

Comparação de diferentes técnicas de sincronização da emergência da onda folicular visando a superovulação em bovinos

Comparative technics of follicular wave emergence synchronization in the cattle superovulation

Rodrigo de Oliveira Fischdick,* Carlos Fernando Marins Rodrigues,** Tânia Góes de Pinho,***
Felipe Zandonadi Brandão,*** Amanda dos Santos Cavalcanti,* Mariana Côrtes Boité,* Luiz Altamiro Nogueira***

Resumo

Foram avaliadas quatro técnicas de sincronização da onda folicular em protocolos de superovulação. Para tal, foram utilizadas 112 vacas doadoras, das raças Simental, Limousin e Red Angus, com escore corporal médio de 3,0. Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais de acordo com o método de sincronização da emergência da onda folicular. Foram realizadas 30 superovulações em cada grupo, considerando os seguintes protocolos: G1 - grupo controle – animais superovulados entre o 8º e o 12º dia do ciclo estral (dia zero = estro); GII – animais que sofreram punção folicular no 9º dia (dia 0 = estro) e início do tratamento superovulatório no 11º dia; GIII – animais que sofreram punção folicular em fase não conhecida do ciclo estral, associada ao uso de um dispositivo intravaginal contendo progesterona (P4) e tratamento superovulatório iniciado 48h após a punção, GIV – animais que utilizaram implante intravaginal de progesterona colocado em fase aleatória do ciclo estral, mantido por nove dias, associado à administração de 50 mg de P4 e de 2mg de benzoato de estradiol, sendo o tratamento superovulatório iniciado cinco dias após a colocação do dispositivo e GV – animais que receberam implante intravaginal de P4 colocado em fase aleatória do ciclo estral e mantido por oito dias, associado à administração de 50mg de P4 e 2mg de 17 α -estradiol, sendo o tratamento superovulatório iniciado quatro dias após a colocação do dispositivo. Nos grupos I, II, III, IV e V o total de estruturas coletadas e de embriões viáveis foram, respectivamente (13,53 \pm 9,23 vs 13,87 \pm 7,85 vs 18,70 \pm 10,88 vs 9,03 \pm 4,97 vs 13,60 \pm 8,39) e (8,43 \pm 5,68 vs 8,27 \pm 7,06 vs 10,47 \pm 8,19 vs 5,37 \pm 2,92 vs 7,23 \pm 5,30). Os resultados observados no GIII foram superiores ao G1, GII, GIV e GV (P< 0,05), respectivamente. Os grupos I, II e IV não apresentaram diferenças entre si (P> 0,05), enquanto o desempenho de GIV foi inferior (P<0,05). Os resultados permitem concluir que é possível sincronizar a emergência da onda folicular de vacas doadoras, com início da superovulação em qualquer momento do ciclo estral, e que o tratamento progestágeno associado à punção folicular oferece os melhores resultados.

Palavras-chave: bovinos, sincronização, onda folicular, superovulação.

Abstract

We evaluated four different techniques of follicular wave synchronization by comparing total number of structures recovery, number of viable and degenerated embryos, number of oocytes recovery and cost of uterine flushing. One hundred twelve Simental, Limousin and Red Angus donators were randomly allocated in five treatment groups according to protocol used for follicular wave emergence synchronization. Thirty superovulations were performed in each group, the programs were: G1- Control, superovulation treatment between days 8 and 12 of the estrous cycle; G2- follicle aspiration on day 9 of the estrous cycle; G3- follicle aspiration plus intravaginal progesterone implant; G4- intravaginal progesterone implant plus estradiol benzoate and G5- intravaginal progesterone implant plus estradiol-17 α . Artificial insemination was performed twice, 12 and 24 hours after detection of behavioral estrus. Embryo collection was performed on day 7 after inseminations. Total number of recovered structures (18,70 \pm 10,88 vs 13,53 \pm 9,23) and viable embryos (10,47 \pm 8,19 vs 8,43 \pm 5,68) were higher (P< 0,05) in G3 than in G1, respectively. No differences (P>0,05) were detected amongst groups 2, 5 and 1, while performance of G4 was the lowest (P<0,05). Results demonstrate to be possible synchronize follicular wave emergence by initiating superstimulation at any time of the estrous cycle. Additionally we verified that the program using progesterone associated to follicular ablation had the best results in synchronizing follicular wave emergence aiming superstimulation in cattle.

