

## Redução da resposta superovulatória de fêmeas bovinas superestimuladas com FSH em doses split

[Reduced superovulatory response of bovine females overstimulated with FSH in split doses]

A.C.N. Tirapelli<sup>1</sup>, C.A.C. Fernandes<sup>2</sup>, M.M. Gioso<sup>2\*</sup>, F.C. Varago<sup>2</sup>, M. Palhão<sup>2</sup>,  
T.C. Rossi<sup>1</sup>, J.A.D. Garcia<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Aluno de pós-graduação – Universidade José do Rosário Vellano – Unifenas, MG

<sup>2</sup>Universidade José do Rosário Vellano – Unifenas, MG

### RESUMO

Objetivou-se avaliar a superovulação (SOV) de vacas zebuínas, utilizando protocolo convencional ou protocolo com número menor de aplicações e similar dosagem (dose split). Utilizaram-se 16 fêmeas (total 32 SOV), com idade entre 17-42 meses e escore de condição corporal 2,5-4 (escala de 1-5), em delineamento tipo *cross-over*. No início do tratamento (D0), os animais receberam um dispositivo de progesterona e 2mg de benzoato de estradiol. As fêmeas do grupo convencional receberam 250UI de FSH/LH divididas em oito doses decrescentes administradas em intervalos de 12h (FSH/LH no D4, D5, D6 e D7 no período da manhã e tarde, nas respectivas dosagens: 50,0 UI; 37,5 UI; 25,0 UI; 12,5 UI). No D7 pela manhã, as fêmeas foram tratadas com 150µg de D+cloprostenol, e a remoção da progesterona foi realizada no D7 à tarde. As fêmeas do grupo split também receberam 250 UI de FSH/LH. No D4 de manhã, administraram-se 62,5 UI de FSH/LH via IM e 125 UI por via SC. Quarenta e oito horas após (D6) administraram-se 62,5 UI via SC e na manhã do D7 foi removida a progesterona e aplicaram-se 150µg de D+cloprostenol. As fêmeas de ambos os grupos receberam 50µg de análogo de GnRH no D8 pela manhã e foram inseminadas 12 e 24 horas após. No D15 realizou-se a colheita dos embriões em ambos os tratamentos. Avaliou-se a resposta superovulatória pela contagem do número de folículos e CLs de cada ovário, com auxílio de ultrassom. Todas as variáveis foram submetidas ao teste T de Student para amostras pareadas. Houve diferença ( $P<0,05$ ) na quantidade de folículos acima de 8mm no D8 ( $9,06\pm 4,54$  e  $5,50\pm 4,59$ ); número de CLs no dia da colheita ( $8,12\pm 3,26$  e  $4,69\pm 3,46$ ), número de embriões totais ( $6,69\pm 3,05$  e  $3,37\pm 2,50$ ) e de embriões viáveis ( $5,25\pm 2,29$  e  $2,37\pm 1,78$ ) nas vacas do grupo convencional em relação às do split, respectivamente. Conclui-se que o protocolo split tem pior resposta superovulatória e de produção *in vivo* de embriões, em vacas zebuínas, quando comparado ao protocolo convencional.

Palavras-chave: superovulação, dose de FSH, CL

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the superovulation (SOV) response of zebu cows, using conventional protocol or other protocol with similar dose but smaller number of applications (split dose). 16 females (32 SOV), aged 17-42 months, and body condition score of 2.5-4 (1-5 scale) were used in randomized cross-over. At the start of treatment (D0), the animals received progesterone device and 2mg of estradiol benzoate. The females from the conventional group received 250 IU of FSH/LH divided into eight decreasing doses administered at intervals of 12 hours (FSH/LH in D4, D5, D6 and D7, with their respective strengths: 50.0 IU, 37.5 IU, 25.0 IU, 12.5 IU). In D7, the females were treated with 150µg of D+cloprostenol, and the removal of progesterone device was held in the afternoon. The females from the split group also received 250 IU of FSH/LH. In the morning D4 was administered in 62.5 IU FSH/LH IM

