

ALTERNATIVAS HORMONAIIS PARA PROGRAMAS DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOVINOS

HORMONAL ALTERNATIVES TO USE IN BOVINE EMBRYO TRANSFER

Luiz Francisco Machado Pfeifer (1); Marcio Nunes Corrêa (2); Luiz Eduardo Pineschi (3)

(1) Médico Veterinário, Mestrando em Medicina Veterinária

(2) Médico Veterinário, M.Sc., Dr., Professor Adjunto – Departamento de Clínicas Veterinária

(3) Graduando em Medicina Veterinária – Estagiário em Clínica Médica de Grandes Animais

Universidade Federal de Pelotas – Faculdade de Veterinária

Hospital Veterinário – Campus Universitário – 96010 900 - Pelotas/RS - www.ufpel.tche.br/hcv

E-mail: vaqueano@ufpel.tche.br - Tel: (53) 275 7506 - 9983 9408

1 RESUMO

A transferência de embriões (TE) é uma biotécnica que permite recolher embriões de uma fêmea doadora transferindo-os para fêmeas receptoras as quais levarão a gestação a termo. Os principais benefícios da TE para a produção animal, em especial para a bovinocultura, são: produzir um número de descendentes superior ao obtido fisiologicamente durante a vida reprodutiva do animal, fornecer base técnica para a implementação de biotécnicas afins, acelerar e conferir maior precisão no processo de seleção animal, permitir a obtenção de descendentes de animais com distúrbios reprodutivos adquiridos sem caracterização genética e controlar a transmissão de doenças infecto-contagiosas. São inúmeros os fatores que interferem na eficiência dos programas de TE, os quais reduzem potencialmente o desempenho reprodutivo das fêmeas submetidas a estes programas. Dentre tais fatores, destacam-se a influência dos protocolos hormonais e a diversidade das respostas individuais a estes tratamentos. Os protocolos buscam manipular o ciclo estral das fêmeas bovinas de maneira a sincronizar o cio e também a ovulação, otimizando os métodos utilizados em um sistema de TE. Esta revisão visa abordar principalmente assuntos relativos à fisiologia e ao controle exógeno do ciclo estral, além de apresentar resultados de protocolos de superovulação de doadoras e sincronização de receptoras, buscando maximizar o retorno zootécnico e econômico desta biotécnica.

Palavras-chave: bovinos; tratamentos hormonais; transferência de embriões.

2 ABSTRACT

The embryos transfer (ET) is a biotechnical that allows to collect embryos of a giver female transferring to the receiving females, which will take the pregnancy to the end. The main benefits of ET to the animal production, in special to the bovines, are: to produce a bigger number of descendants that the physiological number gotten during the animal life reproductive, to supply technique base to the implementation of similar biotechnicals, to speed up and to confer greater precision in the animal selection process, to allow the attainment of descendants of animals with reproductive disturbs acquired without genetic characterization and control the transmission of infectum-contagious diseases. A lot of factors intervene in the efficiency of ET programs, which potentially reduce the reproductive performance of the females submitted to these programs. Amongst such factors, distinguishing the influence of the hormonal protocols and the diversity of the individual answers to these treatments. The protocols search to manipulate the estral cycle of

the bovine females in way to also synchronize the estrus and the ovulation, optimizing the methods used in a system ET. This revision aims to mainly approach relative subjects to the physiology and the exogenous control of the estral cycle, besides presenting resulted of superovulation protocols, searching to maximize the zootechnical and economic return of this biotechnical.

Key words: bovines; hormonal treatments; embryo transfer.

3 INTRODUÇÃO

A transferência de embriões (TE) é uma biotécnica que permite recolher embriões de uma fêmea doadora, transferindo-os para fêmeas receptoras as quais levarão a gestação a termo. Apesar da necessidade da utilização de procedimentos sofisticados para a implantação de um programa de TE, trata-se de uma técnica mundialmente difundida. A técnica foi utilizada pela primeira vez em coelhas. Em bovinos, a primeira TE foi realizada somente em 1951. A TE teve grande expansão a partir da década de 70 com a criação da IETS (Sociedade Internacional de Transferência de Embriões) no Colorado-EUA. No Brasil, somente a partir da década de 80, é que esta técnica foi realmente difundida, principalmente depois da criação, em 1985, da SBTE (Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões), atualmente chamada de Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. A importância básica da TE para a produção animal consiste na possibilidade de uma fêmea produzir um número de descendentes muito superior ao que seria possível obter fisiologicamente durante sua vida reprodutiva. Além disso, permite equacionar problemas de ordem genética e sanitária, contribuindo também para ampliar os conhecimentos de fisiologia, patologia e endocrinologia decorrente da relação entre embrião, órgãos genitais internos e sistema nervoso central. A TE fornece base técnica para realizar a implementação de biotécnicas afins, como a produção de clones e de animais transgênicos, além da bipartição embrionária, sexagem de embriões, análise do genoma e criopreservação de embriões. Trata-se de uma importante ferramenta para o melhoramento zootécnico, pois acelera e confere maior precisão no processo de seleção animal. Neste sentido, a TE apresenta-se como uma biotécnica de grande potencial para a seleção e a proliferação de animais geneticamente superiores, visto que em bovinos, dos aproximadamente 200.000 ovócitos primários presentes no ovário de uma fêmea no momento de seu nascimento, muito poucos resultam naturalmente numa cria, principalmente devido à limitações de caráter biológico, tais como: intervalo entre partos prolongado; gestações simples, raramente gemelar; fatores ambientais, nutricionais, sanitários e econômicos².

Além da utilização em programas convencionais de melhoramento animal, a TE pode ser empregada em programas MOET (Multiple ovulation and Embryo Transfer). O termo MOET é

adotado para programas de melhoramento em núcleos formados por animais selecionados de diferentes populações e que possuam perfil genético privilegiado. Outra característica importante desses programas é a utilização exclusiva da TE e de biotécnicas afins, como instrumento central e que propicie aumento do índice reprodutivo. Além disso, as provas de rendimento de desempenho e de produção são realizadas no próprio núcleo.

A TE é a técnica mais utilizada em todo o mundo para multiplicar animais de alto valor genético⁸. Entretanto, verifica-se no emprego desta biotecnologia, a necessidade de iniciar o tratamento superestimulatório em um momento determinado do ciclo estral. A baixa consistência da produção de embriões viáveis por doadora e o fato de que 20 a 30% das doadoras não produzem nenhum embrião transferível, demonstra a grande variabilidade nas respostas aos tratamentos hormonais, o que pode ser influenciado por fatores relacionados aos tratamentos ou, na maioria das vezes, por fatores individuais associados à características da dinâmica folicular.

Esta revisão, sobre os aspectos hormonais da transferência de embriões, visa abordar principalmente assuntos relativos à fisiologia e ao controle exógeno do ciclo estral, além de apresentar resultados de protocolos de superovulação de doadoras e sincronização de receptoras mediante ao controle exógeno da dinâmica folicular e da ovulação.

4 MÉTODOS DE SINCRONIZAÇÃO DE RECEPTORAS.

Cerca de 70.000 embriões são transferidos no Brasil anualmente, quantidade inferior somente aos 176.000 embriões transferidos nos EUA⁴².

As fêmeas selecionadas como receptoras são animais com atividade estral cíclica, sendo que novilhas são preferencialmente usadas para programas de TE, pois não apresentam limitantes de caráter fisiológico, como as fêmeas em anestro, o que também não exclui vacas ou novilhas em anestro. No caso de fêmeas em anestro é possível induzir artificialmente a atividade sexual cíclica, tendo-se a precaução quanto a sua utilização, pois normalmente os primeiros cios e ovulações, tanto no pós-parto quanto no período peripuberal, apresentam taxas de concepções baixas, provavelmente pela baixa qualidade do ovócito e ou baixa taxa de progesterona, necessária para manter o ambiente uterino apropriado para uma possível gestação³⁵.