Keywords: cows, synchronization, follicular wave, superstimulation.

* Alunos do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Clínica e Reprodução Animal) da UFF.

** Gertec Embriões, SP.

*** Professores da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, lagm@vm.uff.br.

Introdução

Embora a transferência de embriões (TE) seja uma técnica amplamente empregada em todo o mundo, com mais de 500 mil embriões transferidos por ano, a variabilidade da resposta ao tratamento superovulatório ainda é uma importante limitação (Bó et al., 2002) e é um dos maiores problemas nos programas comerciais de TE (Barros et al., 2006). Apesar disso, novos protocolos oferecem a conveniência de estar disponíveis para iniciar o tratamento rapidamente e com o tempo predeterminado, sem a necessidade de detecção do estro ou prejuízo à resposta, melhorando as perspectivas da TE (Mapletoft et al., 2002a).

O protocolo tradicional de superovulação, iniciado no meio do ciclo estral (8-12 dias após o estro), é concomitante à emergência da segunda onda folicular, em vacas que exibem duas ou três ondas (Ginther et al., 1989). Segundo Nasser et al. (1993), uma melhor resposta superovulatória é alcançada quando o tratamento é iniciado no dia da emergência da onda folicular. Assim, a possibilidade de induzir a emergência da onda folicular permitiria iniciar a superovulação a qualquer momento, eliminando a necessidade da detecção do estro, ou mesmo a espera de 8 a 12 dias para se iniciar o tratamento (Bó et al., 2002). Além disso, existem evidências na literatura de que a presença de um folículo dominante é prejudicial aos tratamentos de indução da superovulação. (Guibault, et al., 1991; Huhtinin et al., 1992; Bungartz; Niemann, 1994; Lussier et al., 1995). Acredita-se que a presença de um folículo dominante no início do tratamento superovulatório suprima o crescimento de folículos menores através da inibição da resposta ao FSH exógeno (Reichenbach et al., 2002), reduzindo as taxas de ovulação e recuperação de embriões, quando comparados a tratamentos com gonadotrofinas iniciados na ausência de um folículo dominante.

Assim, a fim de melhorar a resposta superovulatória, sincronização da emergência da onda folicular em bovinos pode ser realizada tanto por tratamentos hormonais como pela punção física do folículo dominante (Baracaldo et al., 2000).

A aspiração do folículo dominante ou de todos os folículos acima de 5mm de diâmetro antes de iniciar a superestimulação com gonadotrofinas foi descrita por diversos autores (Bergfelt et al., 1994; Bodensteiner et al., 1996). Baracaldo et al. (2000) verificaram, em um estudo recente, que a punção dos dois maiores folículos foi tão eficaz em sincronizar a emergência da onda folicular para a superestimulação, quanto a punção de todos os folículos e" 5mm, eliminando a necessidade de puncionar tantos folículos. Sendo assim, a punção folicular guiada por ultrassom pode ser utilizada dentro de um esquema convencional, para eliminar os efeitos de um folículo dominante, antes de iniciar um tratamento com gonadotrofinas. Entretanto, este procedimento requer a utilização de aparelho de ultrassonografia, de custo bastante elevado (Barros et al., 2006).