---

Recebido em 5 de fevereiro de 2014

Aceito em 4 de agosto de 2014

\*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: mmgioso@yahoo.com.br

and 125 IU subcutaneously. Forty eight hours later (D6) 62.5 IU was administered subcutaneously in the morning and on D7, the progesterone device was removed and 150 µg of D+cloprostenol was applied. The females in both groups were given 50 µg of GnRH in the morning and on D8 were inseminated after 12 and 24 hours. On D15 the embryo collection was performed in both treatments. The evaluation of superovulatory response was done by counting the number of follicles and corpus luteum (CL) in each ovary, with the aid of ultrasound. The variables were assessed by Student's t test for paired samples. There were differences ( $P < 0.05$ ) in the number of follicles over 8mm in D8 ( $9.06 \pm 4.54$  and  $5.50 \pm 4.59$ ); in the amount of CL at the time of collection ( $8.12 \pm 3.26$  and  $4.69 \pm 3.46$ ), total number of embryos ( $6.69 \pm 3.05$  and  $3.37 \pm 2.50$ ) and viable embryos ( $5.25 \pm 2.29$  and  $2.37 \pm 1.78$ ) for cows in the conventional group compared to the split group, respectively. It is concluded that the split protocol has worse superovulatory response and in vivo production of embryos in zebu cows compared with the conventional protocol.

Keywords: superovulation, FSH, CL

## INTRODUÇÃO

As descobertas recentes ocorridas em relação aos aspectos da fisiologia da reprodução em bovinos aumentaram as expectativas e possibilidades sobre a capacidade de contribuição das fêmeas no melhoramento genético da espécie. Com esses conhecimentos, novas biotecnologias tiveram sua utilização viabilizada na prática, tanto econômica quanto na forma de aplicação, e a transferência de embriões (TE) é uma dessas tecnologias.

A técnica de superovulação (SOV) é um dos passos fundamentais no programa de TE em bovinos. Tem como objetivo estimular, através de administração de hormônios, o desenvolvimento de um grande número de folículos até o estágio no qual possam ovular (revisado por Buratini Jr., 1997).

Os hormônios que constituem a base dos protocolos hormonais de superovulação são o Hormônio Folículo Estimulante (FSH), mais utilizado hoje em dia; a Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG); e, em menor utilização, o Hormônio da Menopausa Humana (hMG) (Gonçalves et al., 2008). Esses hormônios atuam diretamente nos folículos, promovendo o desenvolvimento e crescimento destes em codominância, sem que haja formação de apenas um folículo dominante, reduzindo assim o número de folículos que entrariam no processo de atresia. Dessa maneira, o principal objetivo dos tratamentos superovulatórios em bovinos é induzir um maior número de ovulações que resultará em um grande número de embriões viáveis que levem a aceitáveis taxas de gestação após a transferência (Kelly et al., 1997).

Porém, alguns estudos (Alvarez et al., 2010; Bó et al., 2010) têm sido empregados para a utilização de protocolos mais simplificados (doses split), na tentativa de reduzir a manipulação e manejo das doadoras e permitir, mesmo assim, que haja uma adequada superestimulação do desenvolvimento folicular com pertinentes respostas superestimulatórias e produções embrionárias similares aos protocolos convencionais.

Por essa razão, objetivou-se avaliar e comparar resultados de crescimento folicular, número de corpos lúteos (CLs) e produção de embriões viáveis após a SOV de fêmeas zebuínas, utilizando FSH/LH em um protocolo convencional e com número menor de aplicações e similar dosagem (protocolo split).

## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se doadoras de raças zebuínas hospedadas na Central Biotran. Foram utilizados dois protocolos de superovulação em 16 doadoras. Todas as doadoras foram superovuladas duas vezes, uma em cada protocolo (split e convencional). Os animais selecionados apresentaram peso corporal acima de 350kg e idade variando de 17 a 42 meses, e todas as fêmeas passaram por avaliação ginecológica completa, utilizando-se os métodos de palpação transretal, ultrassonografia e vaginoscopia, a fim de detectar qualquer alteração que impossibilitasse a execução do projeto com êxito. Para a realização dos procedimentos com os animais, estes foram mantidos em um tronco de contenção, para facilitar a realização e como forma de segurança para o operador.

### Redução da resposta...

Uma vez selecionadas, essas fêmeas receberam a mesma dieta durante todo o período experimental, visando a um balanço energético positivo, e houve a manutenção de escore corporal de 3 a 4, numa escala de 1 a 5, segundo Ferreira (1990). A dieta baseou-se no fornecimento de volumoso à base de silagem de milho, sendo fornecido um total aproximado de 20kg por animal e um concentrado comercial (3kg por animal, aproximadamente) uma vez ao dia. Esse tipo de alimentação foi fornecido na época da seca. Já na época das águas, as vacas foram mantidas apenas no pasto. Água e mineralização foram administradas de forma *ad libitum* durante o ano todo.

