.

3.3.6 Delineamento Experimental e Análise Estatística

Os animais ($n=10$) foram divididos em dois grupos experimentais. Todos os animais foram submetidos a todos os tratamentos possíveis (delineamento “*cross-over*”), objetivando evitar efeitos individuais no resultado. As variáveis foram analisadas por ANOVA, a homogeneidade das variâncias (dispersão do momento das ovulações), pelo teste de Bartlett e a comparação das proporções pelo teste de Qui-quadrado. Adotou-se nível de significância de 5%. Não foram observadas interações e o programa estatístico utilizado foi o SAS for Windows.

3.4 RESULTADOS

Não foram observadas interações entre os tratamentos e as réplicas. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para todas as variáveis analisadas. Os dados estão ilustrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Efeito do número de inseminações na eficiência de programas de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em vacas Nelore (*Bos indicus*), Fazenda VR Santana, Cassilândia-MS

	Efeitos Principais		
	Número de Inseminações		Efeitos Valor P (teste F)
	1 IATF	2IATF	
Número de observações	10	10	
Folículos > 8 mm D8 (LH)	16.2±1.4	14.8±1.2	0,20
CL D15 (colheita embriões)	10.5±1.3	9.2±0.7	0,23
Tx ovulação (%)	63.8±3.8	64.2±4.3	0,94
Tx recuperação (%)	80.5±4.4	77.6±4.8	0,74
Total estruturas	8.2±0.9	7.2±0.8	0,35
Embriões transferíveis	4.3±0.7	4.2±0.6	0,91
Embriões congeláveis	2.9±0.6	2.8±0.4	0,89
Estruturas não fertilizadas	0.6±0.2	0.8±0.2	0,57
Embriões degenerados	3.3±0.9	2.2±0.3	0,36
Intervalo entre a 1ª e a última ovulação	32.4±1.8	33.6±1.6	0,61

Gráfico 4 - Distribuição das ovulações de acordo com o momento da administração do LH para os dois grupos experimentais (1 ou 2 IATF) em vacas Nelore (*Bos indicus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo.

O gráfico 4 demonstra o número total de ovulações ocorridas de acordo com o momento da administração do LH.

3.5 DISCUSSÃO

Neste experimento, as vacas do grupo G-2IATF receberam 2 inseminações 12 e 24 horas após o tratamento com LH. As vacas do G-1IATF receberam apenas 1 inseminação 16 horas após a aplicação do LH. Não foram identificadas diferenças para nenhuma das variáveis analisadas, entre elas principalmente, estruturas totais, embriões transferíveis, embriões congeláveis e estruturas não fertilizadas.

Os resultados do Experimento 1 deste Capítulo mostram que em *Bos indicus* a aplicação do LH 48 horas após a administração de PGF não só aumentou a produção de embriões transferíveis ($p=0,004$), como também, induziu maior sincronização entre as ovulações ($p=0,02$).

Essa boa taxa de sincronização das ovulações provavelmente foi o que possibilitou a utilização de uma única IATF no presente estudo, uma vez que empregou-se o mesmo protocolo. Neste trabalho, o intervalo entre a primeira e a última ovulação foi de $32,4 \pm 1,8$ e $33,6 \pm 1,6$ horas para o grupo 1 IATF e 2 IATF respectivamente. Alguns trabalhos com bovinos relatam a capacidade dos espermatozoides em manter viabilidade pós-descongelamento por até 36 horas no trato reprodutivo da fêmea, sendo que, esta viabilidade está relacionada ao volume e principalmente à concentração espermática (ANDERSON et al., 2004).

Considerando que a viabilidade média do sêmen descongelado é de 24 horas, acredita-se que uma única inseminação artificial foi capaz de cobrir o período em que ocorreram 89% das ovulações, o que provavelmente proporcionou o resultado semelhante entre os tratamentos com relação a produção de embriões viáveis.

Outro fato de relevância é apresentado por Baruselli et al., 2007, que sugerem diferença na taxa de fertilidade entre diferentes touros utilizados em programas de IATF. Touros que possuem sêmen com baixa capacidade fecundante, seja ela de origem congênita ou adquirida, podem não proporcionar os mesmos resultados encontrados neste experimento.