Uma das estratégias mais promissoras para sincronizar a emergência da onda folicular é a utilização de tratamentos hormonais. Bó e seus colaboradores publicaram uma série de trabalhos (Bó et al., 1993a; Bó et al., 1993b; Bó et al., 1995a; Bó et al., 1995b; Bó et al., 1996a; Bó et al., 1996b), em que testaram a eficácia da associação de estrógenos

(estradiol- 17 β , valerato de estradiol e benzoato de estradiol) com progestágenos (progesterona- CIDR e norgestomet – SMB). Nos protocolos sugeridos o progestágeno é mantido por seis a sete dias, e o estrógeno administrado via intramuscular no mesmo dia ou um dia após a colocação do implante auricular ou do dispositivo intravaginal. Os referidos autores verificaram que o estrógeno, quando associado a um progestágeno, induzia o crescimento sincronizado de uma nova onda folicular, cerca de quatro a cinco dias após a sua injeção. Assim, o tratamento superovulatório pode ser realizado a partir do início de uma nova onda, ou seja, 4 a 5 dias após a administração do estrógeno. Estes tratamentos resultam em um número de embriões transferíveis similar ou superior aos tratamentos superovulatórios tradicionais, realizados entre os dias oito e 12 do ciclo estral (Bó et al., 1993, Bó et al., 1996b).

Após a administração de estradiol e progesterona, as concentrações circulantes de FSH e a amplitude e frequência dos pulsos de LH diminuem, resultando na regressão de folículos dependentes de gonadotrofinas (Adams et al., 1993a; Adams et al., 1993b). Conforme as concentrações plasmáticas de estradiol começam a diminuir, ocorre um aumento nas concentrações plasmáticas de FSH e então a emergência de uma nova onda folicular um dia depois, aproximadamente (Adams et al., 1993a).

Segundo Bó et al. (1995b), uma dose de 5mg de estradiol-17 β , em combinação com progestágenos, foi efetiva para induzir a atresia do folículo dominante, presente no momento da aplicação, e permitir a emergência de uma nova onda folicular entre quatro e cinco dias.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade de diferentes protocolos de sincronização de ondas foliculares para o início do tratamento superovulatório em vacas.

Material e métodos

Foram utilizadas 112 vacas doadoras de 4 a 12 anos, das raças Simental, Limousin e Red Angus, apresentando escore corporal médio de 3,0, numa escala de 1 a 5 (Houghton, et al., 1990) oriundas de cinco fazendas localizadas no estado de São Paulo.

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais, cada um composto por 30 tratamentos superovulatórios, considerando os seguintes protocolos de sincronização de emergência da onda folicular, descritos na Tabela 1.

As doadoras, de todos os grupos experimentais, após exame clínico completo e observação de pelo menos dois ciclos estrais normais, foram submetidas a tratamento superovulatório com hormônio gonadotrófico (Pluset®, Laboratório Calier do Brasil, São Paulo, Brasil). Para tanto, utilizou 400 UI de hormônio gonadotrófico dividido em oito doses decrescentes, aplicadas duas vezes ao dia, por via intramuscular, com intervalos de 12 horas a cada aplicação. Ao final do terceiro dia do tratamento superovulatório, aplicaram-se duas doses de 500 μ g de análogo de prostaglandina F2 α , (d-clorplorstenol - Prolise®, ARSA S.R.L., Buenos Aires, Argentina), via IM, intervaladas em 12 horas (de noite e pela manhã) para a indução do estro. O implante intravaginal nos grupos III, IV e V foi retirado ao final do tratamento superovulatório.

Tabela 1: Protocolos de sincronização da emergência da onda folicular utilizados em cada grupo experimental