Algumas considerações devem ser feitas em relação à sincronia da receptora com a doadora, tendo em vista que no momento da coleta, os embriões apresentam uma importante variabilidade em seus estágios de desenvolvimento (24 a 36 h de diferença). Sendo assim é adequado ter um grau de sincronia de ? 24 horas entre a doadora e a receptora, o que permite eleger a receptora mais apropriada para cada tipo de embrião coletado.

Inúmeros fatores interferem na eficiência de programas de TE com destaque especial à influência das receptoras. Os programas de TE comerciais apresentam baixas taxas de aproveitamento, já que normalmente em um rebanho de receptoras tratadas com protocolos tradicionais, somente 40-50% dos animais são aproveitados para inovulação, se consideramos uma taxa de concepção de 50%, obtém-se apenas 20-25% de gestações ao final do tratamento.

Assim, o incremento nas taxas de concepção e de prenhez das receptoras é fundamental para maximizar o retorno zootécnico e econômico da TE, determinando além de maior número de nascimentos/ano, a redução dos gastos com fêmeas não prenhes no rebanho.

4.1 SINCRONIZAÇÃO DE RECEPTORAS COM PGF2a

A PGF2a (prostaglandina F2 alfa) e seus análogos são os hormônios mais utilizados na sincronização de cio. Porém, a PGF2a apresenta alguns limitantes em seu uso, tais como: necessidade de pessoas qualificadas para detecção de cio, alta variabilidade das respostas ao tratamento e limitada quantidade de receptoras detectadas em cio.

Vários estudos sobre o uso de prostaglandinas, realizados na década de 90, demonstraram que a variação do intervalo entre a aplicação aos sinais de cio e à ovulação, podem ser atribuídos ao estado da onda folicular no momento do tratamento. Se a luteólise for induzida antes da metade do período estático do folículo dominante, indica que este será o folículo ovulatório, sendo que o intervalo tratamento-cio será curto entre 2 e 3 dias. Porém, se a luteólise for induzida após esse momento, o folículo ovulatório será da próxima onda folicular e o intervalo tratamento-cio será maior, entre 4 a 6 dias³³.

Além disso, estudos revelam que a PGF2a, não é efetiva nos primeiros 5 a 6 dias do ciclo estral. Um dos protocolos de sincronização de cios mais usados e mais eficiente, consiste na administração de 2 doses de PGF2a num intervalo de 11 a 14 dias, o que possibilitará que todos os animais tratados estejam em fase luteal no momento da segunda aplicação²¹. Este método é facilmente aplicado a um programa de TE, visto que permite que a primeira dose de PGF2a seja administrada na receptora no momento em que a doadora estiver em cio, antes da superovulação (SOV), com a 2ª dose sendo aplicada após 11-12 dias, ou seja 12 horas antes da aplicação de PGF2a na doadora, fazendo com que o cio da receptora e doadora sejam o mais síncrono possível.

O estudo das características comportamentais durante a fase estral é de grande importância para o emprego de um programa de TE, uma vez que sua aplicação pode ficar comprometida simplesmente devido à baixa eficiência na detecção de estro. Estudos relatam que 56,5% das montas em vacas de corte ocorreram entre 7:00 da manhã e 7:00 da noite. Outros

trabalhos realizados com fêmeas zebuínas, utilizando a detecção visual do estro, indicaram curta duração do cio (± 11 h.), associados à alta incidência de cios noturnos, em torno de 30 a 50%. Estes dados demonstram a dificuldade na detecção de cio, o que pode comprometer tanto um programa de inseminação artificial (IA) quanto um programa de TE.

4.2 USO DO GNRH E SUAS ASSOCIAÇÕES

Um protocolo muito usado para sincronizar a ovulação de receptoras é conhecido como OVSYNCH e consiste no seguinte esquema de tratamento:

100 µg GnRH	PGF2a	100 µg GnRH	TETF*
D0	D7	D9	D16

Esquema:1 Protocolo OVSYNCH de sincronização da ovulação.

* Transferência de embriões em tempo fixo.

A administração de GnRH e seus agonistas (GnRHa), induz a liberação de LH e FSH. A liberação de LH induz a ovulação ou a luteinização de grandes folículos presentes no momento do tratamento. A ovulação do folículo dominante permite a liberação de FSH, podendo ser complementado pelo GnRH exógeno, culminando com mais liberação de FSH, para iniciar o recrutamento de uma nova onda folicular.

O mecanismo de ação do GnRH consiste: a primeira dose irá induzir a liberação de LH, resultando em ovulação ou luteinização do folículo dominante induzindo, conseqüentemente, a emergência de uma nova onda folicular dentro de 2 dias. A administração de PGF2a 7 dias após tem função de induzir a luteólise; 2 dias depois se administra outra dose de GnRH com a intenção de induzir outro pico de LH e sincronizar a ovulação do folículo dominante existente²⁶.

O sistema OVSYNCH mostrou melhores resultados quando usados em vacas do que em novilhas. Resultados de outro estudo confirmaram que o GnRH nem sempre resulta em ovulação ou luteinização do folículo dominante em novilhas. Vale ressaltar que a emergência folicular será efetiva somente quando o tratamento causar ovulação²⁵. Para novilhas têm se obtido maior taxa na sincronização quando entre o GnRH e a PGF2a, for administrado um implante de CIDR-B (Esquema 2) visando prevenir o aparecimento do cio, que ocorre em muitos casos antes da segunda dose de GnRH²⁶.

O início do protocolo OVSYNCH em determinado estágio do ciclo estral é associado com redução na fertilidade; por exemplo, se a 1ª dose de GnRH for aplicada entre o D9 e D12 do ciclo estral, a mesma pode não resultar em ovulação com conseqüente não formação do corpo lúteo (CL). Neste estágio vacas que possuem apenas 2 ondas foliculares, comumente possuem

pequeno potencial de folículo dominante, que não é responsivo ao GnRH. Consequentemente, não há formação de um CL 2 a 4 dias após a injeção de GnRH. O ciclo segue normalmente com a secreção de PGF2a uterina causando a luteólise, sem o aparecimento de cio induzido e sim fisiológico. Outra fase crítica para o uso do OVSYNCH é quando o ovário se encontra no metaestro. Neste estágio, houve uma ovulação fisiológica prévia e o potencial do folículo dominante ainda é pequeno e não é responsivo ao LH (< 9 mm), não havendo resposta à aplicação do GnRH³⁰.

Algumas estratégias vêm sendo desenvolvidas para minimizar o número de vacas que se encontram nestes estágios críticos do ciclo estral no início do tratamento OVSYNCH. Um método é a aplicação de 2 doses de PGF2a, em um intervalo de 14 dias antes do início do tratamento com OVSYNCH, 12 dias depois da segunda dose de PGF2a. Com este tratamento se todas as vacas estiverem ciclando espera-se que 90% das vacas estejam no momento ideal para começar o protocolo, podendo-se obter uma taxa de prenhez de 48%.

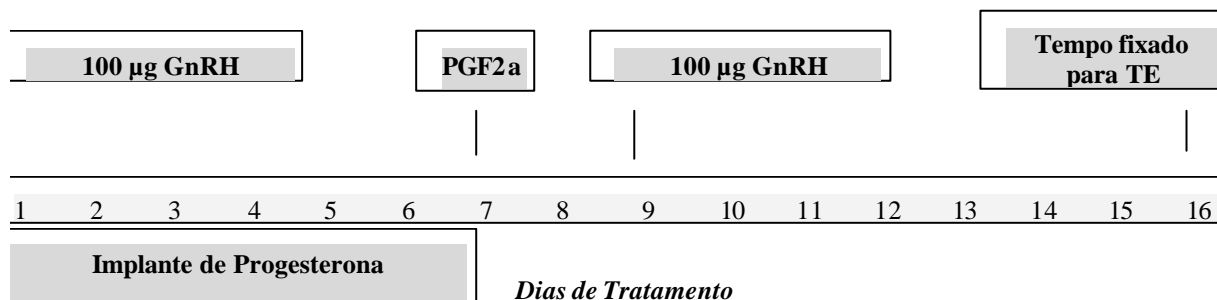
Se observa também, um aumento na taxa de prenhez quando é usada a pré-sincronização com PGF2a (53%), em relação as vacas que são somente submetidas ao OVSYNCH (31%).