De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que não houve diferença significativa na produção de embriões viáveis quando se utilizou 1 ou 2 inseminações em doadoras Nelore superovuladas e inseminadas em tempo fixo.

3.6 CONCLUSÕES

A hipótese de que o emprego de uma inseminação artificial em tempo fixo não compromete a produção de embriões foi aceita.

Dentro dos objetivos propostos é possível concluir que:

- Não houve diferença na produção de embriões com o emprego de uma ou duas IATFs em doadoras Nelore superovuladas.

4 CONSIDERAÇÕES GERAIS

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação pode-se inferir que manejos reprodutivos distintos sejam aplicados para *Bos indicus* e *Bos taurus*, especialmente quanto ao momento de aplicação do indutor de ovulação em protocolos de superovulação com uso da inseminação artificial em tempo fixo.

Embora o tratamento com progesterona injetável no início do protocolo de sincronização tenha apresentado tendência em sincronizar de forma mais eficiente a emergência da nova onda de crescimento folicular, não foi observado efeito desse tratamento na produção e na qualidade embrionária em vacas Nelore superovuladas e inseminadas em tempo fixo.

Não houve diferença significativa na produção de embriões viáveis quando se utilizou 1 ou 2 inseminações em doadoras Nelore superovuladas e inseminadas em tempo fixo, porém é importante sempre considerar a qualidade do sêmen utilizado em programas de superovulação com emprego de protocolos que utilizem inseminação artificial em tempo fixo.

REFERÊNCIAS

ADAMS, G. P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation. **Theriogenology**, 41: p. 19-24, 1994.

ALVAREZ, P.; SPICER, L. J.; CHASE, J. R. C. C.; PAYTON, M. E.; HAMILTON, T. D.; STEWART, R. E.; HAMMOND, A. C.; OLSONTA 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.

ANDERSON, M.; TAPONEN, J.; KOSKINEN, E.; DA HLBOM, M. Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozez-thawed spermatozoa and semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows. **Theriogenology**, v. 61, p. 1583-1588, 2004.

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

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BÓ, G. A. The use of hormonal treatments to improvereproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 479- 86, 2004.

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 (Folotropin-v) em protocolos de superovulação de vacas nelore (*Bos taurus indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo (SOTF). **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 31, p. 244-245, 2003.

BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; REIS, E. L.; NASSER, L. F.; BÓ, G. Novos avanços nos tratamentos de superovulação em doadoras de embriões bovino. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 6., 2005, Córdoba. **Proceedings...** 2005, 1 CD-ROM.

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

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

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

BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P. S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1451-1463, 2001.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, 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.; ADAMS, G. P.; NASSER, L. F.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. **Theriogenology**, v. 40, n. 2, p. 225-239, 1993.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; TRÍBULO, H. E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R. J. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v. 41, n. 8, p. 1555-1569, 1994.

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

BÓ, G. A. ; BARUSELLI, P. S.; MARTINEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 307-326, 2003.

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-pointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 53-72, 2002.

BÓ, G. A.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. The effect of estradiol valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cows with Syncro-Mate-B implants. **Theriogenology**, v. 36, n. 2, p. 169-183, 1991.

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. Suplemento.

BONI, R.; ROELOFSEN, M. W. M.; PIETERSE, M. C.; KOGUT, J.; KRUIP, T. H. A. M. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology**, v. 48, p. 277-289, 1997.

CARDOSO, C. Brasil será a quarta economia, diz consultoria. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 04 mar. 2006. Seção Dinheiro (Além da Imaginação). Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/fsp/dinheiro/fi04032006.07.htm>. Acesso em: 18 maio 2006.

CARVALHO, J. B. P. **Sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®) em novilhas *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus* e *Bos taurus***. 2004. 122p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, N. A. T.; REIS, E. L.; NICHI, M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, 2007. (submetido para publicação).

CASTILHO, C.; GARCIA, J. M.; RENESTO, A.; NOGUEIRA, G. P.; BRITO, L. F. C. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 189-96, 2006.

COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. **Theriogenology**, v. 60, n. 5, p. 855-865, 2003.

