

Efeito do intervalo entre recrutamentos foliculares na superovulação de vacas da raça Holandesa não-lactantes

[Effect of interval between follicular recruitments on superovulatory response in non-lactating Holstein cows]

R.M. Santos^{1,3}, J.L.M. Vasconcelos^{2*}

¹Aluna de pós-graduação - FCAV-UNESP – Jaboticabal, SP

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP

Caixa Postal 560

18618-000 – Botucatu, SP

³Bolsista da FAPESP

RESUMO

Vacas da raça Holandesa não-lactantes, distribuídas em dois grupos, foram sincronizadas com o protocolo *Ovsynch* modificado. No dia sete (dia 0 = dia do segundo GnRH), o grupo 7 (G-7; n=19) recebeu CIDR usado previamente por cinco dias e 100mcg de GnRH, e o grupo 14 (G-14; n=21), CIDR e 25mg de PGF2 α . No dia 14 foi aspirado o folículo dominante (FD), trocado o CIDR usado por um novo e foram aplicados 25mg de PGF2 α . Iniciou-se o tratamento com FSH 36h depois, removeu-se o CIDR com o sétimo FSH e aplicou-se GnRH 36h depois. As inseminações foram feitas 12 e 24h depois. Recuperaram-se os embriões sete dias depois da inseminação artificial. O diâmetro do FD no G-7 foi 13,1 \pm 0,57mm no dia sete e 11,2 \pm 0,57mm no dia 14. O diâmetro FD persistente no G-14 aumentou de 12,6 \pm 0,55mm no dia sete para 16,4 \pm 0,55mm no dia 14 (P<0,001). O número de folículos \geq 8mm, 48h após o início do tratamento com FSH, foi maior (P<0,05) no G-7 (15,6 \pm 0,05) que no G-14 (12,5 \pm 0,05). Não foi detectado efeito de tratamento sobre o número de corpos lúteos e de embriões. O menor intervalo entre recrutamentos foliculares aumentou o número de folículos recrutados, porém não alterou a quantidade e a qualidade dos embriões produzidos.

Palavras-chave: bovino, aspiração folicular, embrião, FSH, superovulação

ABSTRACT

Dry Holstein cows were synchronized by a modified Ovsynch protocol. On day 7 (day 0 = day of the second GnRH), group 7 (G-7; n=19) received an used CIDR and GnRH (100 μ g). Group 14 (G-14; n=21) received an used CIDR and PGF2 α (25mg). On day 14, the dominant follicle (DF) was removed, by aspiration; the used CIDR was changed for a new CIDR plus PGF2 α . Thirty-six hours later, the FSH treatment was initiated. On the seventh injection of FSH, the CIDR was removed. Thirty-six hours after, the cows received GnRH. Donors were inseminated 12 and 24h after the GnRH injection. Embryos were recovered seven days after AI. The DF diameter in G-7 was 13.1mm on day 7 and 11.2mm on day 14. The persistent DF in the G-14 increased from 12.6mm on day 7 to 16.4mm on day 14 (P<0.001). The number of follicles \geq 8mm, 48h after the beginning of the FSH treatment, was 15.6 in G-7 and 12.5 in G-14 (P<0.05). No treatment effects were detected on number of corpus luteum and embryos. The shorter interval between follicular recruitment the higher the number of recruited follicles, but it did not have effects on the number or quality of embryos produced.

Keywords: dairy cow, follicular ablation, embryo, FSH, superovulation

Recebido em 11 de novembro de 2005

Aceito em 10 de abril de 2007

*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: vasconcelos@fca.unesp.br

INTRODUÇÃO

Em vacas, o desenvolvimento folicular durante o ciclo estral normal é caracterizado por duas a três ondas de crescimento (Sirois e Fortune, 1988; Ginther et al., 1989). Cada onda consiste na emergência simultânea de um grupo de folículos, denominada de recrutamento folicular, que é estimulado por aumento transitório do FSH (Turzilo e Fortune, 1990; Adams et al., 1992). Aproximadamente três dias após a emergência folicular, quando o maior folículo atinge o diâmetro de aproximadamente 8,5mm, um folículo continua crescendo e se torna o folículo dominante (FD), enquanto os demais folículos regridem e se tornam subordinados (FS), num evento denominado desvio ou seleção (Ginther et al., 1996).