Na Tabela 1, encontram-se os resultados de um experimento que avaliou a eficácia do OVSYNCH comparado a um protocolo a base de PGF2a. Neste estudo, foram inovuladas todas as vacas que apresentavam corpo lúteo palpável, confirmado por ultrassografia.

Tabela 1: Taxas de prenhez e aproveitamento (prenhez/tratamento) para vacas sincronizadas com 3 diferentes protocolos.

Tratamento	Prenhez (%)	Aproveitamento - % (Prenhez/Tratamento).
GnRH + PGF2a (c/ detecção cio)	62	40
OVSYNCH	48	44
OVSYNCH + P4	54	50

Fonte: Bó *et al.*, 2001.



Esquema 2: Tratamento para TETF (transferência de embriões em tempo fixo), com OVSYNCH + progesterona sem a necessidade da detecção de cio (Fonte: Bó *et al.*, 2001).

Outra associação que está sendo objeto de muitos estudos é o uso de GnRH associado ao bST (somatotrofina bovina). Foi realizado um estudo com 375 vacas, \pm 74 dias pós-parto, utilizando OVSYNCH para sincronizar a ovulação. Um grupo recebeu 250 μ g de bST no momento da 1 aplicação de GnRH; outro recebeu a mesma dose no dia da 2 aplicação de GnRH. Um grupo controle recebeu apenas o tratamento OVSYNCH. Os resultados da taxa de prenhez são respectivamente, 34,2%, 33,7% e 25%, respectivamente. Estes resultados indicam que o uso de bST pode ter influência positiva na sincronização de receptoras em programas de TE⁴¹.

O sistema OVSYNCH tem sido usado tanto para IA em tempo-fixo, quanto para sincronizar a ovulação em receptoras de embriões, o que descarta a necessidade da detecção de cio, além de aumentar o aproveitamento de receptoras.

4.3 PROGESTÁGENOS

Sabidamente, injeções diárias de progesterona durante um certo período são capazes de sincronizar o cio. Inicialmente, se usavam progestágenos, principalmente progesterona, por longos períodos (12-14 dias). Este período possibilita uma boa sincronização de cio e ovulação, porém é geralmente associado a uma baixa fertilidade³⁸.

Estudos mais recentes indicaram que o uso exclusivo de progestágenos tais como implante de norgestomet, MGA (acetato de melengestrol) na dieta, PRID (*progesterone releasing internal device*), possuem um efeito relativamente baixo na supressão de LH, comparado com a fase luteal normal e pode ser associado com o desenvolvimento de folículos dominantes persistentes³⁹. A baixa fertilidade tem sido atribuída à espontânea maturação (rompimento da vesícula germinativa e expansão da célula do cúmulus) de ovócitos dentro dos folículos dominantes persistentes³⁷. Por outro lado existem pesquisas que indicam que este folículo persistente pode ser induzido a ovular e formar um CL com atividade normal, que supostamente é capaz de manter uma gestação⁴⁶.

4.4 ASSOCIAÇÃO DE PROGESTÁGENOS E ESTRADIOL.

O uso do estradiol em associação com os progestágenos é realizado a mais de 3 décadas, quando foi descoberto que o período de duração da progesterona poderia ser encurtado para 9 dias, se o estradiol fosse administrado no início do tratamento⁴⁷.

A função principal do estradiol é de induzir a regressão dos folículos antrais em crescimento⁶. Os resultados mais eficazes foram obtidos quando o estradiol é aplicado até 1 dia depois da inserção do implante de progesterona.

O mecanismo pelo qual o estradiol causa regressão folicular envolve a inibição do FSH, até que o estradiol seja metabolizado. A partir de então, o FSH volta a aumentar seus níveis e uma nova onda folicular é recrutada. A dose de 5 mg de estradiol 17-β (E-17β), causa uma emergência folicular 4 dias após sua aplicação⁷. O benzoato de estradiol (BE) na dose de 5 mg possui efeito similar, além do que demonstra atividade luteolítica.

Os ajustes nos protocolos são controversos, mas tem-se notado uma maior sincronização da emergência folicular, quando o BE é aplicado no D0 juntamente com 50 mg de P4, do que quando é aplicado apenas BE, mesmo sem ter sido observados aumentos nas taxas de prenhez^{8; 31)}.

Os protocolos demonstrados abaixo usando IA, em tempo fixo (TF), não demonstraram diferenças nas taxas de prenhez em relação aos tratamentos utilizando detecção de cio²⁰.

BE	PGF2a	GnRH	ou	GnRH
D0	D7	D8		D9

CIDR - B

Comentário: Este tratamento pode ser usado com 7,8 ou 9 dias de implante.

Esquema 3: Protocolo de sincronização da ovulação associando progestágeno + BE + GnRH (Fonte: Kastelic, 1996).

Uma série de estudos vem sendo desenvolvidos, com o objetivo de melhorar o aproveitamento de receptoras para programas de TE sem o uso da detecção de cio. Tríbulo⁴³ sugere a aplicação de CIDR-B, combinado com 2 mg de BE e 50 mg de P4, no dia 0 e uma aplicação de PGF2a no dia 7, ou seja, no momento da retirada do CIDR, e mais uma dose de 1 mg de BE no D8, sendo que para todas vacas foram consideradas que o D9 era o dia do estro. Vacas do grupo controle foram tratadas com 2 doses de PGF2a num intervalo de 14 dias com observação de cio durante 5 dias após a segunda aplicação. Após 7 dias da observação dos cios do grupo controle e do D9 do grupo CIDR, as vacas que apresentavam CL funcional (>15 mm) foram inovuladas com embriões congelados.

Na Tabela 2, demonstra-se resultados de taxa de prenhez em receptoras que receberam embriões sem detecção de cio, após o tratamento com CIDR-B por 7 dias e estradiol + progesterona no D0, em comparação com vacas que receberam 2 doses de prostaglandina e foram inovuladas 7 dias após a detecção do cio.

Tabela 2: Taxa de prenhez em receptoras que submetidas a tratamento com CIDR-B ou PGF2a, sem ou com detecção de cio, respectivamente.

Grupo	n	Transferidas/ Tratadas (%)	Prenhez/ Transferidas (%)	Prenhez/ Tratamento (%)
CIDR-B	100	59	62,70	37
PGF2a c/ det. cio	100	60	53,30	32

Fonte: Baruselli, 2000.

Este protocolo não serviu para aumentar o percentual de aproveitamento de receptoras, em relação ao grupo PGF2a, mas conseguiu manter índices similares, mesmo não realizando-se detecção de cio.

Outro dispositivo intravaginal liberador de progesterona disponível no mercado, é o DIV-B (Syntex, Argentina), que contém 1 g de progesterona. Um experimento foi delineado para determinar qual é o efeito do dia da aplicação de PGF2a, em um protocolo de sincronização usando DIV por 8 dias e BE + P4 no D0. A hipótese é que o folículo dominante da onda folicular induzida poderia desenvolver a partir de sua emergência no D4 em um ambiente de baixa progesterona (sendo a única fonte o DIV) e alta frequência nos pulsos de LH, obtendo-se um folículo de grande diâmetro no momento da remoção do implante e ovulação⁴⁰. Tem sido sugerido que o sucesso na indução da ovulação pelo estradiol¹¹ e o tamanho do CL, pode estar relacionado com o tamanho do folículo dominante no momento do tratamento.

