

SUPEROVULAÇÃO EM ZEBUÍNOS DE CORTE

Ciro Moraes Barros e ²Marcelo F. G. Nogueira

Deptos. de ¹Farmacologia (Instituto de Biociências) e ²Reprodução Animal (FMVZ) - UNESP, Botucatu, São Paulo. (cmbarros@ibb.unesp.br; marcelo@femanet.com.br)

RESUMO

Nos últimos anos o Brasil tem se destacado mundialmente pela elevado número de embriões bovinos produzidos tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Ambas as biotecnologias, transferência de embriões produzidos *in vivo* (TE) e produção *in vitro* de embriões (PIV), são ferramentas importantes para a multiplicação de fêmeas bovinas superiores. Nesta revisão será dada ênfase a protocolos hormonais que, por sincronizarem o crescimento folicular e o momento da ovulação, dispensam a observação do estro e facilitam o manejo das doadoras de embriões. Além disso, informações recentes sobre os receptores foliculares de LH serão exploradas com o objetivo de melhorar tratamentos superovulatórios que, a exemplo do protocolo P-36, utilizam uma fonte exógena de LH para induzir e sincronizar a ovulação.

INTRODUÇÃO

Devido à facilidade de adaptação ao ambiente tropical, os zebuínos (sub-espécie *Bos taurus indicus*, Meirelles et al., 1999) predominam em muitos países do hemisfério sul, contrastando com o hemisfério norte onde prevalecem as raças européias (*Bos taurus taurus*). A raça Nelore é o gado de corte predominante no Brasil (Santiago, 1985; Santos, 1995), criado principalmente em regime extensivo.

Além da inseminação artificial, a indução de ovulação múltipla (superovulação – SO) para a produção e transferência de embriões (TE) é uma das biotécnicas da reprodução mais importantes para acelerar o melhoramento genético de nosso gado zebuíno. Infelizmente, a variabilidade de resposta das doadoras de embriões ao tratamento superestimulatório com gonadotrofinas, continua a ser um dos maiores problemas nos programas comerciais de TE (Adams, 1994; Armstrong, 1993; Boland & Roche, 1993; Barros & Nogueira, 2001), apesar das diversas pesquisas realizadas nesta área (Callesen et al. 1986, 1987; Del Campo et al., 1990; Hytell et al., 1991; Stock et al., 1996; Nogueira et al., 2002).

A partir do conhecimento detalhado da dinâmica folicular (Pierson & Ginther, 1988; Savio et al., 1988; Sirois & Fortune, 1988) tornou-se possível o desenvolvimento de tratamentos hormonais capazes de regular o crescimento folicular e o momento da ovulação, de forma a viabilizar a inseminação artificial com tempo fixo (IATF, ou seja, IA com tempo pré-determinado, sem a necessidade de observação do cio) em taurinos (Twagiramungu et al., 1992a,b; Thatcher et al., 1993; Pursley et al., 1995) e zebuínos (Barros et al., 1998, 2000; Fernandes et al., 2001). De forma similar, o controle do desenvolvimento folicular e do momento da ovulação podem ser controlados farmacologicamente para melhorar os tratamentos superovulatórios empregados na transferência de embriões (Barros & Nogueira, 2001; Nogueira et al., 2002).

Nesta revisão será dada ênfase a protocolos hormonais que, por sincronizarem o crescimento folicular e o momento da ovulação, dispensam a observação do estro e facilitam o manejo das doadoras de embriões.

SUPEROVULAÇÃO

Diversos tratamentos hormonais, para induzir ovulação múltipla em bovinos têm sido estudados (Gordon, 1996; Barros & Nogueira, 2001). Entre os agentes superovulatórios testados destacam-se a gonadotrofina coriônica eqüina (eCG ou PMSG) administrada isoladamente (Rowson et al., 1972; Elsdén et al., 1976; Boland et al., 1978) ou associada a soro anti-PMSG (Dieleman et al., 1987, 1993; Alfurajji et al., 1993; Gonzalez et al., 1994) e o hormônio folículo estimulante (FSH) proveniente de extrato de pituitárias de suínos, ovinos e eqüinos (Donaldson, 1989) ou ainda, FSH recombinante bovino (Looney & Bondioli, 1988; Bellows et al., 1991; Wilson et al., 1993).

A utilização do FSH como agente indutor de superovulação tem sido extensivamente estudada, conseqüentemente, já foi testado o uso de diferentes concentrações (Pawlyshyn et al., 1986; Gonzalez et al., 1990; Saunders et al., 1990) e vias de administração (Hockley et al., 1992; Tribulo et al., 1993), a eficiência de produtos comerciais das mais variadas marcas e procedências (Donaldson, 1989; Page et al., 1989; Del Campo et al., 1990; Donaldson, 1990a; Tribulo et al., 1993; Donaldson, 1995) e as variações na relação FSH:LH entre preparados comerciais (Donaldson & Ward, 1987; Donaldson, 1990b). Nestes trabalhos ficou caracterizada a variação de potência do FSH (muito bem demonstrado por Braileanu et al., 1998) e da relação FSH:LH existente entre diferentes produtos comerciais e dentro de um mesmo produto.

