

# Produção de embriões em vacas zebuínas após superovulação com duas formulações comerciais de gonadotrofina\*

## Embryo production in zebu cows after superovulation with two commercial formulations of gonadotropin

Bruno Campos de Carvalho,\*\* Fabiana Cristina Varago,\*\*\* José Reinaldo Mendes Ruas,\*\*\*\* Marcos Wilson Vargas,\*\*\*\*\* Gustavo Bervian dos Santos,\*\*\*\*\* Adriano Maximiano da Silva\*\*\*\*\*

### Resumo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de embriões em protocolos de superovulação de fêmeas zebuínas das raças Gir, Nelore e meio sangue Gir x Nelore utilizando duas diferentes formulações comerciais de gonadotrofinas. Foram utilizadas 27 vacas, divididas em dois protocolos de superovulação: T1) 133mg Folltropin® (4 animais de cada grupo), e T2) 250UI de Pluset® (5 animais de cada grupo). Sete dias após o cio a resposta de cada doadora foi avaliada por ultrassonografia e os embriões foram coletados. Foram avaliados o número de corpos lúteos, de folículos anovulatórios, de estruturas recuperadas e o número de embriões viáveis. As variáveis foram submetidas à análise de variância, considerando-se os efeitos de raça e gonadotrofina e sua interação. As análises foram realizadas no programa estatístico SAS, v.9.2 ( $P < 0,05$ ). No presente estudo não foi detectada influência do grupo em nenhuma das variáveis avaliadas. O número de corpos lúteos foi maior nos animais tratados com Pluset -  $21,46 \pm 10,58$  quando comparado ao Folltropin -  $11,90 \pm 7,26$ , assim como o número de estruturas recuperadas que foi  $13,77 \pm 6,88$  no Pluset e de  $6,70 \pm 6,11$  nas doadoras tratadas com Folltropin, no entanto, o número de embriões viáveis não diferiu entre as duas bases comerciais de FSH. Novos estudos objetivando determinar a equivalência de FSH entre as duas formulações comerciais do hormônio devem ser realizados, o que permitirá adequar as concentrações dessa gonadotrofina e minimizar as variações nos protocolos de superovulação.

*Palavras-chave:* superovulação, embrião, Gir, Nelore.

### Abstract

The present work aimed to evaluate the superovulatory response in Zebu cows of Gir breed, Nelore breed and crossbreed Nelore x Gir, using two different commercial formulations of gonadotropins. Twenty seven cows were used, distributed in two superovulation protocols: T1) Folltropin® 133mg (4 animals of each genetic group), and T2) 250UI Pluset® (5 animals of each genetic group). Seven days after estrus, the embryo donors response was evaluated by ultrasound and embryos were collected. It was evaluated the number of corpus luteum, anovulatory follicles, recovered structures and the number of viable embryos. The variables were submitted to ANOVA, considering the effects of breed and gonadotropin and their interaction. Analyses were performed in statistic program SAS, v.9.2 ( $P < 0,05$ ). In the present study was not detected influence of genetic group on the variables analyzed The number of corpus luteum was higher in animals treated with Pluset -  $21.46 \pm 10.58$  compared to Folltropin -  $11.90 \pm 7.26$ , as well as the recovered structures number that was  $13.77 \pm 6.88$  for Pluset and  $6.70 \pm 6.11$  in Folltropin treated donors. The number of anovulatory follicles and viable embryos did not differ between two commercial formulations of FSH. Additional studies with the aim to determine the FSH equivalence between the two commercial formulations of the hormone must be performed, which will adjust the concentrations of this gonadotropin and minimize variations in superovulation protocols.

*Keywords:* superovulation, gonadotropin, Gir, Nelore.

\*Recebido em 5 de junho de 2013 e aceito em 23 de agosto de 2013.

\*\*Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora –MG. Autor para correspondência: [bruno.carvalho@embrapa.br](mailto:bruno.carvalho@embrapa.br).