Em outro estudo⁴², para avaliar a influência do dia da aplicação de PGF2a foi separado 2 grupos de vacas, que receberam no D0: DIV-B, 2 mg de BE e 50 mg de P4 injetável, sendo que o tratamento só diferiu no dia da aplicação da PGF2a, no D4 ou D8 (dia da retirada do implante). No D9 todas as vacas receberam 1mg de BE e o D10 foi considerado o dia do estro. Dia 16, àquelas que estavam com CL > 10 mm, foram selecionadas para TE. As fêmeas que foram tratadas com PGF2a no D4, não apresentavam aumento no diâmetro do CL, mas apresentaram um aumento da proporção de receptoras selecionadas para transferência, bem como na taxa de prenhez (Tabela 3).

Tabela 3: Diâmetro dos corpos lúteos 1 dia antes da TE e taxas de prenhez em receptoras que receberam tratamento com DIV-B e BE + progesterona no D0 e transferidas sem detecção de cio, com a PGF2a aplicada em diferentes momentos do protocolo.

Grupo	n	CL (mm)	Transferidas/ Tratadas (%)	Prenhez/ Transferidas (%)	Prenhez/ Tratamento (%)
PGF2a D4	95	16,5	70	58	41
PGF2a D8	93	16,5	53	40	21

Fonte: Tríbulo, 2000.

4.5 TRATAMENTOS QUE VISAM INCREMENTAR A CONCENTRAÇÃO DE PROGESTERONA PLASMÁTICA E A TAXA DE PREENHEZ.

Cada vez mais tem se intensificado o estudo da relação entre a concentração de progesterona sérica e a taxa de prenhez. Fêmeas que falham na concepção apresentam menores níveis de progesterona do que aquelas que concebem.

O desenvolvimento embrionário e a habilidade do concepto em secretar Interferon-tau, tem sido relacionado com a concentração de progesterona sérica²³. No entanto, os resultados são inconsistentes quanto ao uso de progesterona exógena sobre o efeito na taxa de prenhez.

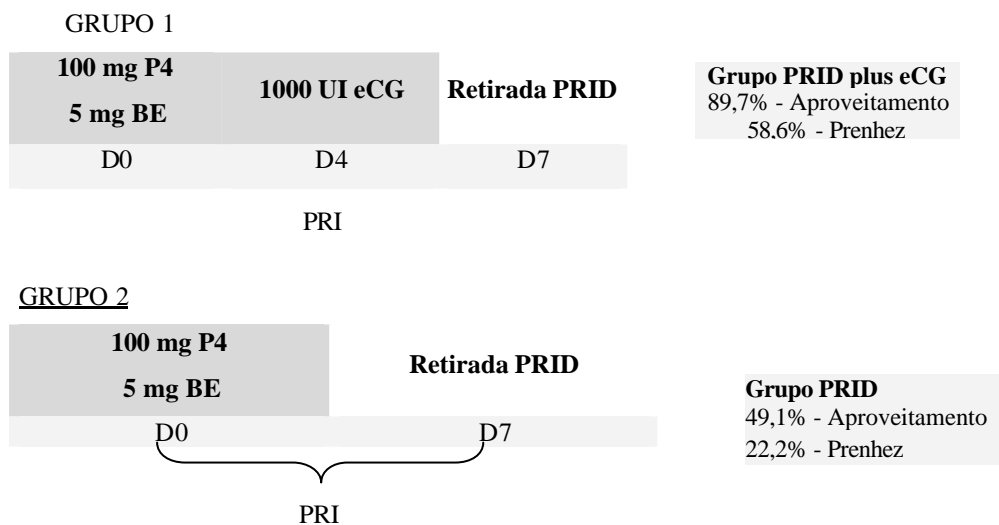
A inserção do CIDR, no momento da inovulação de embriões, resultou em um aumento de 12,8% na taxa de prenhez em receptoras leiteiras que estavam ciclando em um estudo de Entretanto, outros estudos não obtiveram incrementos na taxa de prenhez utilizando CIDR em vacas leiteiras e fêmeas zebuínas e apenas poucos estudos foram capazes de demonstrar a eficiência da suplementação de progesterona em receptoras após a TE de embriões de má qualidade, com melhoria na taxa de prenhez quando foi usados PRID em receptoras com CL de baixa qualidade²².

Uma alternativa é a indução de um CL acessório através da indução da ovulação do folículo dominante pela ação do hCG (gonadotrofina coriônica humana) ou por inserção de um implante de Deslorelin⁷ no dia 5 do ciclo estral⁴¹. Neste estudo, demonstrou que aqueles animais que receberam hCG no D5, obtiveram a formação de um ou mais CLs acessórios em 86,2% das vacas tratadas. O tratamento com hCG no D7 também incrementou a concentração de progesterona em receptoras *Bos Indicus*²⁴, mas os experimentos não foram suficientes para avaliar se houve aumento na taxa de prenhez.

Outra forma que está sendo estudada para aumentar a concentração de progesterona plasmática é através da indução de múltiplas ovulações, através da indução de um maior recrutamento folicular pela utilização de eCG (gonadotrofina coriônica equina) durante o protocolo de sincronização.

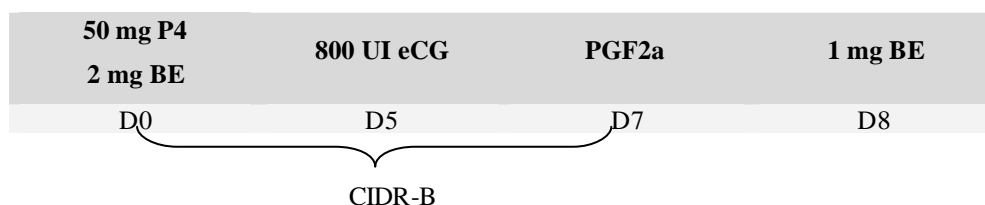
Fuentes e De La Fuente¹⁷ registraram que o tratamento de novilhas holandesas com PRID por 6,5 dias, combinado com 100 mg de P4 e 5 mg de BE no D0, e 1000 UI de eCG no D4 (dia em que é esperado a emergência da nova onda), resultou em múltiplos CLs (2 a 5 por ovário). Este tratamento, conhecido como “PRID plus eCG”, também resultou em maior número de receptoras selecionadas para a TE (89,7%) e um alto percentual de prenhez (58,6%) quando comparado com novilhas que foram tratadas com mesmo protocolo sem o uso do eCG, apresentando 49,1% de receptoras selecionadas e 22,2% de taxa de prenhez (Esquema 4), e quando comparado àquelas sincronizadas com PGF2a (44% e 19%, respectivamente), ou

àquelas que receberam embriões no D7 após detecção de cio natural (50% e 28%, respectivamente).



Esquema 4: Diferentes protocolos para estimar a influência da progesterona exógena sobre as taxas de prenhez (Fonte: Fuentes e de la Fuente, 1997).

Baruselli² realizou um estudo utilizando 100 novilhas que foram tratadas por 7 dias com CIDR, combinado com 2 mg BE e 50 mg P4 no D0. Um grupo de fêmeas recebeu 800 UI de eCG no D5 e todas novilhas receberam PGF2a no D7 e 1 mg de BE no D8 (Esquema 5). Todos animais foram examinados por ultrassonografia um dia antes da TE e amostras de sangue foram coletas para análise da progesterona plasmática. Este tratamento demonstrou um aumento do número de ovulações (CL), aumento da concentração de progesterona plasmática e também da taxa de prenhez (Tabela 4).



Esquema 5: Protocolo para TETF (transferência de embriões em tempo fixo), com utilização da combinação de CIDR, BE, P4 e PGF2a + eCG (Fonte: Baruselli, 2000).

Tabela 4: Número de CLs, concentração de progesterona plasmática, 1 dia antes da TE, e taxas de prenhez com 800 UI de eCG ou sem (controle) no D5.