Donaldson et al. (1986), Gonzalez et al. (1990) e Mapletoft et al. (1992, 1993) demonstraram os efeitos negativos de concentrações elevadas de LH na produção e na qualidade de embriões bovinos. Foi sugerido que o nível máximo de contaminação com LH, numa preparação de FSH, deveria ser entre 15 a 20%.

INÍCIO DO TRATAMENTO SUPEROVULATÓRIO

Com relação ao dia do ciclo estral (CE) mais adequado para se iniciar o tratamento superovulatório, Lindsell et al. (1986) e Goulding et al. (1990) observaram que os resultados provenientes do tratamento superovulatório iniciado no 2º dia do CE foram inferiores àqueles iniciados no 10º dia. Os autores sugeriram que o 10º dia do ciclo estral mostrou-se mais adequado para a SO, devido à ausência de um folículo dominante inibindo o crescimento de folículos subordinados.

Apesar de algumas publicações discordantes (Rajamahendran & Calder, 1993; Wilson et al., 1990), existem evidências na literatura de que a presença de um folículo dominante é prejudicial para a indução da ovulação (Adams et al., 1993; Bungartz & Niemann, 1994; Guibault et al., 1991; Huhtinen et al., 1992; Lussier et al., 1995). Foi sugerido que a presença de um folículo dominante no início do tratamento superovulatório suprime o crescimento de folículos menores não dominantes, reduzindo as taxas de ovulação e recuperação de embriões, quando comparado a tratamentos com gonadotrofinas iniciados na ausência de um folículo dominante. Entretanto, Stock et al. (1996), não demonstraram prejuízo no recrutamento de novos folículos em resposta ao tratamento com FSH exógeno na presença de um folículo dominante, mas sim, uma redução na taxa de ovulação. Estes autores sugeriram que a presença de um folículo dominante no início do tratamento superovulatório pode afetar a resposta superovulatória somente se o folículo ovular prematuramente e formar um corpo lúteo. Esse corpo lúteo recém formado seria refratário à ação luteolítica da prostaglandina injetada no protocolo de superovulação e estaria determinando níveis elevados de progesterona suficientes para inibir a ocorrência dos picos endógenos pré-ovulatórios de estradiol 17 β e de LH. Assim, nos animais com a formação atípica de um corpo lúteo proveniente da ovulação de um folículo dominante presente no início de um

tratamento superovulatório, ocorreriam falhas tanto na manifestação comportamental do cio como no pico endógeno pré-ovulatório de LH, levando a uma diminuição na taxa de ovulação e, conseqüentemente, na produção de embriões viáveis (Stock et al., 1996).

Considerando que após a manifestação de cio ocorre ovulação e início de uma nova onda folicular, vários autores propuseram que o tratamento para induzir superovulação fosse realizado no início do ciclo estral (Goulding et al., 1990; Fricke et al., 1994; Roberts et al., 1994; Stock et al., 1996). A desvantagem deste sistema é que o tratamento com gonadotrofinas deve ser realizado por um período mais prolongado (6 dias) de forma a permitir que o corpo lúteo recém formado tenha idade suficiente para responder a administração de PGF2 α .

Outra possibilidade é a aspiração do folículo dominante ou de todos os folículos acima de 5 mm de diâmetro antes de iniciar a superestimulação com gonadotrofinas (Bergfelt et al., 1994; Bodensteiner et al., 1996; Hill & Kuehner, 1996). Entretanto, este procedimento requer a utilização de aparelhos de ultra-som de custo bastante elevado.

A forma mais prática de se evitar a presença de um folículo dominante no início do tratamento superestimulatório, foi desenvolvida a partir de uma série de trabalhos publicados por R. J. Mapletoft e G. A. Bó (revisto por Bó et al., 1995, 2003). Nestes trabalhos ficou caracterizado que o uso de dispositivos intravaginais à base de progesterona (CIDR-B[®] ou DIB[®]) e a aplicação concomitante de estrógenos (estradiol 17- β ou benzoato de estradiol) promove a atresia folicular e, conseqüentemente, origina uma nova onda folicular, cerca de 4 a 5 dias após o início dos tratamentos. O tratamento superestimulatório com FSH começa justamente no início da nova onda folicular, ou seja, 4 ou 5 dias após a aplicação do dispositivo intravaginal. Dois dias após a primeira injeção de FSH, é administrada uma dose luteolítica de PGF2 α e 12 horas mais tarde o dispositivo intravaginal é removido. As doadoras são inseminadas artificialmente (IA) 12 e 24 horas após a detecção do cio. Seis a sete dias mais tarde os embriões são colhidos, classificados e congelados ou inovulados. Este protocolo apresenta duas vantagens: pode ser iniciado em qualquer dia do ciclo estral e dispensa a observação do cio base. Porém, ainda requer a detecção do estro para a inseminação artificial das doadoras.

PROTOCOLO P-36

Embora a incorporação desses novos conhecimentos tenha facilitado o manejo da doadora, a resposta superovulatória (isto é, o número de embriões viáveis colhidos) continua a apresentar resultados imprevisíveis. Em parte, esse fenômeno foi explicado pela assincronia existente entre a maturação citoplasmática e nuclear nos ovócitos de vacas sob um tratamento de SO (assincronia intrafolicular), bem como de perfis esteroidogênicos anômalos nos folículos dessas doadoras, no período pré-ovulatório, o que prejudicaria o transporte espermático e a maturação ovocitária (Hyttel et al., 1986, 1991).