Grupos	Descrição
GI	Controle. Início da superovulação entre o 8 ^o e o 12 ^o dia do ciclo (dia zero = estro).
GII	Punção folicular, guiada por ultrassonografia de todos os folículos de diâmetro ≥ 5 mm, no 9 ^o dia do ciclo (dia zero = estro) e superovulação iniciando-se no dia 11.
GIII	Punção folicular, guiada por ultrassonografia de todos os folículos de diâmetro ≥ 5 mm, em fase aleatória do ciclo estral, associada a implantação de um dispositivo intravaginal contendo progesterona (CIDR-B [®] , Eazy-Breed, Boehringer-Ingelheim, Argentina) e tratamento superovulatório iniciado 48 horas após da punção folicular.
GIV	Implante intravaginal de progesterona (CIDR [®] Pfizer Saúde Animal, São Paulo, Brasil) administrado em fase aleatória do ciclo estral e mantido por nove dias, associado à administração de 50 mg de progesterona (Sigma Alderich, Oakville, ON, Canadá) e de 2mg de benzoato de estradiol (Gonadiol [®] , Schering-Plough, São Paulo, Brasil) via IM. Tratamento superovulatório iniciado cinco dias após a administração do implante.
GV	Implante intravaginal de progesterona (CIDR [®] Pfizer Saúde Animal, São Paulo, Brasil) administrado em fase aleatória do ciclo estral, mantido por oito dias, associado à administração de 50mg de progesterona (Sigma Alderich, Oakville, ON, Canadá) e 2mg de 17 β -estradiol (Sigma Alderich, Oakville, ON, Canadá), via IM. Tratamento superovulatório, iniciado quatro dias após a administração do implante.

Cada doadora foi inseminada artificialmente (IA) duas vezes, sendo a primeira realizada 12 horas após a manifestação do estro, e a segunda 12 horas após a primeira.

No sétimo dia após o estro, os embriões foram coletados não cirurgicamente, por meio de lavagem uterina com solução de PBS modificada por Whittingham (1971). O conteúdo uterino foi filtrado, em filtro para embriões, colocados em placa de Petri descartáveis e observado ao microscópio estereoscópico, a fim de se identificar e selecionar os embriões.

Após a identificação, os embriões foram colocados em PBS enriquecido com 20% de soro fetal bovino, avaliados quanto ao estágio de desenvolvimento (Lindner; Whight, 1983) e qualidade (Kennedy et al., 1983).

O número de estruturas coletadas, embriões viáveis, embriões degenerados e estruturas não fertilizadas foi submetido à análise de variância, sendo as diferenças testadas através dos testes de comparação de médias de *Student-Newman-Kuels* (SNK), sendo processadas pelo SAS.

Resultados e discussão

Os resultados obtidos quanto ao número total de estruturas coletadas em cada lavado uterino, bem como o número de embriões viáveis e degenerados e o número de estruturas não fecundadas em cada grupo são apresentados na Tabela 2.

Nos animais do GI, no início da superovulação possivelmente ocorreu a atresia natural do folículo dominante pela presença de um corpo lúteo ativo, produtor de progesterona nesse momento do ciclo. Assim, o início do tratamento entre os dias 8 e 12 do ciclo coincidiu com a emergência da segunda onda folicular, permitindo o recrutamento de folículos do "pool" de reserva e o desenvolvimento de vários deles (Mapletoft et al., 2002a), possibilitando uma adequada resposta ao tratamento superovulatório. Nesse trabalho, a punção do folículo dominante, tanto de forma mecânica (GII e GIII) como farmacológica (GIV e GV) seguida pela administração de FSH, mostrou-se eficiente em sincronizar a emergência da onda folicular, e permitir o recrutamento de vários folículos, como pode ser observado nos resultados relatados na Tabela 1.

O GIII apresentou maior ($P < 0,05$) número de estruturas coletadas, assim como de embriões viáveis ($18,7 \pm 10,88$ e $10,47 \pm 8,19$, respectivamente), em relação aos demais grupos. Este resultado é superior ao observado por Baracaldo et al. (2000) que obtiveram $8,4 \pm 1,3$ embriões viáveis após punção de todos os folículos ≥ 5 mm, associada ao CIDR seguido do tratamento superovulatório.