Grupo	n	CL (N?)	P4 (mg/ml)	Selecionadas/ Tratamento (%)	Prenhez/ Transferida (%)	Prenhez/ Tratamento (%)
Controle	50	0,5 a	1,3 a	34 (17/50) a	29,4 (5/17)	10 (5/50) a
ECG	50	2,6 b	4,2 b	84 (42/50) b	55,3 (21/38)	42 (21/50) b

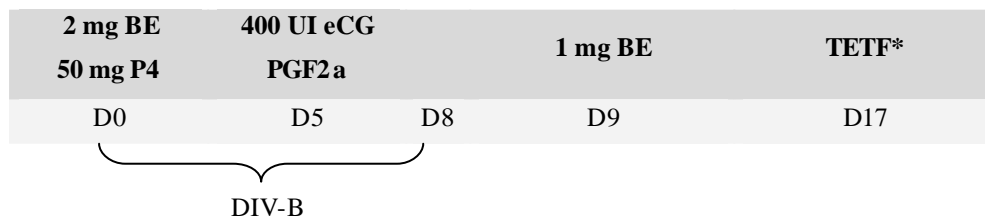
Fonte: Baruselli, 2000.

Outro estudo² buscou demonstrar o efeito de uma menor dose de eCG sobre a taxa de prenhez em receptoras transferidas sem a detecção de cio. Foi usado DIV-B, sendo que uma parte das vacas recebeu 400 UI de eCG no D5 e todas receberam PGF2a no mesmo dia (Esquema 6). O DIV foi removido no D8 e 1 mg BE foi administrada no D9. Todas vacas foram examinadas 1 dia antes da TE. Este tratamento não resultou em múltiplos CLs, sendo que apenas 2% das vacas apresentaram mais que um CL. O tratamento com eCG resultou em aumento do diâmetro do CL e nas taxas de prenhez (Tabela 5).

Tabela 5: Efeito da dose de eCG sobre a taxa de prenhez, aproveitamento de vacas e diâmetro dos CLs em vacas tratadas com DIV-B + P4 e BE no D0, com e sem eCG no D5.

Grupo	n	CL (mm)	Transferidas/ Tratadas (%)	Prenhez/ Transferida (%)	Prenhez/ Tratamento (%)
Controle	156	17,7 a	81,4 a	41,7 a	33,9 a
eCG	156	18,5 b	84,6 a	57,6 b	48,7 b

Fonte: Baruselli, 2000.



Esquema 6: Protocolo de TETF, usando 400 UI de eCG e inovuladas no D17, sem detecção de cio (Baruselli, 2000).

*TETF: transferência de embriões em tempo fixo

O razão das discrepâncias entre os resultados dos protocolos que usam progestágenos não está claro, no entanto, tem sido registrado que tratamentos com progestágenos mostraram uma expressão de cio maior do que naqueles que usam PGF2a.

Os tratamentos de sincronização que usam progesterona e estradiol podem induzir o cio e a ovulação em vacas que não tiveram um período pós-parto adequado ou insatisfatória condição corporal⁴⁴.

5 MANIPULAÇÃO DA ONDA FOLICULAR PARA SUPEROVULAÇÃO

Denomina-se superovulação o aumento do número fisiológico de ovulações, próprio de cada espécie, provocado através da administração exógena de gonadotrofinas. Nos bovinos se considera que houve resposta ao tratamento quando se consegue mais de 2 ovulações.

Donaldson¹⁴ em um estudo com 1263 doadoras, demonstrou que 68% das fêmeas que foram superestimuladas produziram embriões transferíveis e nas outras 32% foi observado: 7% não responderam; 7% não produziram nenhuma estrutura; 17% não produziram embriões transferíveis e 1% apresentaram cio antes da aplicação de PGF2a.

5.1 VARIABILIDADE DA RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA

5.1.1 Variabilidade devido os tratamentos hormonais

- Gonadotrofina

Os principais hormônios que são utilizados para superovular fêmeas são a gonadotrofina coriônica equina (eCG) ou extratos de pituitária suína (FSHp).

O eCG é uma glicoproteína produzida pelos cálices endometriais e se comprova biologicamente ativa entre os dias 35 e 140 da gestação da égua. A relação FSH/LH deste hormônio varia durante os estágios da prenhez³⁴. O eCG permite que se consiga uma resposta superovulatória com apenas 1 dose entre os dias 8 e 12 do ciclo estral. No entanto, sua permanência prolongada no sangue provoca um crescimento folicular disperso, com altos níveis de estrógeno, que afeta tanto a taxa de fertilização como a qualidade embrionária. O eCG também induz uma resposta imunológica, com produção de anticorpos anti-eCG, o que determina para tratamentos superovulatórios subsequentes, um aumento na dose para que se obtenha o mesmo efeito.

Em 1977 Bindon e Piper⁵, utilizaram um soro anti-eCG para eliminar os efeitos deste hormônio. O momento mais apropriado para administrar este soro é logo após o pico pré-ovulatório de LH. Na prática, é administrado no momento da 1^a inseminação artificial. Em geral o soro anti-eCG melhora os resultados da superovulação, mesmo que existam registros de trabalhos, nos quais o soro não exerceu nenhum efeito benéfico¹³. Outros estudos demonstram

que a neutralização do eCG, poucas horas após o pico de LH, sincroniza a maturação folicular e sincroniza mais o momento das ovulações múltiplas.

O hormônio mais usado em programas de TE é o FSH-p, com o qual o tratamento é feito através de 2 doses diárias durante 4 dias, começando a superestimulação entre os dias 8 e 12 do ciclo estral. Outros hormônios que comprovaram causar superovulação, mesmo sendo pouco utilizados são: EPE (extrato de pituitária eqüina), FSH-O (extrato de pituitária ovina) e uma gonadotrofina isolada da urina de mulheres em menopausa (HMG).

Não existe uma dose hormonal ótima para todas as doadoras, se fazendo necessário adequar a dose de gonadotrofinas para cada animal, o que muitas vezes só é possível após uma ou duas superovulações. No entanto, há uma série de complicações que estão relacionadas com superdosagens dos tratamentos superestimulatórios, tais como:

- Retenção de ovócitos em folículos luteinizados e nos corpos lúteos²⁹.
- Retenção de ovócitos e/ou embriões nos ovidutos²⁷.
- Níveis altos de estrógenos produzidos por grandes folículos não ovulados que bloqueariam a capacidade de captação das fímbrias, conseqüentemente havendo a queda de ovócitos na cavidade abdominal¹⁰.

5.1.2 Relação FSH/LH

A foliculogênese nos mamíferos depende tanto do FSH quanto do LH. As gonadotrofinas utilizadas para induzir a superovulação possuem relação FSH/LH diferentes.

No caso do eCG, a diferença se deve às variações individuais entre as doadoras e também o momento da gestação da égua em que este é coletado. O FSH-p, possui variações que se relacionam fundamentalmente na dificuldade de separar as frações FSH e LH a partir de extratos hipofisários. O HMG se caracteriza por possuir frações equivalentes de FSH/LH.

Foram feitos alguns estudos que demonstraram variações quando a porção de LH foi excessiva:

- Menor taxa de ovulação¹⁶.
- Menor taxa de fecundação¹⁵.
- Menor número e porcentagem de embriões transferíveis¹².