Por outro lado, resultados inconstantes na resposta superovulatória (SO) foram associados com ovulações prematuras ocorrendo durante o tratamento com FSH, com a conseqüente formação precoce de um corpo lúteo secretando níveis sub-luteais de progesterona no período esperado do estro e, por fim, inibição do pico pré-ovulatório de LH e ausência de ovulações (Callesen et al., 1987; Stock et al., 1996). Além disso, uma assincronia interfolicular foi observada nos animais sob tratamento SO (Vos et al., 1994a). Nesses animais, da população de folículos que foi estimulada pelo FSH exógeno, somente 25% estavam aptos a continuar o desenvolvimento até a ovulação no momento da ocorrência do pico de LH. Esse fato foi explicado pelos diferentes

diâmetros existentes no grupo de folículos em crescimento, fazendo com que alguns poucos folículos avançados (os maiores do grupo) induzissem o pico de LH quando ainda nem todos eles (notadamente os folículos menores) estavam com a capacidade ovulatória totalmente instalada.

Baseando-se em experimentos realizados por pesquisadores holandeses (Vos et al., 1994b; Vos et al., 1995; Van de Leemput et al. 2001) e australianos (D'Occhio et al., 1997), Barros & Nogueira (2001) testaram a eficácia de protocolos, nos quais o momento esperado da ovulação era atrasado por 6 a 12 horas e a ovulação era induzida pela administração de LH ou GnRH (Barros & Nogueira, 2001; Nogueira et al., 2002). Estes protocolos não aumentaram significativamente o número de embriões viáveis, entretanto forneceram duas informações importantes: os tratamentos hormonais foram eficazes em controlar o momento da ovulação de forma a permitir a IA com tempo fixo (IATF) e a manutenção de níveis plasmáticos médios (ao redor de 1,5 a 2,5 ng/mL) de progesterona após a última aplicação de FSH poderia ser prejudicial ao desenvolvimento embrionário, se mantida durante tempo prolongado (Barros & Nogueira, 2001; Melo et al., 2004a).

A partir dos dados acima foi desenvolvido um protocolo denominado P-36 (Barros & Nogueira, 2001), no qual a fonte de progesterona (CIDR-B[®] ou DIB[®]) é mantida por até 36 horas após a aplicação de PGF2 α (daí a denominação P-36) e a ovulação é induzida com LH exógeno, administrado 12 horas mais tarde. Graças à administração exógena de LH é possível controlar o momento da ovulação, que ocorre entre 24 e 36 horas após a injeção de LH (Nogueira & Barros, 2003). Conseqüentemente, a IA é realizada em tempo fixo (IATF) 12 e 24 horas após a aplicação de LH, dispensando a detecção do cio das doadoras (veja figura a seguir).

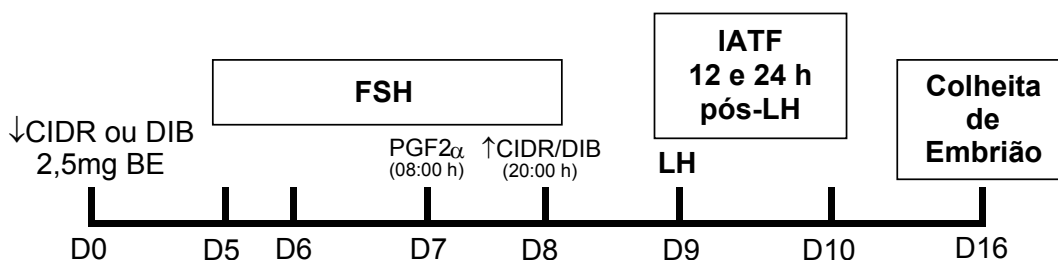


Figura 1. Protocolo superovulatório P-36. Em dia aleatório do ciclo estral (denominado dia 0 = D0) é colocada uma fonte de progesterona (no exemplo, dispositivos intravaginais contendo progesterona: CIDR-B[®] ou DIB[®]) e administrado 2,5 mg de benzoato de estradiol (Estrogin[®], via IM). Cinco dias mais tarde, no início de uma nova onda folicular, começa o tratamento superestimulatório com FSH (4 dias consecutivos, com doses decrescentes administradas duas vezes ao dia). Na manhã do dia 7 (D7, ex: 8:00 h) administra-se dose luteolítica de PGF2 α (via IM) e no dia 8 à noite (ex: 20:00 h, D8) remove-se o dispositivo intravaginal, logo após a última dose de FSH. No dia seguinte às 8:00 h (D9) é aplicado 12,5 a 25,0 mg de LH (Lutropin[®], via IM) e as doadoras são inseminadas em tempo fixo (IATF) 12 e 24 h após o LH. Os embriões são colhidos 7 a 8 dias após a aplicação do LH.