Um dos objetivos da superovulação é fazer com que grande número de folículos atinja a condição ovulatória, para aumentar a produção de embriões. A resposta superovulatória tem grande variação, o que reduz a eficiência e a lucratividade dos programas de transferência de embriões. Estudos (Monniaux et al., 1983) relataram que a condição ovariana no início do tratamento superovulatório é responsável pela grande variabilidade da resposta superovulatória, tanto no número quanto na qualidade dos embriões produzidos.

Alguns dados sugerem que um pequeno intervalo entre os recrutamentos foliculares pode influenciar o recrutamento e/ou o desenvolvimento folicular subsequente. A aplicação de três doses consecutivas de GnRH com intervalos de sete dias aumentou a porcentagem de dupla ovulação de 33%, após a segunda dose de GnRH, para 47%, após a terceira (Vasconcelos et al., 1999). A aspiração folicular, por sua vez, quando realizada duas vezes por semana, aumentou o número de folículos disponíveis e a porcentagem de recuperação dos ovócitos em relação à aspiração folicular feita uma única vez por semana (Garcia e Salaheddine, 1998).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do intervalo entre os recrutamentos foliculares, de sete e 14 dias, na subsequente resposta superovulatória, avaliada pelo número e pela qualidade dos embriões produzidos, em vacas da raça Holandesa não-lactantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Vacas da raça Holandesa não-lactantes, com idade de quatro a 10 anos, foram utilizadas como doadoras de embrião (n=13). Os animais foram mantidos em pasto e suplementados com cana-de-açúcar triturada, 2,5kg/vaca/dia de farelo de trigo e sal mineral à vontade.

Utilizou-se sêmen de dois touros com características semelhantes: um deles foi usado para inseminar nove vacas e o outro quatro, em todos os períodos.

As vacas foram tratadas em quatro períodos. No período 1, elas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos, de acordo com o intervalo entre os recrutamentos foliculares: no grupo 7, o intervalo entre recrutamentos foliculares foi de sete dias e, no grupo 14, de 14 dias. Nos períodos subsequentes elas receberam pelo menos uma vez cada tratamento, alternadamente, perfazendo um total de 40 colheitas de embriões.

No início de cada período, todas as vacas foram sincronizadas pelo protocolo Ovsynch modificado, que consistiu na aplicação de uma dose de GnRH em dia aleatório do ciclo estral, seguido, seis dias depois, de aplicação de duas doses de PGF_{2α}, com intervalo de 12 horas entre aplicações; 48 horas após a primeira aplicação de PGF_{2α}, foi aplicada a segunda dose de GnRH (Roy e Twagiramungu, 1996).

A diferenciação entre os grupos foi feita no sétimo dia do ciclo estral (dia 0 = dia da segunda aplicação de GnRH do protocolo *Ovsynch*). No grupo 7, os animais (n = 19) receberam um dispositivo intravaginal de progesterona previamente utilizado por cinco dias em outras vacas, para redução da concentração de progesterona (CIDR¹), e 100mcg de GnRH², para a ovulação do folículo dominante e recrutamento folicular. Os animais do grupo 14 (n=21) receberam um dispositivo intravaginal de progesterona usado previamente por cinco dias e 25mg de PGF_{2α}³, para a regressão do corpo lúteo (CL) e manutenção de níveis sublúteos de progesterona e consequente manutenção do FD (ausência de recrutamento folicular).