\*\*\*Universidade José do Rosário Vellano – Unifenas – Alfenas / MG.

\*\*\*\*EPAMIG – Janaúba – MG.

\*\*\*\*\*Universidade José do Rosário Vellano – Unifenas – Alfenas – MG.

\*\*\*\*\*Universidade Federal Fluminense – UFF – Niterói/ – RJ.

\*\*\*\*\*Universidade José do Rosário Vellano /Unifenas – Alfenas – MG.

## Introdução

A superovulação (SOV) associada à transferência de embriões (TE) é uma biotecnologia da reprodução que geralmente utiliza gonadotrofinas à base de FSH (hormônio folículo estimulante) para estimular o desenvolvimento de um maior número de folículos para ovulação (Mapletoft et al., 2002). Através desta prática, os folículos que sofreriam atresia por privação de FSH podem continuar seu desenvolvimento, pois estes adquirem características fisiológicas parecidas com as do folículo dominante (FD). Portanto, o tratamento de SOV tem como objetivo a neutralização dos efeitos da dominância folicular, minimizando a atresia dos demais folículos recrutados (Santiago et al., 2002).

No entanto, existem variações na resposta a superovulação relacionadas à dose e pureza da gonadotrofina utilizada, duração do tratamento, sensibilidade individual, idade dos animais, estresse térmico, manejo nutricional e sanitário, fase do ciclo estral da doadora, época do ano e também da constituição genética da fêmea submetida ao protocolo (Santiago et al., 2002; Baruselli et al., 2006, Alves et al., 2009; Barros et al., 2012). De fato, a variabilidade na resposta das doadoras ao tratamento superovulatório com gonadotrofinas é um dos maiores problemas nos programas comerciais de TE (Mapletoft et al., 2002; Baruselli et al., 2006), o que faz com que muitos estudos sejam conduzidos para avaliação dessas diferentes fontes de variação.

Peixoto et al. (2006), avaliando resultados de 1294 superovulações de vacas zebuínas, encontrou diferenças relacionadas a idade da doadora, mês e ordem da superovulação quanto a número de corpos lúteos, estruturas recuperadas e embriões viáveis. Contrariamente, Alves et al. (2009), trabalhando com doadoras da raça holandes não encontrou diferenças na recuperação de embriões viáveis entre o inverno e o verão, o que também foi reportado por Dourado et al., (2012), que superovulando doadoras da raça Gir, não encontrarão diferença quanto a número de embriões viáveis nos protocolos realizados no verão e no inverno.

Ao compararem 300, 400 ou 500 UI de Pluset para superovular doadoras da raça Gir leiteiro, Prado et al. (2007) reportaram maior índice de recuperação de embriões viáveis quando 400 UI da gonadotrofina foi utilizada. Quando a raça estudada foi a Nelore e testando as mesmas doses de 300, 400 ou 500 UI, os animais tratados com 300 UI de gonadotrofina apresentaram uma melhor resposta em comparação com os demais grupos (Visintin et al., 1999). Segundo Figueiredo et al. (1995), fêmeas da raça Nelore possuem ovários, folículos e corpos lúteos menores que vacas de outras raças, o que poderia em parte explicar a necessidade de menores doses de FSH para a indução da superovulação.

Uma vez que o que muitos fatores estão relacionados a variabilidade da técnica, o melhor desempenho dos protocolos de superovulação em bovinos requer o conhecimento profundo da fisiologia reprodutiva. É conhecido que animais de raças zebuínas são mais sensíveis à estimulação exógena pelas gonadotrofinas em comparação com os das raças taurinas (Visintin et al., 1999). No entanto, pouco se sabe sobre diferenças quanto à sensibilidade a gonadotrofinas em animais dentro das raças zebuínas. Além disso, não foram encontrados resultados de literatura que comparem em um mesmo estudo, o efeito de diferentes gonadotrofinas para superovular animais de diferentes raças zebuínas. Portanto, o objetivo do presente

estudo foi avaliar a produção de embriões após protocolo de superovulação com duas diferentes formulações comerciais de gonadotrofinas em animais das raças Gir, Nelore e o cruzamento dessas duas raças.