Os resultados obtidos por Bó et al. (1996b) comparando o tratamento tradicional com a punção folicular associada a um progestágeno, não apresentaram diferença quanto ao número de estruturas coletadas; entretanto, os animais submetidos a punção folicular associado ao progestágeno produziram mais estruturas fertilizadas e embriões viáveis. Nesse trabalho, a punção associada ao progestágeno (GIII) apresentou média superior ($P < 0,05$), ao tratamento tradicional (GI), no total de estruturas coletadas ($18,7 \pm 10,88$ vs $13,53 \pm 9,23$), embriões viáveis ($10,47 \pm 8,19$ vs $8,43 \pm 5,68$) e ao número de estruturas não fecundadas ($5,73 \pm 5,03$ vs $1,40 \pm 1,67$). Provavelmente o número de estruturas não fecundadas foi maior devido ao fato da média total de estruturas coletadas ter sido superior, o que demandou em mais fecundações e, consequentemente, mais falhas.

Tabela 2: Respostas de doadoras submetidas a diferentes protocolos de sincronização da emergência da onda folicular para o início do protocolo de superovulação (média \pm desvio-padrão)

Grupos	n*	Estruturas coletadas	Embriões viáveis	Embriões degenerados	Estruturas não fecundadas
I	30	$13,03 \pm 9,23^b$	$8,43 \pm 5,68^b$	$3,20 \pm 5,71^a$	$1,40 \pm 1,67^b$
II	30	$13,87 \pm 7,85^b$	$8,27 \pm 7,06^b$	$1,63 \pm 2,09^a$	$3,97 \pm 4,57^b$
III	30	$18,70 \pm 10,88^a$	$10,47 \pm 8,19^a$	$2,50 \pm 2,94^a$	$5,73 \pm 5,03^a$
IV	30	$9,11 \pm 4,97^c$	$5,37 \pm 2,92^c$	$2,57 \pm 3,82^a$	$1,17 \pm 1,84^c$
V	30	$13,60 \pm 8,39^b$	$7,23 \pm 5,30^b$	$2,87 \pm 3,62^a$	$3,50 \pm 5,43^b$

*o valor de n refere-se número de coletas realizadas em cada tratamento.

a,b,c Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si (SNK - $P < 0,05$).

Para realização do protocolo proposto no GIII há necessidade da utilização de um aparelho de ultrassom, consequentemente de um técnico treinado, além do custo do implante de progesterona. Entretanto, os resultados obtidos por vários autores (Bó et al., 1996b; Baracaldo et al., 2000; Buratini et al., 2000; Kim et al., 2001) reforçam a eficiência desse método na sincronização da onda folicular. A vantagem da punção é permitir o início do tratamento superovulatório 48 horas após a punção mecânica do folículo dominante, ao passo que, nos protocolos que utilizam hormônios para induzir a atresia folicular, a superovulação é iniciada, em média quatro dias após o início do tratamento. Esta vantagem foi citada por Thatcher et al. (2001) e constitui hoje a base de muitos protocolos de TE, por sua praticidade e aplicabilidade a campo.

O GII apresentou resultados semelhantes aos do GI e ao do GV, entretanto inferiores que ao GIII, que apenas diferenciou do GII, pela utilização de fonte exógena de progesterona. Desta forma, observa-se que a utilização de progesterona, após a sincronização da onda pela punção folicular, possivelmente contribui para a obtenção de melhores resultados.

Os resultados obtidos pelos GI, GII e GV não diferiram ($P > 0,05$). Desta forma, a sincronização farmacológica da onda folicular, utilizando como fonte de estradiol o 17β -estradiol, pode se apresentar como opção para iniciar um programa de superovulação, sem depender do estro base ou da necessidade da utilização do aparelho de ultrassom para a realização da punção.

O GIV apresentou resultados inferiores àqueles observados nos outros grupos ($P < 0,05$). Tal fato pode ter sido causado pela maior meia-vida e efeito mais duradouro do benzoato de estradiol. Entretanto, nos protocolos de sincronização de estro, quando não há superovulação, este é o hormônio mais utilizado (Barros et al., 1998; Bridges et al., 1999; Barbuio et al., 1999; Barufi et al., 1999; López-Gatius, 2001) e com resultados satisfatórios.