5.2 MODIFICAÇÕES NOS ESQUEMAS DE TRATAMENTO

As modificações nos esquemas de tratamento se limitam exclusivamente ao FSH-p. Tendo em conta que o atual esquema de aplicação do FSH-p representa um problema do ponto de vista prático, pelo número de aplicações necessárias utilizadas em programas de TE. Para tanto tem sido estudadas algumas propostas que visam reverter este quadro:

1. Redução na duração do tratamento: Reduzindo o tratamento de 4 para 3 dias, alguns estudos demonstraram resultados similares aos tratamentos clássicos. Outra mudança relatou o uso de uma única dose administrada no tecido subcutâneo; os resultados foram insatisfatórios, quando usado por outros pesquisadores⁴⁸.
2. Administração de uma dose diária: A intenção é aplicar uma dose diária durante os quatro dias de superestimulação, sugerido mais recentemente por³⁶. Esta inovação não teve aceitação na prática, pois se sabe que a meia vida do FSH é de 12 a 14 horas.
3. Mudança na via de administração: O FSH, geralmente é administrado por via intramuscular em solução salina. Já foi proposta administração contínua de FSH por via intrarterial¹⁹ ou mesmo por via endovenosa⁴⁵, com o objetivo de manter um nível de hormônio no sangue. Estas proposições mostraram que as respostas aos hormônios eram menores, pois pode haver uma saturação dos receptores de FSH da granulosa do folículo.
4. Bó⁶ demonstrou que com uma só administração de 400 mg de Folltropin[®], administrado por via subcutânea, diluído em 20 mL, obtêm-se uma resposta superestimulatória semelhante ao grupo controle, superestimulado pelo método tradicional. Doses maiores mostraram diminuição do número de embriões coletados e transferidos.

5.3 CONTROLE DO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR E SUPEROVULAÇÃO

Nos últimos dez anos foram desenvolvidos vários métodos para controlar farmacologicamente o início da onda de crescimento folicular em bovinos. Para tanto, preconiza-se administração de agonistas do GnRH, LH ou mesmo métodos mecânicos como a aspiração folicular. Entretanto, existem propostas para controlar a onda folicular, através da associação de hormônios como o estrogênio e a progesterona, os quais serão discutidos a seguir.

Os tratamentos tradicionais de superovulação consistem na detecção de cio das doadoras, seja este natural ou induzido pelo uso de PGF2a, com o começo da superestimulação entre os dias 8 e 12 do ciclo estral. A aplicação das gonadotrofinas é feita duas vezes ao dia, durante quatro dias, em doses decrescentes. No entanto, recentes estudos avaliaram especificamente o estado folicular dos animais quando os tratamentos superovulatórios foram iniciados. Isto somente foi possível através do monitoramento dos ovários por ultra-sonografia.

Através do levantamento destes dados, foi possível identificar que entre os dias 8 e 12 do ciclo estral, ou seja, 7 e 11 dias após ovulação, aproximadamente, começa uma nova onda folicular de vacas que possuem de 2 a 3 ondas foliculares por ciclo¹⁸. Está claro que tratamentos superestimulatórios que iniciam no momento da emergência da onda folicular resultam em altas taxas superovulatórias, em relação àqueles que são iniciados em um momento tardio da

emergência folicular. Se os tratamentos com gonadotrofinas forem iniciados com um dia de atraso, em relação a emergência da onda folicular, a resposta superovulatória é reduzida significativamente, comparado quando o tratamento é iniciado no dia exato da emergência da onda folicular.

Aproximadamente 20% do ciclo estral, ou seja, quatro a cinco dias está disponível para começar a superestimulação. Sendo assim, 80% do ciclo estral não é apropriado para se obter boas respostas superovulatórias. Para minimizar estes problemas, uma alternativa adequada é iniciar o tratamento superestimulatório após o controle hormonal exógeno da onda folicular.

A aspiração folicular, guiada por ultra-sonografia, de todos os folículos maiores ou iguais a 5 mm, é uma alternativa pouco usada pra sincronizar a emergência folicular em novilhas. Um dia após a aspiração, as fêmeas devem receber uma dose de FSH seguido de uma aplicação de PGF2a 48 h após⁴.

Outro modo de sincronizar o início da onda folicular envolve o uso de GnRH α ou LH porcino (LH-p). No entanto, foi registrado uma assincronia na emergência folicular (de 3 dias antes a 5 dias depois), sugerindo que não seria apropriado para a superestimulação²⁵.

Um método hormonal, que tem sido usado para controlar o desenvolvimento folicular é a combinação de estrógenos com progestágenos, que consiste em induzir a atresia de folículos antrais presentes, fazendo com que ocorra uma emergência folicular 4,3 dias após o tratamento⁷.

Bó⁹ sugeriu o seguinte tratamento para sincronizar a emergência da onda folicular para superestimulação, aplicando 5mg de E17 β e 100 mg de progesterona, IM, no momento da aplicação do implante de progesterona. Iniciando a superovulação 4 dias depois com FSH (Tabela 6). Os resultados foram comparados com tratamentos tradicionais, o qual é mostrado na tabela abaixo:

Tabela 6: Resposta superovulatória em vacas superovuladas entre os dias 8 e 12 após o cio (tradicional) e vacas tratadas com progestágeno + BE.

Tratamento	Gado de corte			Gado de leite		
	n	Total Ova/embrião	Embriões Transferíveis	n	Total Ova/embrião	Embriões Transferíveis
Tradicional	1073	12,8	6,6	254	8,9	5,1
P4 + E-17 β	307	12,1	6,3	187	10,3	6,0

Fonte: Bó et al., 2001.

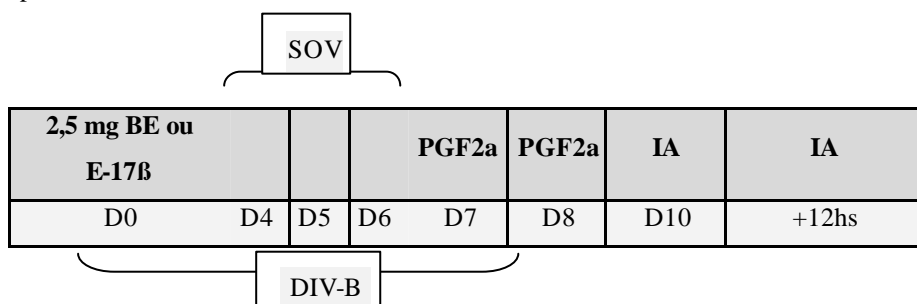
Portanto, este tratamento determina uma resposta similar àquela decorrente do tratamento convencional. Além do que, apresenta a vantagem de se iniciar o tratamento em dia aleatório do

ciclo estral, melhorando a sincronização do grupo de doadoras, facilitando o manejo e realizando os tratamentos em dias previamente programados.

O BE é outro estrógeno disponível no mercado brasileiro, assim como o VE (valerato de estradiol). O tratamento com 2,5 mg de BE associado à aplicação de 50 mg de P4, administrados no momento da inserção do CIDR-B, resultou na sincronização de uma nova onda folicular 2 a 3 dias após, também compatível com aquelas que foram superestimuladas convencionalmente entre os dias 8 e 12 do ciclo estral²⁸.

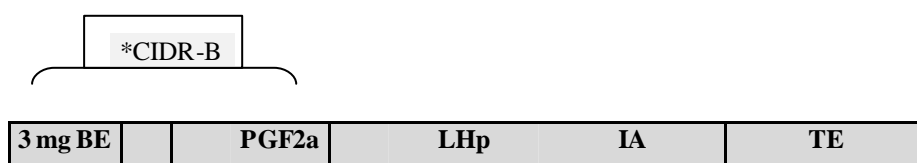
Animais tratados com 5 mg de VE e 3 mg de norgestomet, resultaram na diminuição da sincronização da emergência folicular e uma menor resposta superovulatória do que fêmeas tratadas com 5 mg de E-17 β e 100 mg de progesterona em vacas com dois implantes de sincromateB.