## Material e métodos

O experimento foi realizado nos meses de dezembro de 2009 e junho de 2010, na fazenda experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), localizada no município de Felixlândia – MG. Vinte sete doadoras zebuínas pluríparas, não lactantes, de segunda e terceira ordem de parto, em atividade cíclica, selecionadas por exame ginecológico com auxílio de ultrassom de 7,5 MHz (HONDA HS1500 – Japão) e pelo escore da condição corporal ( $\geq 3$  - escala de 1 a 5), manejadas em pastagens de braquiária (*Brachiaria decumbens* e *B. brizantha*) com sal mineral *ad libitum* foram divididas em dois tratamentos:

**T1** – Vacas superestimuladas com 133mg de Folltropin® (Bioniche Animal Health – Canadá), sendo quatro doadoras Nelore, quatro Gir e quatro mestiças Gir X Nelore.

**T2** – Vacas superestimuladas com 250 UI de Pluset® (Hertape Calier - Espanha), sendo cinco doadoras Nelore, cinco Gir e cinco mestiças Gir X Nelore.

A mesma dose de cada formulação comercial acima foi mantida para os três grupos de animais e para todos os protocolos a mesma partida de Pluset® e a mesma de Folltropin® foram utilizadas. O protocolo baseou-se na implantação de dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®, Pfizer Nova Zelândia) associado à administração de 1mg de benzoato de estradiol (D0). Quatro dias após a implantação do dispositivo iniciou-se a superestimulação ovariana, com 8 doses decrescentes de gonadotrofina (20%, 20%, 15%, 15%, 10%, 10%, 5%, 5%) em intervalo de 12 horas. No D6, foram administrados 500 mcg de cloprostenol sódico (Ciosin®, Schering-Plough, Brasil), junto com a sexta dose de gonadotrofina. O dispositivo intravaginal de progesterona foi retirado no momento da aplicação da sétima dose de gonadotrofina.

As vacas foram inseminadas 12, 24 e 36 horas após o início do estro detectado por rufiões. As doadoras que não foram observadas em estro foram inseminadas em tempo fixo 48, 60 e 72 horas após a última aplicação de FSH. Foi utilizado sêmen convencional de três touros da raça Holandês de fertilidade conhecida, os quais foram equitativamente distribuídos entre os tratamentos.

A resposta superestimulatória foi mensurada com auxílio de ultrassonografia através da contagem do número de corpos lúteos presentes nos ovários sete dias após o cio ou inseminação. A resposta ao tratamento hormonal foi considerada positiva quando mais de dois corpos lúteos foram verificados por animal. Após a avaliação da resposta, foi realizada a coleta dos embriões pela lavagem do corpo do útero com solução de DPBS e cateter de Folley nº. 18 (Rusch® – Alemanha). O lavado foi recuperado em filtro coletor (WTA – São Paulo, Brasil) com malha de náilon de 75 micra e o conteúdo rastreado e as estruturas classificadas com auxílio de estereomicroscópio em aumento de 40 X. Os embriões foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento em mórula, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido, blastocisto eclodido ou não fecundados, e quanto à qualidade embrionária em grau

1 - excelente ou bom, grau 2 - regular, grau 3 - pobre e o grau 4 morto ou degenerado de acordo com a sociedade internacional de tecnologia de embriões (IETS).

As variáveis número de corpos lúteos, número de folículos anovulatórios, número total de estruturas recuperadas e número de embriões viáveis após verificação de normalidade pelo teste de Lilliefors foram submetidas à análise de variância, considerando-se os efeitos de raça e gonadotrofina e sua interação, sendo as médias comparadas pelo teste SNK. As análises foram realizadas no programa estatístico SAS, v.9.2 ( $P < 0,05$ ).