A eficácia da utilização de 25 mg vs 12,5 mg de LH no protocolo P-36 foi comparada por Nogueira & Barros (2003) em vacas da raça Nelore, utilizando duas fontes de progesterona (CIDR e DIB). Os resultados apresentados, na tabela 1, indicam que tanto faz utilizar-se CIDR ou DIB como fonte de progesterona. Além disso, a média de estruturas totais colhidas, embriões viáveis e taxa de viabilidade foram similares ($p > 0,05$) ao comparar-se metade da dose de LH (12,5 mg) com a dose integral (25 mg).

Tabela 1. Produção de embriões em vacas Nelore tratadas com o protocolo P-36, utilizando duas fontes de progesterona exógena (CIDR-B ou DIB) e duas doses de LH (25 ou 12,5 mg). Média±EPM.

	CIDR-B	DIB	
	25 mg (n=7)	25 mg (n=7)	12,5 mg (n=30)
Estruturas Totais	13,3±2,71	16,1±4,49	12,5±1,78
Embriões Viáveis	8,7±1,96	11,0±3,96	9,7±1,53
Taxa de Viabilidade	65,6%	68,1%	77,9%

Em experimento recente, Melo et al. (2004b) demonstraram que a utilização do protocolo P-36 não era prejudicial aos ovócitos de vacas doadoras de embriões. Estes autores observaram que em vacas submetidas ao protocolo P-36, nas quais os ovócitos foram aspirados logo após a retirada da fonte de progesterona (DIB) e fertilizados e cultivados *in vitro*, tanto as taxas de clivagem como de blastocisto foram semelhantes àquelas rotineiramente obtidas a partir de ovários provenientes de matadouro (grupo controle). Concluíram que o protocolo P-36 não afetou a viabilidade dos ovócitos, uma vez que os mesmos se desenvolveram até o estágio de blastocisto.

Resultados recentes confirmam a eficácia do protocolo P-36. Nogueira et al. (dados ainda não publicados, 2003-2004) obtiveram em 150 colheitas a média de 13,2 estruturas totais e 9,3 embriões viáveis, com 71,0% (1401/1973) de viabilidade, em doadoras da raça Nelore tratadas com o protocolo P-36. Além disso, alguns colegas (Zanenga et al., 2003) estão utilizando uma variação do protocolo P-36, onde o dispositivo intravaginal é retirado 24 h após a PGF2 α (sendo, portanto, denominado P-24) e o LH continua a ser administrado no dia 9 (48 h após a PGF2 α).

Em resumo, o protocolo P-36, além de facilitar acentuadamente o manejo de doadoras de embriões, por eliminar a observação do cio, resulta em taxas de embriões viáveis pelo menos tão boas quanto às obtidas após a utilização de outros tratamentos superovulatórios, que requerem a detecção do cio (Barros & Nogueira, 2001; Nogueira et al., 2002; Nogueira et al., 2003; Nogueira & Barros 2003; Nogueira & Barros, 2004).

IMPORTÂNCIA DAS ISOFORMAS DO RECEPTOR DE LH NA INDUÇÃO DA OVULAÇÃO

Os eventos decorrentes do pico pré-ovulatório de LH estão relacionados à presença de receptores para o LH (LHr) e da afinidade desta gonadotrofina pelos seus receptores. Estudos de expressão gênica do LHr em células da teca e granulosa de folículos bovinos têm demonstrado a presença de 4 isoformas de mRNA para o mesmo gene do LHr. Duas isoformas, das 4 detectadas, poderiam ser traduzidas em proteínas funcionais (receptores acoplados à proteína G) com afinidades distintas em relação aos ligantes. Uma das isoformas (completa ou "full") tem afinidade pelo LH e hCG, enquanto que a segunda isoforma (com a deleção do exon 10) preferencialmente pelo hCG (Robert et al., 2003).

Dados preliminares obtidos com células da teca e da granulosa, de folículos oriundos de fêmeas zebuínas abatidas em frigorífico, indicam que ao menos 4 isoformas do LHr estão sendo transcritas conforme dados citados na literatura (Nogueira et al., 2004).

Com base nessas informações, foi realizado um experimento (Nogueira et al., 2004) para testar a hipótese de que, em vacas superestimuladas com FSH, a administração simultânea de LH e hCG, na expectativa de estimular qualquer variedade de LHr presente, resultaria em melhora na qualidade dos ovócitos e/ou aumento nas taxas de

ovulação. Vacas Nelore foram superestimuladas com o protocolo P-36 e os embriões colhidos 7 a 8 dias após a administração do indutor da ovulação. A ovulação foi induzida apenas com LH (pLH, 12,5 mg, im, Lutropin, Grupo 1) ou com LH (12,5 mg) e hCG (1.500 UI, im, Pregnyl, Grupo 2). Ambos os grupos foram contemporâneos quanto a superestimulação e inovulação dos embriões.

Os resultados sumariados nas Tabelas 2 e 3 são indicativos de que a administração simultânea de LH e hCG, como indutores da ovulação em animais superestimulados, não altera a produção de embriões viáveis ou a taxa de viabilidade. Contudo, houve aumento na taxa de prenhez de embriões de qualidades boa, regular e pobre (2, 3 e 4, respectivamente), inovulados a fresco e oriundos de animais tratados com hCG e LH, quando comparados aos embriões obtidos de doadoras tratadas apenas com LH.