¹CIDR® Pfizer – Saúde Animal, Brasil

²Cystorelin®, Merial Ltd., EUA

³Lutalyse®, Pfizer – Saúde Animal, Brasil

A partir do dia 14, os dois grupos receberam o mesmo tratamento superovulatório. Nesse dia, foi feita a aspiração do folículo dominante e dos folículos ≥ 4 mm e a troca do dispositivo intravaginal por outro, novo, associado à aplicação de 25mg de PGF_{2 α} ³. O tratamento superovulatório começou 30 a 36 horas após a aspiração, com aplicação de 280mg de FSH⁴ em oito doses decrescentes, com intervalo de oito horas. O dispositivo de progesterona foi retirado no momento da aplicação da sétima dose de FSH⁴. Trinta e seis horas depois de retirado o dispositivo, as vacas receberam 100mcg de GnRH² e foram inseminadas 12 e 24 horas depois.

Os exames ultra-sonográficos foram realizados com aparelho Aloka⁵, com transdutor linear retal de 7,5MHz; para a aspiração folicular, foi utilizado um transdutor vaginal convexo de 5,0MHz, montado em armação de plástico contendo um guia para agulha de 47cm de comprimento. A agulha utilizada tinha a medida 17 (diâmetro interno = 1,2mm; diâmetro externo = 1,5mm).

Foram avaliados por ultra-sonografia a ovulação ao final do protocolo "Ovsynch", a ovulação do FD no grupo 7 após a aplicação de GnRH² no dia sete, a regressão do CL no grupo 14 após a aplicação de PGF_{2 α} ³ no dia sete, a onda de crescimento folicular, o número de ondas foliculares e o intervalo entre os recrutamentos foliculares. Após a aspiração folicular, também foi avaliado se o FD tinha sido efetivamente removido, para sincronizar a emergência da nova onda de crescimento folicular.

Nos dois grupos, só foram superovuladas as vacas que ovularam ao segundo GnRH do protocolo inicial de sincronização (*Ovsynch*). No grupo 7, só continuaram no tratamento as vacas que responderam à aplicação de GnRH no dia sete do tratamento e apresentaram novo recrutamento folicular. No grupo 14, só foram superovuladas as vacas que apresentaram luteólise após a aplicação de PGF_{2 α} no dia sete, mantiveram o folículo dominante por 14 dias e não apresentaram outro recrutamento folicular no período.

Foram colhidas amostras de sangue nos dias sete, 14 e 19 do protocolo para dosagem das concentrações séricas de estradiol e progesterona. As amostras de sangue, colhidas da veia coccígea em tubos com vácuo e sem anticoagulante, foram imediatamente colocadas no gelo em posição vertical após a colheita e mantidas a 4°C por 24 horas. Após centrifugação a 1200g por 15 minutos e separação do soro, foram armazenadas a -20 °C até a realização das dosagens.

As concentrações séricas de progesterona foram determinadas com *kit* de radioimunoensaio em fase sólida⁶, validado para o uso em vacas. As amostras foram processadas em dois ensaios com coeficiente de variação (CV) intra-ensaio para as amostras com concentração baixa e alta de 5,4%, 7,9% e 0,3% e 2,1%, respectivamente, e o CV interensaio para as mesmas concentrações de 1,9% e 0,9%.

As concentrações séricas de estradiol foram determinadas com *kit* de radioimunoensaio⁷, validado para o uso em vacas. As amostras foram processadas em dois ensaios com CV intra-ensaio para as amostras com concentração baixa e alta de 3,0%, 26,9% e 20,7%, 12,1%, respectivamente, e o CV interensaio para as mesmas concentrações de 14,0% e 15,5%.

Os embriões foram recuperados sete dias depois da inseminação artificial, pela técnica de colheita não cirúrgica. Foram classificados quanto ao estágio de desenvolvimento e à qualidade, de acordo com os critérios da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. Para a análise final, os embriões foram classificados em viáveis (graus 1, 2 e 3), degenerados (graus 4 e 5) e não fertilizados. Após a classificação os embriões foram congelados.

Os resultados de número de folículos foram submetidos à transformação $y' = \sqrt{y}$, e os demais dados relativos à contagem (número de corpos lúteos, número de embriões viáveis, degenerados e não fertilizados) à transformação $y' = \sqrt{y + 0,5}$.