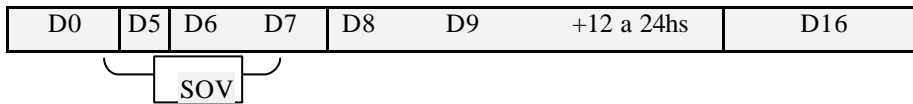
Baruselli³ trabalhou com 105 vacas de corte, comparando o uso de BE e E-17B, no seguinte protocolo de superovulação. Todas as vacas receberam dispositivo DIV-B e 50 mg de P4 no D0, sendo que metade recebeu juntamente uma dose de 2,5 mg E-17 β e a outra metade 2,5 mg de BE. Os tratamentos superovulatórios foram iniciados no D4. As vacas receberam a primeira dose de PGF2a no D7 e a segunda no D8 juntamente com a retirada do implante. Todas as vacas foram inseminadas 48 a 60 horas após a retirada do DIV (Esquema 7). O trabalho não demonstrou diferenças sobre o número de embriões coletados e na qualidade embrionária entre os grupos.



Esquema 7: Protocolo de SOB, usando progesterona em associação com E-17 B (Fonte: Baruselli, 2001).

Zanenga⁴⁹, sugeriu a superovulação em vacas zebuínas utilizando um protocolo que visa a IA sem detecção de cio, associando progestágeno e estrógeno:





*CIDR foi retirado 36 h após aplicação de PGF2a .

Esquema 8: Protocolo de SOV usando CIDR associado com BE, iniciando no D5 (Fonte: Zanenga, 2000).

Os resultados deste experimento foram:

- Número de animais: 10
- Embriões viáveis: $10,3 \pm 5,9$
- Embriões degenerados: $5,2 \pm 6,1$
- Não fertilizados: $2,2 \pm 3,5$
- Total de estruturas: $17,7 \pm 11,7$

Estes resultados sugerem que a IA em tempo-fixo, 12 a 24 horas após a aplicação de PGF2a é viável para programas de TE, sem a necessidade da detecção de cio, concordando com resultados prévios da literatura¹.

Alguns autores sugerem o uso do bST, com a intenção de melhorar a resposta superovulatória e a viabilidade embrionária em vacas doadoras.

Na tentativa de registrar a influência do bST³¹, testou a influência do bST em vacas doadoras superovuladas no momento da inseminação, com o intuito de observar o desenvolvimento embrionário e a viabilidade destes embriões. Foram superovuladas 12 vacas, das quais 6 receberam uma injeção de 500 mg bST (Boostin⁹), no momento da IA e outras 6 não receberam. Os embriões foram coletados 7 dias depois e avaliados. Aqueles de grau 1, foram congelados para serem posteriormente transferidos. Não houve diferença no total de embriões coletados entre o grupo bST e o grupo controle, no entanto o número de ovócitos não fertilizados por coleta, foi menor no grupo bST. O tratamento com bST aumentou a porcentagem de embriões classificados como transferíveis, assim como o número de blastocistos. O experimento demonstrou que as doadoras que receberam bST, aumentaram a capacidade dos ovócitos de serem fertilizados, conseqüentemente diminuindo o número de ovócitos não fertilizados. Vários experimentos usando bST, indicam um aumento nas taxas de prenhez, causado provavelmente pela estimulação no processo de maturação e desenvolvimento embrionário precoce.

Os efeitos que são atribuídos ao bST são, basicamente⁴¹:

- Acelera o desenvolvimento embrionário.

- Afeta os componentes maternos para fertilização, modulação dos fatores de crescimento e outras proteínas do útero e oviduto e diminuição do sinal luteolítico no momento do reconhecimento materno da gestação.

A identificação dos fatores que podem ser influenciados pelo bST e sua eficácia na fertilidade ainda é objetivo de muitos estudos e devem ser melhor esclarecidos.

6 CONCLUSÃO

Tendo em vista os mais diversos protocolos passíveis de serem utilizados, visando otimizar a eficiência da TE, a grande variabilidade nas respostas tem sido um dos maiores problemas na sincronização de cio, bem como nos tratamentos superovulatórios.

A incorporação de técnicas que visam o controle da dinâmica folicular, como as já discutidas, poderá reduzir a variabilidade das respostas aos tratamentos em vacas que apresentam diferentes estágios do ciclo estral. A sincronização de cio através do controle do ciclo estral, proporciona possibilidades interessantes para IA em tempo-fixo e elimina o trabalho da detecção de cio. Os estudos ainda não forneceram um método adequado de minimizar a variabilidade das respostas ovarianas à superestimulação, mas os protocolos envolvendo sincronização da emergência folicular, podem fornecer tratamentos rápidos e eliminando a necessidade da detecção de cio em programas de TE, sem que os resultados biológicos sejam comprometidos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARROS, C.M. Controle farmacológico do ciclo estral e ovulação em zebuínos de corte. **Anais do simpósio sobre controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes**. p. 158-189. São Paulo, SP, 31 de maio a 2 de junho, 2000.
2. BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; CARVALHO, N.A.T.; MADUREIRA, E.H.; COSTA NETO, W.P. Dinâmica folicular em novilhas receptoras de embrião bovino submetidas à sincronização da ovulação para inóvulação em tempo-fixo. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**. v. 28, p. 217, 2000.
3. BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; MADUREIRA, E.H.; COSTA NETO, W.P.; GRANDINETTI, R.R; BÓ, G.A. Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with CIDR-B devices and eCG. **Theriogenology**. v. 55, p. 157 (abstr.), 2001.
4. BERGFELT, D.; BÓ, G.A.; MAPLETOFT, R.J.; ADAMS, G.P. Superovulatory responses following ablation-induced follicular wave emergence at random stage of the oestrus cycle in cattle. **Anim. Reprod. Sci.** v. 49, p. 1-12, 1997.

5. BINDON, B.; PIPER, L. Induction of ovulation in sheep and cattle by injection of PMSG and ovine anti-PMSG immune serum. **Theriogenology**. v. 4, p. 171, 1977.
6. BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; TRIBULO, H.E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R.J. Follicular wave dynamics after oestradiol-17 β treatment of heifers with or without a progesterone implant. **Theriogenology** v. 41, p. 1555-1569, 1994.
7. BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; PIERSON, R.; MAPLETOFT, R. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and oestradiol in cattle. **Anim. Reprod. Sci.** v. 39, p. 193-204, 1995.
8. BÓ, G.A. Sincronização de celos para programas de inseminação artificial e transferência de embriões bovinos. **Anais do Simpósio sobre controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes**. p. 35-60. São Paulo, SP, 31 de maio a 2 de junho, 2000.
9. BÓ, G.A.; TRÍBULO, H.; CACCIA, M.; TRÍBULO, R. Pregnancy rates in embryo recipients treated with progesterone vaginal devices and transferred without estrus detection. **Theriogenology**. v. 55, p. 357 (abstr), 2001.
10. BOOTH, W.; NEWCOMB, R.; STRANGE, H.; ROWSON, L.; SACHER, H. Plasma oestrogen and progesterone in relation to superovulation and egg recovery in the cows. **Vet. Rec.** v. 97, p. 366-369, 1975.
11. BURKE, C.R.; MUSSARD, M.L.; GRUM, D.E.; DAY, M.L. Effects of maturity of the potential ovulatory follicle on induction of estrus and ovulation in cattle with estradiol benzoate. **Anim. Rep. Sci.** v. 66. p. 151-160, 2001.
12. CHUPIN, D.; COMBARNOUS, Y.; PROCUREUR, R.. Antagonistic effect of LH on FSH – induced superovulation in the cattle. **Theriogenology**. v.21, p. 229, 1984.
13. CHUPIN, D.; STEINER, M.; SAUMANDE, J. Neutra-PMSG injected early after the LH peak dose not improve ovulation rate in PMSG treated heifers. **Proceedings XI international Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination, Dublin, Ireland**. p. 147, 1988.
14. DONALDSON, L. Comparison of Cloprostenol and Dinoprost Tromethamine for the control of estrus in bovine embryo transfer. **Theriogenology**. v. 21, p. 1019-1022, 1984.
15. DONALDSON, L.; WARD, D.; GLENN, S. Use of porcine follicle stimulating hormone after chromatographic purification in superovulation of cattle. **Theriogenology**. v. 25, p. 747-757, 1986.
16. DONALDSON, L.; WARD, D. LH effects on superovulation and fertilization rates. **Theriogenology**. v. 27, p. 225, 1987.
17. FUENTES, S.; DE LA FUENTE, J. Different synchronization treatments for direct embryo transfer to recipient heifers. **Proc XIII annu Mtg AETE**, Lyon, France, p. 148 (abstr), 1997.
18. GINTHER, O.J.; KNOFF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **J. Reprod. Fert.** v. 87, p. 223-230, 1989.