COLAZO, M. G.; MARTINEZ, M. F.; SMALL, J. A.; KASTELIC, J. P.; BURNLEY, C. A.; WARD, D. R.; MAPLETOFT, R. J. Effect of estradiol valerate on ovarian follicle dynamics and superovulatory response in progestin-treated cattle. **Theriogenology**, v.63(5): p. 1454-68, 2005.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. Brasília: CNA; 2005. Disponível em: <http://www.cna.org.br>>. Acesso em: 21 nov. 2005.

DE SILVA, A. W. M. V.; ANDERSON, G. W.; GWAZDAUSKAS, F. C.; MCGILLIARD, M. L.; LINEWEAVER, J. A. Correlations with estrous behavior and conception in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 64, p. 2409-2418, 1981.

D'OCCHIO, M. J.; NEISH, A.; BROADHURST, L. Differences in gonadotrophin secretion postpartum between Zebu and European breed cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 22, p. 311-317, 1990.

D'OCCHIO, M. J.; SUDHA, G.; JILELLA, D.; WHITE, T.; MACLELLAN, L. J.; WALSH, J.; TRIGG, T. E.; MILLER, D. Use of GnRH agonist to prevent the endogenous LH surge and injection of exogenous LH to induce ovulation in heifers superstimulated with FSH: a new model for superovulation. **Theriogenology**, v. 47, p. 601-613, 1997.

FERNANDES, C. A. C.; SANTOS, I. C. Follitropin-V dose-response on the superovulation of beef heifers. **Arquivos da Faculdade de Veterinária. UFRGS**, 2000; 28. v. 28, p.97, 2000. Suplemento 1.

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

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 109-126, 2004.

GIMENES, L. U. **Estudo da divergência folicular e da capacidade ovulatória em bubalinos (*Bubalis bubalis*) e zebuínos (*Bos indicus*)**. 2006. 113 p. Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

GIMENES, L. U.; CARVALHO, N. A. T.; SÁ FILHO, M. F.; SANTIAGO, L. L.; CARVALHO, J. B. P.; MAPLETOFT, R. J. Capacidade ovulatória em novilhas *Bos indicus*. **Acta Scientiae Veterinary**, v.33:209, 2005.

GIMENES, L. U.; CARVALHO, N. A. T.; SÁ FILHO, M. F.; SANTIAGO, L. L.; CARVALHO, J. B. P.; MAPLETOFT, R. J.; BARROS, C. M.; BARUSELLI, P. S. Capacidade ovulatória em novilhas *Bos indicus*. **Acta Scientiae Veterinary**, v. 33, suppl. 1, p. 209, 2005a Suplemento 1.

GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; MADUREIRA, E. H.; TRINCA, L. A.; BARROS, C. M.; BARUSELLI, P. S. Estudo ultra-sonográfico da divergência folicular em novilhas Nelore (*Bos indicus*). **Acta Scientiae Veterinary**, v. 33, suppl. 1, p. 210, 2005b Suplemento 1.

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 87, p. 223-230, 1989.

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

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

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; KOT, K. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 197-205, 2001.

KASTELIC, J. P.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. **Theriogenology**, v. 33, p. 1269-1278, 1990.

KAWAMATA, M. Relationships between the number of small follicles prior to superovulatory treatment and superovulatory response in Holstein cows. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 56 n.s., p. 965-7, 1994.

LANDAETA-HERNÁNDEZ, A. J.; PALOMARES-NAVEDA, R.; SOTO-CASTILLO, G.; ATENCIO, A.; CHASE JR, C. C.; CHENOWETH, P. J. Social and breed effects on the expression of a PGF₂ induced oestrus in beef cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, p. 315-320, 2004.

LUCY, M. C.; SAVIO, J. D.; BADINGA, L.; LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3615-3626, 1992.

STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. **MANUAL DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES**, 3ed., In: International embryo transfer society, 180p. 1998.

MAPLETOFT, R. J.; STEWARD, K. B.; ADAMS, G. P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reproduction and Nutricional**, v. 42 n.6: p. 601-611, 2002.

MARTINEZ, M. F.; ADAMS, G. P.; KASTELIC, J. P.; BERGFELT, D. R.; MAPLETOFT, R. J. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. **Theriogenology**, v. 54, n. 5, p. 757-769, 2000.