⁴Folltropin-V®, Vetrepharm Inc., Canada

⁵Aloka - modelo SSD500-V, EUA

⁶Coat a Count® - Diagnostic Products Corporation, EUA

⁷3rd Generation Estradiol RIA - Diagnostic Systems Laboratories, EUA

Efeito do intervalo entre recrutamentos...

A análise estatística das variáveis: concentração de progesterona, número de folículos, número de corpos lúteos, número de embriões viáveis, degenerados e não fertilizados foi feita por meio do programa MIXED do SAS (User's..., 1988). No modelo foram incluídos os efeitos fixos de tratamento, período e seqüência de tratamentos, bem como o efeito aleatório de vaca dentro de seqüência.

RESULTADOS

A taxa de sincronização ao protocolo inicial ("Ovsynch") foi de 100% (43/43). Foram consideradas sincronizadas as vacas que não apresentavam o FD 48 horas após a aplicação do segundo GnRH e apresentaram formação de CL correspondente ao folículo que ovulou. No grupo 7, recrutamento folicular a cada sete dias, a taxa de ovulação, em resposta à aplicação de GnRH

no dia sete, foi de 95,2% (20/21). No grupo 14, recrutamento folicular a cada 14 dias, a taxa de luteólise, em resposta à aplicação de prostaglandina no dia sete foi de 100% (22/22); todas as vacas apresentaram regressão estrutural do CL, 48 horas após a aplicação de PGF2 α . A taxa de manutenção do FD persistente no grupo 14 foi de 95,5% (21/22).

As diferenças na concentração de progesterona, no diâmetro do FD e na concentração de estradiol no dia 14 do experimento, confirmam a persistência do FD e a ausência de novo recrutamento folicular no grupo 14 e o recrutamento de uma nova onda de crescimento folicular no grupo 7, devido à ovulação em resposta à aplicação de GnRH no dia sete (Tab. 1).

Tabela 1. Diâmetro do folículo dominante (FD), concentrações séricas de progesterona e de estradiol nos dias sete, 14 e 19 do experimento, de acordo com intervalo entre os recrutamentos foliculares

Intervalo entre recrutamentos foliculares	Diâmetro do FD (mm)	Concentração de progesterona (ng/ml)	Concentração de estradiol (pg/ml)
7 dias (grupo 7)			
Dia 7	13,1 \pm 0,57	2,0 \pm 0,21	2,0 \pm 0,37
Dia 14	11,2 \pm 0,57***	5,9 \pm 0,44**	1,1 \pm 0,37*
Dia 19	--	0,2 \pm 0,04	7,6 \pm 1,78
14 dias (grupo 14)			
Dia 7	12,6 \pm 0,55	1,9 \pm 0,21	1,6 \pm 0,36
Dia 14	16,4 \pm 0,55***	1,2 \pm 0,43**	2,5 \pm 0,36*
Dia 19	--	0,10 \pm 0,03	6,9 \pm 1,76

Comparações entre os grupos 7 e 14 no dia 14 do tratamento: * P<0,01; ** P>0,001; *** P<0,0001.

O resultado a ser destacado é o número de folículos maiores ou iguais a 8mm, 48 horas após o início do tratamento com FSH, que foi maior (P<0,05) no grupo 7 que no grupo 14, mostrando que o intervalo de sete dias entre os recrutamentos foliculares influenciou positivamente o número de folículos recrutados pelo tratamento superovulatório subsequente (Tab. 2).

Apesar do maior número de folículos recrutados no grupo 7, não foi encontrada diferença (P>0,10) no número de corpos lúteos e de embriões, entre os grupos 7 e 14, (Tab. 2). Também não foi observada diferença na taxa de recuperação dos embriões entre os grupos 7 (55%) e 14 (53%).

Não foi detectada diferença na qualidade dos embriões produzidos (P>0,10) entre os grupos 7 e 14 (Tab. 3).