## Resultados e discussão

Do total de 27 vacas, 23 responderam ao estímulo hormonal, o que representa uma resposta positiva de 85,18%. Uma vaca da raça Gir e uma da raça Nelore nas quais foram administradas 250UI de Pluset, e duas mestiças Gir x Nelore nas quais foram utilizadas 133mg de Folltropin não responderam ao tratamento superovulatório. Os dados encontrados estão muito próximos aos relatados por Borges et al. (2001) que trabalhando com vacas Holandês-Zebu encontrou 11,5% de ausência de resposta. De acordo com Hahn (1992), até 30% dos animais submetidos ao protocolo superovulatório podem não responder ao tratamento hormonal, reflexo da grande variação individual existente na técnica (Woolliams et al., 1995). Uma vez que os animais foram previamente selecionados, e apenas animais com bom histórico reprodutivo, bom escore corporal e em atividade cíclica foram utilizados, acredita-se que essa ausência de resposta seja uma característica intrínseca dos animais e possivelmente uma dose maior de gonadotrofina, em especial nos animais Gir x Nelore que receberam 133 mg de Folltropin poderia resultar na resposta desejada, porém esse efeito não foi testado no presente estudo.

Os resultados obtidos com relação ao número de corpos lúteos, número de folículos anovulatórios, quantidade de estruturas recuperadas e embriões viáveis em função do grupo genético e formulação comercial de gonadotrofina encontram-se descritos na tabela 1.

Ao avaliar apenas a raça das doadoras, as vacas da raça Nelore apresentaram na média maior número de corpos lúteos ( $24,63 \pm 12,96$ ) em comparação a animais da raça Gir ( $11,25 \pm 6,27$ ). No entanto, essa diferença não foi constatada nos animais mestiços Gir x Nelore com ( $15,86 \pm 4,95$ ), que não diferiram nem das doadoras Nelore nem das Gir. Esses achados possivelmente estejam relacionados à maior sensibilidade da raça Nelore a gonadotrofinas exógenas (Visintin et al., 1999) em comparação as outras doadoras avaliadas. Segundo Figueiredo et al. (1995), fêmeas da raça Nelore possuem ovários, folículos e corpos lúteos menores que vacas de outras raças, que por consequência demandam menores quantidades de gonadotrofinas para crescimento folicular e ovulação. Isso permite concluir que animais da raça Nelore têm necessidade de menores doses de FSH para a indução da superovulação, o que explicaria a maior resposta desses animais no presente estudo.

Avaliando-se a resposta dos animais com base nas duas diferentes gonadotrofinas, o Pluset apresentou maior resposta ( $21,46 \pm 10,58$ ) em relação à média geral do número de corpos lúteos quando comparado ao Folltropin ( $11,90 \pm 7,26$ ). O mesmo ocorreu quando analisada a média geral de estruturas

recuperadas nos três grupos, que foi de  $13,77 \pm 6,88$  no Pluset e de  $6,70 \pm 6,11$  no Folltropin. Apesar disso, dentro de cada grupo: Nelore, Gir e Gir x Nelore, não foram detectadas diferenças entre a utilização de Pluset ou Folltropin em nenhuma das respostas avaliadas.

No entanto, o melhor desempenho do Pluset não foi constatado quando as duas gonadotrofinas foram analisadas quanto ao número de embriões viáveis, que são aqueles aptos à transferência ou ao congelamento, sendo que neste parâmetro as duas gonadotrofinas apresentaram resultados semelhantes, tanto dentro de cada grupo (Nelore, Gir, Gir x Nelore) quanto para a média entre os três grupos. Assim sendo, apesar de o Pluset estimular uma maior resposta ovariana, o número de embriões viáveis recuperados foi semelhante ao do Folltropin. Resultados semelhantes foram descritos por Loss e Malschitzky (2006) que trabalhando com doadoras da raça Brahman também não encontraram diferença entre o Pluset (290 UI) e o Folltropin (150 mg) quanto ao número de embriões viáveis.