Tabela 2. Médias (\pm EPM) de estruturas totais e de embriões viáveis, e taxa de viabilidade de doadoras Nelore superestimuladas e tratadas com LH (Grupo 1) ou LH+hCG (Grupo 2).

Grupo	1 (n=8)	2 (n=14)	P ⁺
Estruturas totais	12,4 \pm 2,36	12,2 \pm 2,03	0,96
Embriões viáveis	10,0 \pm 2,38	8,9 \pm 1,66	0,71
Taxa de viabilidade	80,8%	73,1%	0,18

⁺Teste exato de Fisher.

Tabela 3. Taxa de prenhez de embriões inovulados a fresco, oriundos de doadoras Nelore superestimuladas e tratadas com LH (Grupo 1) ou LH+hCG (Grupo 2).

Grupo	1 (n=60)	2 (n=65)	P ⁺
Taxa de prenhez	41,7% (25/60)	56,9% (37/65)	0,11
Taxa de prenhez por qualidade embrionária			
Qualidade 1	67,9% (19/28)	46,7% (07/15)	0,21
Qualidade 2	25,0% (04/16)	63,3% (19/30)	0,03
Qualidade 3	20,0% (02/10)	63,6% (07/11)	0,08
Qualidade 4	0 (0/06)	44,4% (04/09)	0,10
Qualidades 1, 2 e 3	46,3% (25/54)	58,9% (33/56)	0,25
Qualidades 2, 3 e 4	18,8% (06/32)	60,0% (30/50)	0,0003

Taxa de prenhez geral = 43,6% (241/553), correspondente ao período dez/03 a mai/04; inovulações a fresco de embriões de qualidades 1, 2, 3 e 4. ⁺ Teste exato de Fisher

Apesar dos dados serem apenas preliminares, são indicativos de que as diferentes isoformas dos receptores de LH podem ter papel significativo na atividade biológica das gonadotrofinas, modulando eventos ligados à capacidade de estabelecer gestações e à qualidade embrionária, e este fato deve ser explorado para melhorar protocolos superovulatórios como o P-36.

CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA PARA TE

A concentração mínima de espermatozóides – com motilidade total pós-descongelamento – presentes numa palheta de sêmen (6 a 10×10^6) foi determinada tendo em mente a fertilização de uma fêmea durante o ciclo estral normal. Entretanto, a superestimulação de doadoras de embriões resulta na disponibilidade de maior número de ovócitos (cerca de 10 a 20) para a fertilização, do que em uma simples IA (1 ovócito).

Considerando que a quantidade e a qualidade do sêmen podem afetar a taxa de concepção após a inseminação artificial, e que a concentração de espermatozóides com movimento total, pós-descongelamento, varia de acordo com a partida de sêmen e com o reprodutor utilizado, Nogueira & Barros (2004) verificaram se, por meio do ajuste da concentração final de espermatozóides, seria possível utilizar palhetas com baixa concentração espermática e, ainda assim, obter taxas de embriões viáveis semelhantes àquelas resultantes da utilização de palhetas com alta concentração. Neste experimento, todos os animais foram tratados com o protocolo P-36. Uma amostra de cada partida de sêmen foi analisada pelo método CASA (Computer-Assisted Semen Analysis) e a concentração final de espermatozóides, com motilidade total pós-descongelamento, foi ajustada para um mínimo de 25×10^6 , que corresponde a, aproximadamente, 3 a 4 vezes a concentração mínima de espermatozóides usada na IA de um animal não superovulado. A IATF foi realizada 12 , 24 e, quando aplicável, 36 h após a administração de LH. O número de palhetas de sêmen necessário para atingir a concentração desejada variou entre 2 e 6 (Grupos 2 , 3 , 4 , 5 e 6). O número de IATFs foi ajustado para o número total de palhetas utilizadas, isto é, 2 palhetas (IATF 12 e 24 h pós LH), e 3 ou mais palhetas (12 , 24 e 36 h pós LH). Os resultados obtidos estão sumariados na tabela 4.

Tabela 4. Média de estruturas totais e embriões viáveis obtidas por colheita, e taxa de viabilidade em vacas Nelore tratadas com o protocolo P-36 e inseminadas (IATF) com 2 a 6 palhetas de sêmen (Grupos 2 , 3 , 4 , 5 e 6 , respectivamente).

Nº de colheitas	Grupo	Estruturas totais	Embriões viáveis	Taxa de viabilidade (%)
19	2	12,2	8,9	73,6
104	3	13,5	9,6	70,9
22	4	13,3	9,4	70,9
04	5	5,5	4,0	72,7
01	6	24,0	13,0	54,2
27	4 a 6	12,5	8,7	69,8

Quando os resultados dos grupos 4 , 5 e 6 foram reunidos, a média de estruturas totais, de embriões viáveis obtidos e a taxa de viabilidade foram de: $12,5$; $8,7$ e $69,8\%$ ($n=27$; Tabela 4). Estes resultados foram similares aos obtidos nos grupos 2 e 3 ($P=0,61$). Além disso, não houve diferença significativa ao comparar-se os resultados dos grupos 2 a 6 ($P=0,17$). Portanto, apesar da utilização de palhetas de sêmen com baixa concentração de espermatozóides, foi possível, mediante o ajuste da concentração final de espermatozóides, obter taxas de viabilidade e de embriões viáveis semelhantes àquelas observadas quando utilizou-se sêmen com alta concentração espermática.