Tabela 2. Número de folículos, de corpos lúteos e de embriões, de acordo com o intervalo entre os recrutamentos foliculares

Intervalo entre recrutamentos foliculares	N	Número de folículos [#]	Número de corpos lúteos	Número de embriões
7 dias (grupo 7)	19	15,6 \pm 0,05a	9,9 \pm 0,10	5,4 \pm 0,07
14 dias (grupo 14)	21	12,5 \pm 0,05b	9,8 \pm 0,10	5,2 \pm 0,08

[#]Foram considerados os folículos maiores ou iguais a 8mm, 48 horas após o início do tratamento com FSH. Valores seguidos por letras distintas na coluna deferem entre si (P<0,05).

Tabela 3. Número de embriões viáveis, estruturas não fertilizadas e embriões degenerados, de acordo com o intervalo entre os recrutamentos foliculares

Intervalo entre recrutamentos foliculares	N	Embriões viáveis ¹	Estruturas não fertilizadas	Embriões degenerados ²
7 dias (grupo 7)	19	3,0±0,08	0,9±0,03	1,5±0,11
14 dias (grupo 14)	21	2,6±0,08	1,1±0,03	1,6±0,11

¹Embriões classificados como graus 1, 2 e 3; ²Embriões classificados como graus 4 e 5.

DISCUSSÃO

Os resultados indicam que o intervalo de 14 dias entre os recrutamentos foliculares (grupo 14) reduziu o número de folículos recrutados pelo tratamento superovulatório subsequente. O menor número de folículos recrutados no grupo 14 (12,5±0,05) comparado com o grupo 7 (15,6±0,05) pode ser explicado pela ação do FD sobre secreção de FSH pela glândula pituitária (Gibbons et al., 1997; Gibbons et al., 1999; Bleach et al., 2001). Estudos *in vivo* (Fortune et al., 1998) e *in vitro* (Lussier et al., 1994) demonstraram que folículos primários de bovinos não dependem de FSH para se desenvolverem, porém o decréscimo na concentração de FSH, causado pela ação do FD, pode precipitar a atresia dos folículos de 3 a 4mm de diâmetro, quando estes começam a expressar dependência ao FSH (Adams et al., 1992; Turzillo e Fortune, 1993).

No grupo 7, como o recrutamento foi a cada sete dias, o FD exerceu sua ação sobre os demais folículos por um período menor, possibilitando que maior número de folículos estivessem aptos para serem recrutados pela ação do FSH exógeno do tratamento superovulatório, enquanto, no grupo 14, recrutamento a cada 14 dias, folículos de 3 a 4mm de diâmetro ficaram sob a ação do FD por um período maior, provavelmente aumentando o número de folículos que entraram em atresia, pois já expressavam dependência ao FSH.

Apesar do maior recrutamento folicular no grupo 7, não foi detectada diferença no número de CL entre os grupos. O número de corpos lúteos dividido pelo número de folículos (48 horas após o início do tratamento com FSH) indica que a taxa de ovulação pode ter sido menor no grupo 7 (63%) que no grupo 14 (79%). Segundo D'Occhio et al. (1999), as falhas de ovulação em

protocolos de superovulação podem ser devido ao curto período de desenvolvimento dos folículos durante o tratamento superovulatório. Estudos (Sartori et al. (2001) mostraram que os folículos adquirem capacidade ovulatória com aproximadamente 10mm de diâmetro (um dia após o desvio), mas precisam de maior concentração de LH para ovularem do que folículos maiores. A aquisição da capacidade ovulatória provavelmente envolve o aumento da expressão de receptores de LH nas células da granulosa. No grupo 7, devido ao maior número de folículos recrutados (15,6±0,05 vs. 12,5±0,05 folículos), o estímulo gonadotrófico talvez não tenha sido suficiente para o completo desenvolvimento de todos os folículos e/ou aquisição da capacidade ovulatória, reduzindo, assim, a taxa de ovulação.