Inúmeros estudos testando a dose de FSH nos protocolos de superovulação já foram realizados inclusive em zebuínos (Saunders et al., 1990; Zanenga et al., 2003; Prado et al., 2007; Alvarez et al., 2010). A dose de Pluset utilizada no presente experimento segue a especificação do fabricante que recomenda dose de 500UI do hormônio para vacas adultas taurinas e 50% dessa dose para vacas zebuínas. Já na bula do Folltropin, a dose recomendada em programas de superovulação para vacas zebuínas é de 100 a 160mg. Portanto a dose de 133mg de Folltropin utilizada no presente experimento encontra-se dentro do prescrito pelo fabricante do hormônio. Para as doadoras zebuínas, em especial as da raça Nelore, as doses de FSH utilizadas, apesar de recomendadas pelos fabricantes, parecem ter sido elevadas e produziram uma resposta indesejada, pois mesmo apresentando elevado número de corpos lúteos ( $34,25 \pm 5,85$  – Pluset e  $15,00 \pm 10,52$  - Folltropin), o número de embriões viáveis ( $2,25 \pm 2,06$  – Pluset e  $3,50 \pm 3,32$  - Folltropin) ficou abaixo do considerado ideal. De acordo com Peixoto et al. (2006), uma boa taxa de recuperação estaria entre 4.1 a 7.3 embriões viáveis por coleta, que está próximo ao número de embriões recuperados nos animais da raça Gir e do cruzamento Gir x Nelore.

Segundo Cabodevila e Torquati (2001), as altas doses de gonadotrofinas podem causar efeitos negativos relacionados com a estimulação ovariana exagerada. Nestes casos de excessiva estimulação, geralmente se obtém uma menor taxa de recuperação (ócitos e embriões em função dos corpos lúteos palpados ou visualizados ao ultrassom), ou uma maior taxa de recuperação de embriões degenerados e estruturas não fecundadas, o que corrobora com a hipótese de que no presente estudo a dose de FSH utilizada nas doadoras Nelore pode ter sido excessiva, uma vez que muitas estruturas não classificadas como embriões viáveis foram recuperadas nesse grupo. Quando existe resposta exagerada, sugere-se a redução da dose ou troca do hormônio utilizado (Visintin et al., 1999), porém doses reduzidas de gonadotrofina não foram avaliadas nos animais da raça Nelore.

Além da variação individual, a pureza do hormônio é outro fator importante na resposta superovulatória. De acordo com Braileanu et al. (1998), a potência do FSH está associada à relação de FSH:LH no produto final e melhores repostas à superovulação foram obtidas em preparações com baixa concentração de LH (Callesen et al., 1986; Foote e Ellington,

**Tabela 1:** Número de corpos lúteos, folículos anovulatórios, estruturas recuperadas e embriões viáveis de vacas zebuínas superestimuladas com duas gonadotrofinas (Pluset e Folltropin)