O número de embriões viáveis obtido neste protocolo (GIV) foi semelhante ao obtido por Baracaldo et al. (2000), entretanto, foi inferior ao resultado de Andrade et al. (2002) - $5,37 \pm 2,92$ vs $6,5 \pm 0,9$ vs $9,9 \pm 7,0$. Entretanto, Andrade et al. (2002) trabalharam com vacas doadoras da raça Nelore. Neste trabalho os autores compararam o protocolo tradicional ao tratamento com implante de progesterona (CIDR) associado ao benzoato de estradiol. Estes, diferentemente ao encontrado neste estudo, não observaram diferença ($P > 0,05$) no número de embriões viáveis ($8,3 \pm 7,4$ e $9,9 \pm 7,0$, respectivamente). Os autores sugeriram que o benzoato de estradiol pode ter sido mais eficiente nos zebuínos, o que teria determinado os resultados discordantes aos deste estudo. Figueiredo et al. (1997) citam que existem diferenças entre a fisiologia reprodutiva do *Bos taurus taurus* e do *Bos taurus indicus*. Além disso, a dosagem utilizada nesse estudo pode não ter sido adequada, uma vez que Bó et al. (1993a) relatam que a melhor dosagem deste hormônio para sincronizar a onda folicular é a de 2,5mg.

Referências

ADAMS G.P., KOT, K.; SMITH, C.A.; GINTHER, O.J. Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. *Animal Reproduction Science*, v. 30, p. 259-271, 1993a.

Ao se comparar os resultados obtidos no GIV e GV, observa-se que o número de embriões viáveis foi superior ($P < 0,05$ - $7,23 \pm 5,30$ vs $5,37 \pm 2,92$, respectivamente) quando da utilização do 17β -estradiol como agente sincronizador de onda. O 17β -estradiol foi, possivelmente, mais eficiente em provocar a atresia do folículo dominante com posterior sincronização da onda de crescimento folicular. Esta diferença pode ser explicada pela farmacocinética desse hormônio. Diferentes preparações de estradiol suprimem a liberação de FSH em intervalos variados. Estrógenos esterificados (benzoato de estradiol, valerato de estradiol e cipionato de estradiol) são absorvidos muito lentamente após a injeção intramuscular, e quanto maior a cadeia ester, menor a solubilidade, e maior é o intervalo para o estradiol ser absorvido (Mapletoft et al., 2002b). Já foi demonstrado que as concentrações plasmáticas máximas de estradiol ocorre dentro de duas horas após a administração de 5mg de 17β -estradiol, seguido de um retorno a concentrações basais após 36 horas (Bó et al., 2000; Martinez et al., 2003); enquanto a administração de 5mg de valerato ou benzoato de estradiol resulta em concentração máxima em 12 a 24 horas após, retornando a níveis basais em 96 horas aproximadamente (Martinez et al., 2003). Assim, a maior demora em se obter concentrações máximas de estradiol circulante proporcionado pelo benzoato de estradiol, pode ter sido o fator responsável pelo menor desempenho, não permitindo assim uma sincronização homogênea da onda de crescimento folicular.

O custo dos protocolos envolvendo progestágenos associados ou não a estrógenos é maior que o tratamento hormonal tradicional (GI), considerando-se apenas os fármacos utilizados. Entretanto, o maior custo é compensado pelo fato de se reunir um número maior de doadoras em um programa de superovulação, já que não há a necessidade em se preocupar com o estro base, facilitando desta forma o manejo. Devido ao alto valor de mercado que embriões coletados alcançam o fato de se conseguir um embrião a mais por coleta, pode ser economicamente interessante, tornando assim compensatórios os gastos com fármacos, para melhorar a resposta à superovulação.

Conclusão

Os resultados sugerem que é possível sincronizar a emergência da onda folicular de vacas doadoras, com início da superovulação em qualquer momento do ciclo estral, sendo que os melhores resultados são obtidos quando da realização da punção de todos os folículos com diâmetro maior ou igual a 5mm, associado ao uso de um implante de progesterona. Na ausência da punção folicular, protocolos hormonais associando progesterona com 17β -estradiol se mostrou tão eficiente quanto aos protocolos tradicionais de superovulação, sendo que o 17β -estradiol se mostrou mais eficiente em sincronizar a onda de crescimento folicular que o benzoato de estradiol.