Estes resultados são indicativos de que o fato de uma partida de sêmen ter sido aprovada para inseminação artificial, não a qualifica automaticamente para um programa de TE, onde a concentração espermática necessária para a fertilização de

vários ovócitos deve ser maior do que a utilizada para apenas um ovócito. Conseqüentemente, num programa de TE, deve-se ajustar o número de palhetas a serem utilizadas de acordo com a concentração espermática de cada partida de sêmen.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Com a evolução constante das pesquisas relacionadas à fisiologia e farmacologia dos ruminantes, propiciando o entendimento dos eventos moleculares que regulam a função reprodutiva, novos tratamentos serão desenvolvidos para aumentar a eficiência e facilitar, cada vez mais, a utilização de técnicas como a inseminação artificial, transferência de embriões e produção *in vitro* de embriões.

AGRADECIMENTOS

Somos gratos aos Srs. Renato Eugênio de Rezende Barbosa e Paulo Fragnito (Agropecuária Campanário) por disponibilizarem o uso de animais em vários experimentos, ao Dr. José Buratini Jr. (Depto. Fisiologia, IBB-UNESP) pela colaboração na realização do experimento sobre as isoformas dos receptores de LH nos folículos ovarianos bovinos, aos Laboratórios AFRSA S.R.L. (Argentina; Tecnopec representante no Brasil) e InterAg (Nova Zelândia) pela fornecimento dos dispositivos intravaginais DIB e CIDR, respectivamente; a FAPESP pelo auxílio financeiro para realização de diversos experimentos e bolsas concedidas ao Médico Veterinário Marcelo F.G. Nogueira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams GP, Kot K, Smith CA, Ginther OJ. Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. *Can J Anim Sci* 1993;73:267-275.
- Adams GP. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation. *Theriogenology* 1994;41:19-24.
- Alfurajji MM, Atkinson T, Broadbent PJ, Hutchinson JSM. Superovulation in cattle using PMSG followed by PMSG-monoclonal antibodies. *Anim Reprod Sci* 1993;33:99-109.
- Armstrong DT. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology* 1993;39:7-24.
- Barros CM, Moreira MBP, Fernandes P. Manipulação farmacológica do ciclo estral para melhorar programas de inseminação artificial ou de transferência de embriões. *Arq. Fac. Vet. UFRGS* 1998;26(Suppl):179-89.
- Barros CM, Nogueira MFG, Andreussi PAT. Superovulation and fixed time artificial insemination. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS* 2000;28(Suppl 1):52-64.
- Barros CM, Nogueira MFG. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 2001;56:1483-1496.
- Bellows RA, Staigmiller RB, Wilson JM, Phelps DA, Darling A. Use of bovine FSH for superovulation and embryo production in beef heifers. *Theriogenology* 1991;35:1069-82.
- Bergfelt DR, Lightfoot KC, Adams GP. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology* 1994;42:895-907.
- Bó GA, Adams GP, Caccia M, Martinez M, Pierson RA, Mapletoft RJ. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 1995;39:193-204.
- Bó GA, Baruselli PS, Martinez MF. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim. Reprod. Sc.* 2003;78:307-326.