19. GUILBAULT, L.; BRASSARA, P.; ENAJI, A. Superovulation by continuous aortic infusion of follicle stimulating hormone (FSH-p) in cattle. **Theriogenology**. v. 27, p. 233, 1987.
20. KASTELIC, J.P.; MCARTNEY, D.H.; OLSON, W.O.; BARTH, A.D.; GARCIA, A.; MAPLETOFT, R.J. Estrus synchronization in cattle using estradiol, melengestrol acetate and PGF. **Theriogenology**. v. 46, p. 295-1304. 1996.
21. MACMILLAN, K.L.; DAY, A. Prostaglandin F2? a fertility drug in dairy cattle? **Theriogenology**. v. 18, p. 245-253, 1982.
22. MACMILLAN, K.L.; TAUFAN, V.K.; HAYMAN, D.L. Pregnancy rates in lactating dairy cows used as recipients for frozen/thawed embryos and receiving supplemental progesterone. **New Zealand Embryo Transfer Workshop** Hamilton, NZ, p. 34-35, 1994.
23. MANN, G.E.; LAMMING, G.E.; ROBINSON, R.S.; WATHES, D.C. The regulation of interferon tau production and uterine hormone receptors during pregnancy. **Reprod. Fert.** v. 54 (suppl.), p. 317-328, 1999.
24. MARQUES, M.O.; MADUREIRA, E.H.; BARUSELLI, P.S.; BÓ, G.A. Ovarian ultrasonography and plasma progesterone concentration in Bos Taurus x Bos Indicus heifers administered different treatments on day 7 of the estrus cycle. **Theriogenology**. v. 57, p. ? (abstr.), 2002.
25. MARTINEZ, M.F.; ADAMS, G.P.; BERGFELT, D.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R.J. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first wave in heifers. **Anim. Reprod. Sci.** v. 57, p. 23-33, 1999.
26. MARTINEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; ADAMS, G.P.; COOK, R.B.; OLSON, W.O.; MAPLETOFT, R.J. The use of progestins in regimens for fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Theriogenology**. 2001.
27. MC GOWAN, M.; BRAITHWAITE, M.; JOCHLE, W.; MAPLETOFT, R. Superovulation of beef heifers with Pergonal (HMG): A dose response trial. **Theriogenology**. v. 24, p. 173-184, 1985.
28. MEYER, J.A.; WIDEMAN, D.Jr.; LONEY, C.R.; LONG, C.R.; BÓ, G.A.; DAY, M.L.; ANDERSON, J.C.; FORREST, D.W. Embryo production rates of cattle superovulated with or without the presence of an intravaginal progesterone-releasing device. **Theriogenology**. v. 53, p. 504 (abstr.), 2000.
29. MONNIAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. Superovulatory response of cattle. **Theriogenology**. v. 19, p. 55-81, 1983.
30. MOREIRA, F.; ORLANDI, C.; RISCO, C.; LOPES, F.; MATTOS, R.; THATCHER, W.W. Pregnancy rates to a timed insemination in lactating dairy cows pre-synchronized and treated with bovine somatotropin: Cyclic versus anestrus cows. **J dairy Sci.** v. 83, (Suppl.), p. 1-134, 2000.
31. MOREIRA, F.; BADINGA, L.; BURNLEY, C.; THATCHER, W.W. Effects of bovine somatotropin on embryo transfer in lactating dairy cows. **Theriogenology**. v. 53, p. 367 (abstr.), 2001.

32. MORENO, D.; CUTAIA, L.; VILLATA, M.L.; CACCIA, M.; GATTI, G.; TRÍBULO, R.; TRIBULO, H.; BÓ, G.A. Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and progesterone. **Theriogenology**. v. 55, p. 408 (abstr.), 2001.
33. ODDE, K.G. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. **J. Anim. Sci.** v. 68, p. 817-830. 1990.
34. P APKOFF, H. Variations in the properties of equine chorionic gonadotrophin. **Theriogenology**. v. 15, p. 1-11, 1981.
35. PIMENTEL, C.A. Ginecologia Bovina. **Curso de Ginecologia Bovina** Tapes/RS, p. 35, 11-15 de março de 2002.
36. PURWANTARA, B.; SCHIMIDT, M.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Follicular development and embryo recovery following 3 versus 8 FSH injections in heifers. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v. 35, p. 89-93, 1994.
37. REVAH, I.; BUTLER, W. Prolonged dominance of follicles reduces the viability of bovine oocytes. **J. Reprod. Fert.** v. 106, p. 39-47, 1996.
38. ROCHE, J. Synchronization of estrus and fertility following artificial insemination in heifers given Prostaglandine F2?. **J. Reprod. Fert.** v. 7, p. 135-139, 1974.
39. SAVIO, J.D.; THATCHER, W.W.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R.L.; WOLFENSON, D. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrus cycle in cows. **J. Reprod. Fert.** v. 97, p. 197-203, 1993.
40. STOCK, A.E.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dominance in cattle: Relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. **Endocrinology**. v. 132, p. 1108-1114, 1993.
41. THATCHER, W.W.; MOREIRA, F.; SANTOS, J.P.; MATTOS, R.C.; LOPEZ, F.L.; PANCARCI, S.M.; RISCO, C.A. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. **Theriogenology**. v. 55, p. 75-90. 2001.
42. THIBIER, M. The IETS statistics of embryo transfer in livestock in the world for the year 1999: A new record for bovine in vivo derived embryos transferred. **Embryo Transfer News**. v. 18, p. 24-29. 2000.
43. TRÍBULO, H.; BÓ, G.A.; GATTI, G.; TEGLI, J.; MORENO, M.; BRITO, M.; TRÍBULO, R. Pregnancy rates in embryo recipients treated with estradiol benzoate and CIDR-B vagina device to eliminate the need for estrus detection. **XIV Int. Congr. Anim. Reprod.** v. 2, p. 115, 2000.
44. TRÍBULO, H.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; GATTI, G.; TRIBULO, R.; CACCIA, M.; BÓ, G.A. Pregnancy rates in embryo recipients treated with progesterone vaginal devices and eCG and transferred without estrus detection. **Theriogenology** v. 57, (abstr.), 2002.
45. WARREN, W.; KREIDER, J.; GODKE, R. Plasma steroid hormone levels from donor heifers on continuous follicle stimulating hormone infusion. **Theriogenology**. v. 9 p. 104, 1978.

46. WEHRMAN, M.E.; FIKE, K.E.; MELVIN, E.J.; KOJIMA, F.N.; FINDER, J.E. Development of persistent ovarian follicle and associated elevated concentrations of estradiol preceding ovulation does not alter the pregnancy rates after embryo transfer in cattle. **Theriogenology**. v. 47, p. 1413-1421, 1997.
47. WILTBANK, J.N.; ZIMMERMAN, D.R.; INGALLS, J.E.; ROWDEN, W.W. Use of progestational compounds alone or in combination with estrogen for synchronization of estrus. **J. Anim. Sci.** v. 24, p. 990-994, 1965.
48. YAMAMOTO, M.; OOE, M.; KAWAGUCHI, M.; SUZUKI, T. Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. **Theriogenology**. v. 41, p. 747-755, 1994.
49. ZANENGA, C.A.; PEDROSO, M.S.; LIMA, G.S.; SANTOS, I.C.C. Embryo transfer without estrus observation. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**. Porto Alegre, Brasil, v. 28 (Suppl.), p. 337 (abstr.), 2000.