MARTINS, C. M.; CASTRICINI, E. S. C.; SÁ FILHO, M. F.; GIMENES, L. U.; BARUSELLI, P. S. Dinâmica folicular em novilhas e vacas nelore (*Bos indicus*) tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona novo ou reutilizado associado ou não a progesterona injetável. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 33, p. 227, 2005. Suplemento 1.

MIZUTA, K. **Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, progesterona e estradiol que precedem a ovulação em fêmeas bovinas Nelore (*Bos taurus indicus*), Angus (*Bos taurus taurus*) e Nelore x Angus (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*).** São Paulo, 2003. 98f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MONTIEL, F.; AHUJA, C. Body condition and suckling as factors influencing the duration of postpartum anestrus in cattle: a review. **Animal Reproduction Science**, v. 85, p. 1-26, 2005.

MORENO, D.; CUTAIA, L.; VILLATA, M. L.; ORTISI, F.; BÓ, G. A. Follicular wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and progesterone. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 408, 2001.

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. 713-724, 1993.

NASSER, L. F.; BÓ, G. A.; MENEGATI, J. A.; MARQUES, M. O.; MEPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Superovulatory response during the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 59, Abstracts, p. 530, 2003.

NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M. Timing of ovulation in Nelore cows superstimulated with P36 protocol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p.509, 2003.

NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, B. J. P.; ANDREUSSI, P. A. T.; D'OCCHIO, M. J.; BARROS, C. M. Embryo recovery and pregnancy rates after delay of ovulation and fixed-time insemination in superstimulated Nelore cows. **Theriogenology**, v. 53, p. 505, 2000.

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. 1625-1634, 2002.

- PASCHAL, J. C.; SANDERS, J. O.; KERR, J. L. Calving and weaning characteristics of Angus, Gray Brahman, Gir, Indu-Brazil, Nellore and Red Brahman sired F1 calves. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 2395-2402, 1991.
- PINHEIRO, O. L.; BARROS, C. M.; FIGUEREDO, R. A.; VALLE, E. R.; ENCARNÇÃO, R. O.; PADOVANI, C. R. Estrous behaviour and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2_α or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v. 49, p. 667-681, 1998.
- PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF_{2α} and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915-923, 1995.
- RANDEL, R. D. LH and ovulation in Brahman, Brahman x Hereford and Hereford heifers. **Journal of Animal Science**, v. 43, p. 300, 1976 [Resumo].
- RANDEL, R. D. Seasonal effects on female reproductive functions in the bovine (Indian breeds). **Theriogenology**, v. 21, p. 170-1805, 1984.
- REA, D. O.; CHENOWETH, P. J.; GIANGRECO, M. A.; DIXON, P. W.; BENNET, F. L. Assessment of estrus detection by visual observation and electronic detection methods and characterization of factors associated with estrus and pregnancy in beef heifers. **Theriogenology**, v. 51, p. 1121-1132, 1999.
- 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. 265-277, 1995.
- RHODES, F. M.; MCDUGALL, S.; BURKE, C. R.; VERKERK, G. A.; MACMILLAN, K. L. Invited review: Treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1876-1894, 2003.
- RIEGER, D.; WALTON, J. S.; JOHNSON, W. H.; COY, D. H. The effect of treatment with a LHRH antagonist on the quality of Day-7 embryos collected from superovulated Holstein heifers. **Theriogenology**, v. 33, p. 207, 1990.
- RODRIGUES, C. A.; MANCILHA, R. F.; REIS, E. L.; AYRES, H.; GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; BARUSELLI, P. S. Efeito do número de implantes de norgestomet e do momento da administração do indutor de ovulação em vacas holandesas superovuladas. **Acta Scientiae Veterinary**, v. 33, p. 229, 2005 [Resumo].
- ROMERO, A.; ALBERT J. ; BRINK Z ; SEIDEL Jr G.E. Numbers of small follicles in ovaries affect superovulation response in cattle. **Theriogenology**, v. 35, p. 265, 1991.

RUIZ-CORTES, Z. T.; OLIVERA-ANGEL, M. Ovarian follicular dynamics in suckled zebu (*Bos indicus*) cows monitored by real time ultrasonography. **Animal Reproduction Science**, v. 54, p. 211-220, 1999.