ADAMS G.P., KOT, K.; SMITH, C.A.; GINTHER, O.J. Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 73, p. 267-275, 1993b.

- ANDRADE, J.C.O.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F.; SANTOS FILHO, A.S. Use of steroid hormone treatments prior to superovulation in Nelore donors. *Theriogenology*, v. 57, p. 759, 2002.
- BARACALDO MI, MARTINEZ M, ADAMS GP, MAPLETOFT RJ. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology*, v. 53, p. 1239-1250, 2000.
- BARBUJO, J.P.; MARQUES, A.; MADUREIRA, E.H.; BARUSELLI, P.S.; ARRUDA, R.P.; MIZUTA, K. Sincronização da ovulação por benzoato de estradiol ou GnRH após o tratamento com MAG/PG/17 β ESTRADIOL + progesterona em novilhas Nelore. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 23, p. 312-313, 1999.
- BARROS, C.M.; MOREIRA, M.B.P.; FERNANDES, P. Pharmacological manipulation of the estrous cycle to improve artificial insemination or embryo transfer programs. *Arquivo Faculdade de Veterinária UFRGS*, Porto Alegre, v. 26, n. 1, p. 179-198, 1998.
- BARROS, C.M.; BARCELOS, A.N.Z.; NOGUEIRA, F.G. 2006 Superovulação com inseminação artificial em tempo fixo In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2., Londrina. *Anais...* São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, 2006.
- BARUFI, F.B.; MADUREIRA, E.H.; MARQUES, A.; CARVALHO, N.A.T.; CELEGHINI, E.C.C.; BARUSELLI, P.S.; RODRIGUES, P.H.M. Avaliação do uso de Crestar OU CIDR-B+benzoato de estradiol, seguidos ou não pela aplicação de gonadotrofina coriônica equina (eCG), no desempenho reprodutivo de vacas de corte com bezerro ao pé. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 23, n. 3, p. 332-333, 1999.
- BERGFELT, D.R.; PLATA-MADRID, H.; GINTHER, O.J. Counteraction of inhibitory effect of follicular fluid by administration of FSH in heifers. *Canadian Journal of Animal Science*; v. 74, p. 633-639, 1994.
- BÓ, G.A.; NASSER, L.F.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Effects of estradiol valerat on ovarian follicles emergence of follicular waves and circulating gonadotropin in heifers. *Theriogenology*, v. 40, p. 225-239, 1993.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; TRÍBULO, H.E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R.J. Follicular wave dynamics after estradiol 17 β treatment of heifers with or without a progestagen implant. *Theriogenology*, v. 41, p. 1555-1569, 1993.
- BÓ, G.A.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. The effect of estradiol valerat on follicular dynamics and superovulatory response in cows with Synchro-Mate B implants. *Theriogenology*, v. 43, p. 31-40, 1995a.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*, v. 43, p. 31-40, 1995b.
- BÓ GA, ADAMS GP, PIERSON RA, MAPLETOFT RJ. Effect of progestagen plus estradiol 17 β treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology*, v. 45, p. 897-910, 1996a.
- BÓ, G.A.; BERGFELT, D.R.; MAPLETOFT, R.J. Follicle wave dynamics and superovulation in cattle: recent advances and practical experience. *Arquivo Faculdade de Veterinária UFRGS*, Porto Alegre, v. 24, p. 31-52, 1996b. (Supl.)
- BÓ, G.A.; BERGFELT, D.R.; BROGLIATTI, G.M.; PIERSON, R.A.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J. Local versus systemic effect of exogenous estradiol-17 β on follicular dynamics in heifers with progestogen implants. *Animal Reproduction Science*, v. 59, p. 141-57, 2000.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRÍBULO, R.; MAPLETOFT, R.J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, v. 57, p. 53-72, 2002.