- Bodensteiner KJ, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ. Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. *Theriogenology* 1996;45:1115-28.
- Boland MP, Crosby TF, Gordon I. Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG. *Theriogenology* 1978;10:175.
- Boland MP, Roche JF. Embryo production: alternative methods. *Mol Reprod Dev* 1993;36:266-270.
- Braileanu GT, Albanese C, Card C, Chedrese PJ. FSH bioactivity in commercial preparations of gonadotropins. *Theriogenology* 1998;49:1031-37.
- Bungartz I, Niemann H. Assessment of the presence of dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J Reprod Fertil* 1994;101:583-591.
- Callesen H, Greve T, Hyttel P. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology* 1986;25:71-86.
- Callesen H, Greve T, Hyttel P. Premature ovulations in superovulated cattle. *Theriogenology* 1987;28:155-166.
- Del Campo MR, Becerra F, Gonzalez M, Murphy BD, Mapletoft RJ. Superovulation with three different commercial pituitary extracts in the cow. *Theriogenology* 1990;33:208.
- Dieleman SJ, Bevers MM, Gielen JTH. Increase of the number of ovulations in PMSG/PG-treated cows by administration of monoclonal anti-PMSG shortly after the endogenous LH peak. *Theriogenology* 1987;27:222.
- Dieleman SJ, Bevers MM, Vos PLAM, de Loos FAM. PMSG/anti-PMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment. *Theriogenology* 1993;39:25-41.
- D'Occhio MJ, Sudha G, Jilella D, White T, Maclellan LJ, Walsh J, Trigg TE, 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* 1997;47:601-13.
- Donaldson LE, Ward DN, Glenn SD. Use of porcine follicle stimulating hormone after chromatographic purification in superovulation of cattle. *Theriogenology* 1986;25:747-57.
- Donaldson LE, Ward DN. LH effects on superovulation and fertilization rates. *Theriogenology* 1987;27:225.
- Donaldson LE. Porcine, equine and ovine FSH in the superovulation of cattle. *Theriogenology* 1989;31:183.
- Donaldson LE. Embryo production by SUPER-OV and FSH-P. *Theriogenology* 1990a;33:214.
- Donaldson LE. FSH-P bath variation. *Theriogenology* 1990b;33:215.
- Donaldson LE. A comparison of FSH products. In: INTERNATIONAL WORKSHOPS OF EMBRYO TRANSFER, BIOTECHNOLOGY AND ADVANCED TECHNOLOGIES, 1, 1995, Montevideo. Anais... Montevideo: Universidad de la Republica, 1995;1:1-8.
- Elsden RP, Hasler JF, Seidel GEJr. Non-surgical recovery of bovine eggs. *Theriogenology* 1976;6:523.
- Fernandes P, Teixeira AB, Crocci AJ, Barros CM. Timed artificial insemination in beef cattle using GnRH agonist, PGF 2α and estradiol benzoate (EB). *Theriogenology* 2001;55:1521-32.
- Fricke PM, Kirsch JD, Reynolds LP, Redmer DA. Studies of FSH-P induced follicular growth in cows. *Theriogenology* 1994;42:43-53.
- Gonzalez A, Lussier JG, Carruthers TD, Murphy BD, Mapletoft RJ. Superovulation of beef heifers with Follitropin-V: A new FSH preparation containing reduced LH activity. *Theriogenology* 1990;33:519.
- Gonzalez A, Wang H, Carruthers TD, Murphy BD, Mapletoft RJ. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: effect of dose and antipregnant mare serum gonadotrophin serum. *Can. Vet. J.* 1994;35:158-62.
- Gordon I. Controlled reproduction in cattle & buffaloes. Cambridge: CAB Internacional, 1996. 492p.
- Goulding D, Williams DH, Duffy P, Boland MP, Roche JF. Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day 10 of the estrous cycle. *Theriogenology* 1990;34:767-78.
- Guibault LA, Grasso F, Lussier JG, Roullier P, Matton P. Decreased superovulatory response in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *J Reprod Fertil* 1991;91:89.

- Hill BR, Kuehner LF. Follicle aspiration prior to superovulation in cattle: a field study. *Theriogenology* 1996;43:324.
- Hockley DK, Bó GA, Palasz AT, del Campo MR, Mapletoft RJ. Superovulation with a single subcutaneous injection of Folltropin in the cow: effect of dose and site of injection. *Theriogenology* 1992;37:224.
- Huhtinen M, Rainio V, Aalto J, Bredbacka P, Mäki-tanila A. Increased ovarian response in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. *Theriogenology* 1992;37:457-463.
- Hyttel P, Callesen H, Greve T. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. *J. Reprod. Fertil.* 1986;76:645-56.
- Hyttel P, Callesen H, Greve T, Schmidt M. Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. *Theriogenology* 1991;35:91-108.
- Lindsell CE, Murphy BD, Mapletoft RJ. Superovulation and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology* 1986;26:209-19.
- Looney CR, Bondioli KR. Bovine FSH produced by recombinant DNA technology. *Theriogenology* 1988;29:235.
- Lussier JP, Lamothe P, Pacholek X. Effects of follicular dominance and different gonadotrophin preparations on the superovulatory response in cows. *Theriogenology* 1995;43:270.
- Mapletoft RJ, Pierson RA. Factors affecting superovulation in the cow: practical considerations. *Embryo Transfer Newsl.* 1993;11:15-24.
- Mapletoft RJ, Nasser LF, Bó GA, del Campo MR. The effect of LH content in a porcine pituitary extract on superovulatory response to a single subcutaneous injection in beef heifers. In: *International Congress on Animal Reproduction*, 12, 1992, De Hague. *Anais... De Hague: ICAR*, 1992:237-9.
- Meirelles FV, Rosa AJM, Lôbo BR. Is the American Zebu really *Bos indicus*? *Genetics and Molecular Biology* 1999;22:543-47.
- Melo DS, Ferreira MMG, Monteiro FM, Nogueira MFG, Trinca LA, Barros CM. Manutenção de níveis sub-luteais de progesterona, após tratamento superestimulatório, pode diminuir a taxa de recuperação de embriões. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2004a (abstract in press).
- Melo DS, Ferreira MMG, Monteiro FM, Nogueira MFG, Potiens JR, Barros CM. Protocolo P-36 não é deletério para oócitos de vacas Nelore (*Bos indicus*) doadoras de embriões. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2004b (abstract in press).
- Nogueira MFG, Barros BJP, Teixeira AB, Trinca LA, D'Occhio MJ, Barros CM. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in superstimulated beef cows. *Theriogenology* 2002;57:1625-34.
- Nogueira MFG, Barros CM. Timing of ovulation in Nelore cows superstimulated with P36 protocol. *Revista Acta Scientiae Veterinariae* 2003;31(sup.):509.
- Nogueira MFG, Porto LPC, Barros CM. Dose-response trial in *Bos taurus* vs *Bos indicus* cows superstimulated with FSH, associated with controlled LH surge and fixed-time artificial insemination. *Revista Acta Scientiae Veterinariae* 2003;31(sup.):511.
- Nogueira MFG, Barros CM. Adjusting sperm concentration used to inseminate superstimulated Nelore cows, in order to avoid decline in embryo production. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2004 (abstract in press).
- Nogueira MFG, Buratini Jr J, Barros CM. Embryo production and pregnancy rate in superstimulated nelore donors treated with hCG and LH to induce ovulation. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2004 (abstract in press).
- Page RD, Jordan JE, Johnson SK. Superovulation of Holstein heifers under heat stress with FSH-P or Folltropin. *Theriogenology* 1989;31:236.
- Pawlyshyn V, Lindsell CE, Braithwaite M, Mapletoft RJ. Superovulation of beef cows with FSH-P: A dose-response trial. *Theriogenology* 1986;25:179.
- Pierson RA, Ginther OJ. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology* 1988;29:21-37.
- Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cattle using GnRH and PGF 2α . *Theriogenology* 1995;44:915-23.