Variável	Hormônio	Raça			Média
		Gir x Nelore	Nelore	Gir	
Número de corpos lúteos	Pluset	16,80±5,72	34,25 ± 5,85	14,50± 7,14	21,46±10,58 <sup>***</sup>
	Folltropin	13,50± 0,71	15,00± 10,52	8,00± 3,56	11,90± 7,26 <sup>b</sup>
	<b>Média</b>	<b>15,86±4,95<sup>AB*</sup></b>	<b>24,63±12,96<sup>A</sup></b>	<b>11,25±6,27<sup>B</sup></b>	<b>17,30± 10,30</b>
Número de folículos anovulatórios	Pluset	2,00 ± 1,22	3,00 ± 1,41	2,00 ± 1,83	2,31 ± 1,44
	Folltropin	2,50 ± 0,71	2,00 ± 0,82	0,75 ± 0,96	1,60 ± 1,07
	<b>Média</b>	<b>2,14 ± 1,07</b>	<b>2,50 ± 1,20</b>	<b>1,38 ± 1,51</b>	<b>2,00 ± 1,31</b>
Estruturas recuperadas	Pluset	15,40± 5,00	17,75±6,80	7,75 ± 6,02	13,77± 6,88 <sup>***</sup>
	Folltropin	8,00 ± 4,24	4,00 ± 3,37	8,75 ± 8,85	6,70 ± 6,11 <sup>b</sup>
	<b>Média</b>	<b>13,29± 5,71</b>	<b>10,88±8,87</b>	<b>8,25 ± 7,03</b>	<b>10,70± 7,34</b>
Embriões viáveis	Pluset	6,20 ± 4,71	2,25 ± 2,06	6,25 ± 4,03	5,00 ± 4,02
	Folltropin	4,00 ± 4,24	3,50 ± 3,32	6,25 ± 9,46	4,70 ± 6,11
	<b>Média</b>	<b>5,57 ± 4,35</b>	<b>2,88 ± 2,64</b>	<b>6,25 ± 6,73</b>	<b>4,87 ± 4,91</b>

\*A, B Médias, na mesma linha, seguidas de letras distintas, diferem pelo teste SNK (P<0,05)

\*\*\*a,b Médias, na mesma coluna, seguidas de letras distintas, diferem pelo teste F (P<0,05)

Os resultados expressam a média ± desvio padrão das respostas avaliadas.

1988). O Pluset apresenta uma relação FSH e LH próxima de 1:1, enquanto o Folltropin apresenta baixa concentração de LH, com uma relação FSH:LH de 5,25:1 (Kelly et al., 1997). As altas concentrações de LH podem causar ovulação prematura ou luteinização dos folículos sem ovulação. Por esta razão acredita-se que o maior número de corpos lúteos encontrados nos animais tratados com Pluset, seria decorrente de luteinizações prematuras e não necessariamente resultante de um maior número de ovulações. Sendo assim a maior quantidade LH, poderia em parte, explicar a baixa recuperação de embriões

viáveis em relação ao número de corpos lúteos reportados nas doadoras do grupo Pluset.

Uma vez que no presente estudo não foram encontradas diferenças entre a utilização de Pluset ou Folltropin na produção de embriões nos diferentes grupos de doadoras zebuínas avaliados, um próximo passo seria a determinação da equivalência de FSH entre essas duas formulações comerciais, de forma que a dose efetiva de cada hormônio para cada raça seja determinada e a variação entre protocolos utilizados na rotina comercial possa ser minimizada.

## Agradecimentos

À Fapemig pelo apoio (CVZ-APQ 02341-09).

## Referências

ALVES, B.R.C.; RUAS, J.R.M.; AMARAL, T.F. et al. Desempenho de novilhas Holandês na produção de embriões F1 Holandês-Zebu, em condições tropicais. *Rev. Bras. Cien. Vet.*, v. 16, p. 22-26, 2009.

ALVAREZ, R.H.; MARTINEZ, A.C.; PIRES, R.M. Superovulatory response of zebu cows treated with pFSH in a single subcutaneous injection followed by an additional intramuscular sub-dose 48 h later. *Reprod Domest Anim*, v. 45, n. 3, p. 421-424, 2010.

BARROS, C.M.; SATRAPA, R.A.; CASTILHO, A.C. et al. Effect of superstimulatory treatments on the expression of genes related to ovulatory capacity, oocyte competence and embryo development in cattle. *Reprod Fertil Dev.*, v. 25, n.1, p.17-25, 2012.

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

BRAILEANU, G.T.; ALBANESE, C.; CARD, C. et al. FSH bioactivity in commercial preparations of gonadotropins. *Theriogenology*, v. 49, p.1031-1037, 1998.