Não foi encontrada diferença na concentração de estradiol no dia 19 (Tab. 1), entre os grupos 7 (7,6±1,78pg/ml) e 14 (6,9±1,76pg/ml). Esse dado, associado ao número de CL, sugere que o desenvolvimento dos folículos recrutados no grupo 7 pode ter sido incompleto. O esperado seria maior concentração de estradiol no dia 19 (final do tratamento superovulatório) e maior número de CL nos animais do grupo 7, se todos os folículos recrutados tivessem chegado ao desenvolvimento final e adquirido capacidade ovulatória.

A qualidade dos embriões não foi influenciada pelo intervalo entre os recrutamentos foliculares, sendo que os dois grupos apresentaram a mesma proporção de embriões viáveis, degenerados e não fertilizados (Tab. 3). Provavelmente porque, após a aspiração folicular, o tratamento superovulatório foi igual para os grupos 7 e 14, e foi usado um dispositivo intravaginal de progesterona na ausência de CL (aplicação de PGF_{2α} no dia da aspiração folicular), para que a concentração de progesterona fosse uniforme

entre os grupos, pois, sabe-se que a progesterona poderia influenciar a pulsatilidade de LH, interferindo no desenvolvimento final dos folículos (Stock e Fortune, 1993; Bergfeld et al., 1996;) e na qualidade dos ovócitos (Revah e Butler, 1996).

Outro fator que poderia influenciar a qualidade dos embriões é a concentração de estradiol. Altas concentrações de estradiol na circulação periférica de vacas, devido ao crescimento de grande número de folículos, podem ser prejudiciais à fertilização e/ou ao desenvolvimento embrionário (Gong et al., 1993). Adicionalmente, Binelli et al. (1999) mostraram que a secreção de proteínas do oviduto é alterada por altas concentrações de estradiol. No presente estudo, apesar de o recrutamento folicular ter sido maior no grupo 7, não foi encontrada diferença na concentração de estradiol no dia 19 (final do tratamento superovulatório; Tab. 1), provavelmente porque o mesmo número de folículos chegou ao desenvolvimento final nos dois grupos, o que pode ser estimado pelo número de CL, que foi igual entre os grupos (Tab. 2). Portanto, não houve influência da concentração de estradiol sobre a qualidade dos embriões em nenhum dos grupos.

Estes resultados não suportam a hipótese inicial de que o menor intervalo entre os recrutamentos foliculares melhoraria a resposta ao tratamento superovulatório subsequente.

O tratamento foi eficiente para sincronizar o estro no final da superovulação. Das 40 vacas superovuladas, 37 (92,5%) apresentaram sinais de estro até 36h após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona, que ocorreu junto à sétima aplicação de FSH. Destas, 21,6% (8/37) iniciaram o estro 24 horas após a remoção do dispositivo intravaginal de progesterona, e 78,4% (29/37) 36 horas após a remoção do dispositivo, no momento da aplicação do GnRH. Essa alta taxa de sincronização ao final do protocolo de superovulação se deve à aspiração folicular 36 horas antes do início do tratamento superovulatório. Foi verificado (Gibbons et al., 1999) que a emergência da nova onda ocorre aproximadamente 30 horas após a aspiração do FD e foi relatado (Bergfeld et al., 1994) alto grau de sincronização da emergência da nova onda após a aspiração de todos os folículos e também

alta taxa de sincronização da ovulação quando administraram prostaglandina quatro dias após a aspiração folicular. Estes resultados indicam a viabilidade da utilização da inseminação artificial com tempo fixo em protocolos de superovulação.