- Rajamahendran R, Calder MD. Superovulatory responses in dairy cows following ovulation of the dominant follicle of the first wave. *Theriogenology* 1993;40:99-109.
- Robert C, Gagné D, Lussier JG, Bousquet D, Barnes FL, Sirard M-A. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. *Reproduction* 2003;125:437-46.
- Roberts AJ, Grizzle JM, Echternkamp SE. Follicular development and superovulation response in cows administered multiple FSH injections early in the estrous cycle. *Theriogenology* 1994;42:917-29.
- Rowson LEA, Lawson RAS, Moor RM, Baker AA. Egg transfer in the cow: synchronization requirements. *J. Reprod. Fertil.* 1972;28:427-31.
- Santiago AA. O Zebu na Índia, no Brasil e no mundo. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1985:706.
- Santos R. Nelore: a vitória brasileira. Uberaba: Agropecuária Tropical, 1995:391.
- Saunders J, Wilmott N, Palasz A, Mapletoft RJ. Dose titration of Follitropin in the cow. *Theriogenology* 1990;33:319.
- Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil.* 1988;83:663-71.
- Sirois J, Fortune JE. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.* 1988;39:308-17.
- Stock AE, Ellington JE, Fortune JE. A dominant follicle does not affect follicular recruitment by superovulatory doses of FSH in cattle but can inhibit ovulation. *Theriogenology* 1996;45:1091-1102.
- Thatcher WW, Drost M, Savio JD, MacMillan KL, Entwistle KW, Schmitt EJ, de la Sota RL, Morris GR. New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 1993;33:27-49.
- Tribulo H, Jofre F, Carcedo J, Alonso A, Tribulo R, Bó GA. Superovulation in *Bos indicus* cattle with a single subcutaneous injection of commercial pituitary extracts. *Theriogenology* 1993;39:331.
- Twagiramungu H, Guibault LA, Proulx J, Villeuve P, Dufour JJ. Synchronization of estrus and fertility in beef cattle with two injections of buserelin and prostaglandin. *Theriogenology* 1992a;38:1131-44.
- Twagiramungu H, Guibault LA, Proulx J, Villeuve P, Dufour JJ. Influence of an agonist of Gonadotropin-Releasing Hormone (Buserelin) on estrus synchronization and fertility in beef cows. *J. Anim. Sci.* 1992b;70:1904-10.
- Van de Leemput EE, Vos PLAM, Hyttel P, Van den Hurk R, Bevers MM, Van der Weijden GC, Dieleman SJ. Effects of brief postponement of the preovulatory LH surge on ovulation rates and embryo formation in eCG/prostaglandin-treated heifers. *Theriogenology* 2001;55:573-92.
- Vos PLAM, Van der Schans A, de Wit AAC, Willemse AH, Bevers MM, Dieleman SJ. Effect of neutralization of pregnant mares' serum gonadotrophin (PMSG) shortly before or at the preovulatory LH surge in PMSG-superovulated heifers on follicular function and development. *J. Reprod. Fertil.* 1994a;100:387-93.
- Vos PLAM, Bevers MM, Willemse AH, Dieleman SJ. Effects of suppression by a progesterone-releasing device and subsequent induction by GnRH of the preovulatory LH surge on follicular function in PMSG/PG-treated heifers. *J. Reprod. Fertil.* 1994b;101:43-9.
- Vos PLAM, Bevers MM, Willemse AH, Dieleman SJ. Does postponement of preovulatory LH surge affect ovulation rate and embryo yield in superovulated holstein heifers? *Theriogenology* 1995;43:344.
- Wilson JM, Jones AL, Miller DR. Influence of a dominant follicle on the superovulatory response. *Theriogenology* 1990;33:349.
- Wilson JM, Jones AL, Moore K, Looney CR, Bondioli KR. Superovulation of cattle with a recombinant-DNA bovine follicle stimulating hormone. *Anim. Reprod. Sci.* 1993;33:71-82.
- Zanenga CA, Pedrosa MF, Lima GF, Marques MO, Santos ICC, Valentim R, Baruselli PS. Comparação entre dois protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*). *Acta Scientiae Veterinariae* 2003;31:626-27.