BORGES, A.M.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M.; et al. Resposta Superovulatória de Novilhas Mestiças Holandês-Zebu Tratadas com Somatotropina Bovina Recombinante (rbST). *Rev. bras. zootec.*, v. 30, p. 1439-1444, 2001.

CABODEVILA, J.; TORQUATRI, S. Superovulação de Fêmeas bovinas. In: PALMA, G.A. (ed) *Biotecnología de la reproducción*: INTA, Argentina, 2001. p. 79-108.

CALLESEN, H.; GREVE, T.; HYTTEL, P. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology*, v. 25, p.71-86, 1986.

DOURADO, A.P.; TORRES FILLHO, R.A.; CARDOSO, E.C.; et al. Produção estacional de embriões in vivo em vacas da raça Gir (*Bos indicus*) na região sudeste (clima tropical), Brasil. *Rev. Bras. Cien. Vet.*, v. 19, n. 3, p.183-189, 2012.

FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; ROCHA, G.P.; et al. Prevalência de duas ondas de crescimento folicular ovariano em vacas da raça Nelore. *Rev. Bras. Reprod.Anim.*, v. 19, n. 3-4, p.153-235, 1995.

FOOTE, R.H.; ELLINGTON, J.E. Is a superovulated oocyte normal? *Theriogenology*, v. 29, p.111-123, 1988.

- HAHN, J. Attempts to explain and reduce variability of superovulation. *Theriogenology*, v. 38, p. 269-265, 1992.
- KELLY, P.; DUFFY, P.; ROCHE, J.F.; BOLAND, M. P. Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Anim Reprod Science*, v. 46, p.1-14, 1997.
- LOSS, A.P.R.; MALSCHITZKY, E. Resposta à superovulação e produção de embriões em vacas Brahman utilizando dois produtos comerciais no Sul do Brasil. *Veterinária em Foco*, v. 3, p.147-158, 2006.
- MAPLETOFT, R.J.; STEWARD, K.B.; ADAMS, G.P. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.*, v. 42, p. 601-611, 2002.
- PEIXOTO, M.G.C.D.; BERGMAN, J.A.G.; FONSECA, C.G. et al. Effects of environmental factors on multiple ovulation of zebu donors. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 58, n. 4, p.567-574, 2006.
- PRADO, F. R. A.; TONIOLLO, G. H.; OLIVEIRA, J. A. Superestimulação ovariana em vacas da raça Gir Leiteiro com o uso de diferentes concentrações de FSH. *ARS Veterinariae*, v. 23, p.172-177, 2007.
- SANTIAGO, L. L. et al. Folículo dominante e resposta superovulatória em novilhas da raça Nelore. *Ver. Zootec.* v. 31, n. 1, p. 363-368. 2002.
- SAS Institute Inc. *SAS/STAT® User's guide: Statistics, Version 9.2*. Cary, SAS Institute, 2008.
- SAUNDERS, J.; WILMOTT, N.; PALASZ, A.; et al. Dose titration of Folltropin in the cow. *Theriogenology*, v.33, p.319, 1990.
- VISINTIN, J.A.; ARRUDA, R.P.; MADUREIRA, E.H. et al. Superovulação de novilhas da raça Nelore com diferentes doses de FSH/LH e congelamento de embriões pelo método one-step com etilenoglicol. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* [online], v. 36, n. 5, 1999.
- ZANENGA, C.A.; PEDROSA, M.F.; LIMA, G.F.; et al. Comparação entre dois protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*). *Acta Sci Vet*, v. 31, p. 626-627, 2003.
- WOOLLIAMS, J.A.; LUO, Z.W.; VILLANUEVA, B. et al. Analysis of factors affecting superovulatory response in ruminants. *J. Agric. Sci.*, v.124, p. 61-70, 1995.