SÁ FILHO, M. F.; GIMENES, L. U.; AYRES, H.; CARVALHO, N. A. T.; CARVALHO, J. B.; BARUSELLI, P. S. Dinâmica folicular de novilhas *Bos indicus* tratadas com implante auricular de norgestomet ou com dispositivo intravaginal de progesterona. **Acta Scientiae Veterinary**, 2005; 33(Supl 1):266 (abstract).

SÁ FILHO, M. F.; GIMENES, L. U.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; CARVALHO, N. A. T.; KRAMER, M. P. S.; FARIA, M. H.; BARUSELLI, P. S. Emergência folicular conforme a dose e o momento de aplicação do Benzoato de Estradiol e de sua associação com progesterona injetável em vacas Nelore (*Bos indicus*) tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona. **IRAC**, 2005a.

SÁ FILHO, M. F.; REIS, E. L.; AYRES, H.; PERES, A. A. C.; CARVALHO, C. A. B.; CARVALHO, J. B.; ARAÚJO, C. A. S. C.; BARUSELLI, P. S. Effect of oestradiol valerate or benzoate on induction of a new follicular wave emergence in *Bos indicus* cows and heifers treated with norgestomet implant. **Journal of Reproduction and Fertility**, 2006; (abstract), in press.

SARTORELLI, E. S.; CARVALHO, L. M.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J.; BARROS, C. M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, p. 2382-2394, 2005.

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

SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS user's guide: statistics**. Versão 8.0. Cary: SAS 2000.

SAVIO, J. D.; KEENAN, L.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, p. 663-671, 1988.

SCHILLO, K. K. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 1271-1282, 1992.

SEGERSON, E. C.; HANSEN, T. R.; LIBBY, D. W.; RANDEL, R. D.; GETZ, W. R. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. **Journal of Animal Science**, v. 59, p. 1026-1046, 1984.

SIMPSON, R. B.; CHASE JR, C. C.; SPICER, L. J.; VERNON, R. K.; HAMOND, A. C.; RAE, D. O. Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular estradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 102, p. 483-492, 1994.

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

THIBIER, M. More than half a million bovine embryos transferred in 2002: a report from the IETS data retrieval committee. **IETS Newsletter**, v.2, n. 1, p. 12, 2003.

VAN VLIET, J. H.; VAN EERDENBURG, F. J. C. M. Sexual activities and oestrus detection in lactating Holstein cows. **Animal of Behav Science**, Appl. 1, v. 50, p. 57-69, 1996.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 2501-2509, 2000.

WEBB, R.; GOSDEN, R. G.; TELFER, E. E.; MOOR, R. M. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. **Animal Science**, v. 68, p. 257-284, 1999.

WHITE, F. J.; WETTEMANN, R. P.; LOOPER, M. L.; PRADO, T. M.; MORGAN, G. L. Seasonal effects on estrous behavior and time of ovulation in non-lactating beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 3053-3059, 2002.

WILLIAMS, G. L. Suckling as a regulator of postpartum rebreeding in cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 8331-852, 1990.

WILLIAMS, G. L.; GAZAL, O. S.; GUZMÁN VEGA, G. A.; STANKO, R. L. Mechanisms regulating suckling-mediated anovulation in the cow. **Animal of Reproduction Science**, v. 42, p. 289-297, 1996.

WILTBANK, M. C.; GÜMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 21-52, 2002.

WILTBANK, M. C.; LOPEZ, H.; SARTORI, R.; SANGSRITAVONG, S.; GÜMEN, A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, v. 65, p. 17-29, 2006.

WOLFENSON, D.; INBARA, G.; ROTH, Z.; KAIMB, M.; BLOCHA, A.; BRAW-TAL, R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology**, v. 62, p. 1042-1055, 2004.

YAAKUB, H.; O'CALLAGHAN, D.; BOLAND, M. P. Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. **Theriogenology**, May; v. 51n7: p. 1259-1266, 1999.

YAVAS, Y.; WALTON, J. S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. **Theriogenology**, v. 54, p. 25-55, 2000.

ZANENGA, C. A; MARQUES, M. O.; SANTOS, I. C. C.; VALENTIN, R.; BARUSELLI, P. S. Comparação entre dois protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*). Apresentado na: XVII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2003. Fortaleza, CE. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.31, n1, p.62, 2003.