CONCLUSÃO

Em vacas da raça Holandesa não-lactantes, o menor intervalo entre os recrutamentos foliculares (sete vs. 14 dias) aumentou o número de folículos recrutados pelo tratamento superovulatório com FSH subsequente, porém não teve efeito sobre a quantidade e a qualidade dos embriões produzidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KO, J.C.H. et al. Association between surges of follicle-stimulating hormone and emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fertil.*, v.94, p.177-188, 1992.
- BERGFELD, E.G.M.; KOJIMA, F.N.; CUPP, A.S. et al. Changing dose of progesterona results in sudden changes in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of 17 β -estradiol in bovine females. *Biol. Reprod.*, v.54, p.546-553, 1996.
- BERGFELT, D.R.; LIGHTFOOT, K.C.; ADAMS, G.P. Ovarian synchronization following ultrasound - guide transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology*, v.42, p.895-907, 1994.
- BINELLI, M.; HAMPTON, J.; BUHI, W.C. et al. Persistent dominant follicle alters pattern of oviductal secretory proteins from cows at estrus. *Biol. Reprod.*, v.61, p.127-134, 1999.
- BLEACH, E.C.L.; GLENCROSS, R.G.; FEIST, S.A. et al. Plasma inhibin A in heifers: Relationship with follicle dynamics, gonadotropins, and steroids during the estrous cycle and after treatment with bovine follicular fluid. *Biol. Reprod.*, v.64, p.743-752, 2001.
- D'OCCHIO, M.J.; JILLELLA, D.; LINDSEY, B.R. Factors that influence follicle recruitment, growth and ovulation during ovarian superstimulation in heifers: Opportunities to

- increase ovulation rate and embryo recovery by delaying the exposure of follicles to LH. *Theriogenology*, v.51, p.9-35, 1999.
- FORTUNE, J.E.; KITO, S.; WANDJI, S.A. et al. Activation of bovine and baboon primordial follicles in vitro. *Theriogenology*, v.49, p.441-449, 1998.
- GARCIA, A.; SALAHEDDINE, M. Effects of repeated ultrasound-guide transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. *Theriogenology*, v.50, p.575-585, 1998.
- GIBBONS, J.R.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. *Biol. Reprod.*, v.57, p.1066-1073, 1997.
- GIBBONS, J.R.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Relationship between follicular development and the decline in the follicle-stimulating hormone surge in heifers. *Biol. Reprod.*, v.60, p.72-77, 1999.
- GINTHER, O.J.; KASTELIC, J.P.; KNOPF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrus cycle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.20, p.187-200, 1989.
- GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M. et al. Selection of the Dominant Follicle in Cattle. *Biol. Reprod.*, v.55, p.1187-1194, 1996.
- GONG, J.G.; TONY, A.; BRAMILEY, A. et al. Effect of recombinant bovine somatotropin on the superovulatory responses to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. *Biol. Reprod.*, v.48, p.1141-1149, 1993.
- LUSSIER, J.G.; MATTON, P.; GUILBAULT, L.A. et al. Ovarian follicular development and endocrine responses in follicular-fluid-treated and hemi-ovariectomized heifers. *J. Reprod. Fertil.*, v.102, p.95-105, 1994.
- MONNIAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. Superovulatory responses in cattle. *Theriogenology*, v.19, p.55-81, 1983.
- REVAH, I.; BUTLER, W.R. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, v.106, p.39-47, 1996.
- ROY, G.L.; TWAGIRAMUNGU, H. A fixed time IA program using the GnRH – PGF – GnRH method for beef females. *J. Anim. Sci.*, v.74, p.462, 1996. (Abstr.).
- SARTORI, R.; FRICKE, P.M.; FERREIRA, J.C.P. et al. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol. Reprod.*, v.65, p.1403-1409, 2001.
- SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.*, v.39, p.308-317, 1988.
- STOCK, A. E.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology*, v.132, p.1108-1114, 1993.
- TURZILLO, A.M.; FORTUNE, J.E. Effects of suppressing plasma FSH on ovarian follicular dominance in cattle. *J. Reprod. Fertil.*, v.98, p.113-119, 1993.
- TURZILLO, A.M.; FORTUNE, J.E. Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers. *J. Reprod. Fertil.*, v.89, p.643-653, 1990.
- USER'S guide: Statistics, Version 6.02. Cary, NC: SAS Institute, 1988.
- VASCONCELOS, J.L.M.; SANTOS, R.M.; COSTA, D.A. et al. Effects of progesterone concentration on size of the ovulatory follicle and double ovulation rate in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.82, p.99, 1999. (Abstr.).