- BODENSTEINER, K.J.; KOT, K.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. *Theriogenology*, v. 45, p. 1115-1128, 1996.
- BRIDGES, P.J.; LEWIS, P.E.; WAGNER, W.R.; INSKEEP, E.K. Follicular growth, estrus and pregnancy after fixed-time insemination in beef cows treated with intravaginal progesterone inserts and estradiol benzoate. *Theriogenology*, v. 52, p. 573-583, 1999.
- BUNGARTZ, I.; NIEMANN, H. Assessment of the presence of dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 101, p. 583-591, 1994.
- BURATINI, C.; PRICE, C.A.; VISINTIN, J.A.; BO, G.A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology*, v. 54, p. 421-431, 2000.
- FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L.; SOLER, J.M.P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*, v. 47, p. 1489-1505, 1997.
- GINTHER, O.J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 87, p. 223-230, 1989.
- GUIBALT, L.A.; GRASSO, F.; LUSSIER, J.G.; ROULLIER, P.; MATTON, P. Decreased superovulatory response in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 91, p. 89, 1991.
- HUHTININ, M.; RAINIO, V.; ALATO, J.; BREDBACKA, P.; MAKITANILA, A. Increased ovarian response in the absence of a dominant follicle in the superovulated cows. *Theriogenology*, v. 37, p. 457-463, 1992.
- KENNEDY, L.G.; BOLAND, M.P.; GORDON, I. The effect of embryos quality at freezing on subsequent development of th thawed cow embryos. *Theriogenology*, v. 19, n. 6, p. 823-832, 1983.
- KIM, H.I.; SON, D.S.; YEON, H.; CHOI, S.H.; PARK, S.B.; RYU, I.S.; SUH, G.H.; LEE, D.W.; LEE, C.S.; LEE, H.J.; YOON, J.T. Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. *Theriogenology*, v. 55, p. 937-945, 2001.
- LINDNER, G.M.; WRIGHT, R.W. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, v. 20, p. 407-416, 1983.
- LOPEZ-GATIUS; F. Short synchronization system for estrus cycles in dairy heifers a preliminary report. *Theriogenology*, v. 54, p. 1185-1190, 2001.
- LUSSIER, J.G.; LAMOTHER, P.; PACHOLEK, X. Effects of follicular dominance and different gonadotropin preparations on the superovulatory response in cows. *Theriogenology*, v. 43, p. 270, 1995.
- MAPLETOFT, R.J.; BO, G.A.; ADAMS, G.P. Avanços na manipulação do ciclo estral de doadoras e receptoras nos programas de transferência de embriões em bovinos. *Arquivo Faculdade de Veterinária UFRGS*, Porto Alegre, v. 28, n.1, 2002a. (Supl.)
- MAPLETOFT, R.J.; COLAZO, M.C.; MARTÍNEZ, M.F.; KASTELIC, J.P. Estrogen esters to synchronize follicular wave emergence and ovulation in CIDR-treated cattle. In: *Proceedings of the Annual Convention of the American Embryo Transfer Association*, p. 27-38, 2002b.
- MARTÍNEZ, M.F.; COLAZO, M.C.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R. Effects of estradiol and progesterone on plasma steroid and gonadotropin concentrations in CIDR-treated ovariectomized cows. *Theriogenology*, v. 59, p. 224, 2003.
- NASSER, L.F.; ADAMS, G.P.; BO, G.A.; MAPLETOFT, R.J. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology*, v. 40, p. 713-724, 1993.
- REICHENBACH, H.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F.; SANTOS FILHO, A.S.; ANDRADE, J.C.O. Transferência e Criopresevação de Embriões Bovinos In: GONSALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. (Ed.) *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 1. ed. Varela, 2002. p. 127-177.
- THATCHER W.W.; MOREIRA, F.; SANTOS J.E.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.
- WHITTINGHAM, D.G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature*, v. 23, p. 125, 1971.