Houve a realização de dois protocolos, sendo o protocolo 1 o grupo convencional e o protocolo 2 o grupo split. As fêmeas foram distribuídas por sorteio para iniciarem os protocolos 1 ou 2. Todos os animais passaram pelos dois grupos experimentais em um delineamento tipo *cross-over*.

Antes do início da SOV, todos os animais foram submetidos à sincronização da emergência da onda de crescimento folicular, segundo Bó *et al.* (1995).

No protocolo 1: Grupo Convencional, utilizou-se dose total de 250 UI de FSH/LH por doadora (Pluset®, Hertape Calier, Brasil), em um esquema de aplicação de oito doses decrescentes, conforme descrito na Tab. 1. A dose de 250 UI de FSH/LH, de cada doadora, foi diluída em 20 mL de solução fisiológica. As aplicações foram feitas com intervalos exatos de 12 horas, via IM.

No protocolo 2: Grupo Split, utilizou-se também a mesma dose de 250 UI de FSH/LH por doadora, num esquema de aplicação distinto (Tab. 1). Essa dose de FSH/LH foi diluída em 10mL de solução fisiológica esterilizada para facilitar as aplicações.

Tabela 1. Esquema em dias e doses estipuladas utilizadas para tratamento superovulatório Convencional ou Split, em 16 vacas doadoras de raças zebuínas, com idade variando entre 17 a 42 meses

Dia	Protocolo Convencional		Protocolo Split	
	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde
D0	Implante de progesterona e aplicação de 2mg de benzoato de estradiol		Implante de progesterona e aplicação de 2mg de benzoato de estradiol	
D4	4mL (50 UI FSH/LH)	4mL (50 UI FSH/LH)	2,5mL (62,5 UI FSH/LH) – via IM 5,0mL (125,0 UI FSH/LH) – via SC	
D5	3mL (37,5 UI FSH/LH)	3mL (37,5 UI FSH/LH)		
D6	2mL (25,0 UI FSH/LH)	2mL (25,0 UI FSH/LH)	2,5mL (62,5 UI FSH/LH) – via SC	
D7	1mL (12,5 UI FSH/LH) Aplicação de 150µg de análogo a PGF2α	1mL (12,5 UI FSH/LH) Remover implante de progesterona	Remover implante de progesterona. Aplicação de 150µg de análogo a PGF2α	
D8	Aplicação de 50µg de Acetato de Lecirelina	1ª inseminação	Aplicação de 50µg de Acetato de Lecirelina	1ª inseminação
D9	2ª inseminação		2ª inseminação	
D16	Colheita dos embriões	150µg de análogo a PGF2α	Colheita dos embriões	150µg de análogo a PGF2α

Os produtos utilizados em todos os protocolos foram: Benzoato de Estradiol (Benzoato HC<sup>®</sup>, Hertape Calier, Brasil); Análogo da  $\beta$ GF2 (Veteglan<sup>®</sup>, Hertape Calier, Brasil); Acetato de Lecirelina (Gestran<sup>®</sup>, Tecnopec, Brasil); FSH/LH (Pluset<sup>®</sup>, Hertape Calier, Brasil) e implante de progesterona (Primer<sup>®</sup>, Tecnopec, Brasil).

As doadoras foram inseminadas em duas oportunidades, utilizando sêmen convencional de touro da raça holandesa. Todas as doses foram da mesma partida.

Durante a coleta de embriões, as doadoras receberam anestesia peridural baixa, com 4mL de lidocaína a 2% sem vasoconstritor (Dorfin<sup>®</sup>, Hertape Calier, Brasil).

Foram realizadas avaliações de folículos ovarianos, com auxílio do aparelho de ultrassom (M5 VET<sup>®</sup>, Mindray, China), tanto do grupo convencional quanto do grupo split, antes da superovulação (D0), no início da superovulação (D4), no meio da superovulação (D6) e no final da superovulação (D8). No dia da coleta (D15) foram realizadas imagens de CLs. A quantidade de folículos foi contabilizada em cada ovário de acordo com as seguintes mensurações: até 3 mm de diâmetro, de 3 a 8 mm de diâmetro e maior que 8 mm de diâmetro. Além disso, no dia 15 dos protocolos, contabilizou-se o número de CLs presentes em cada ovário.

As imagens de ultrassonografia foram gravadas com auxílio de uma câmera de vídeo digital (Sony DCR30) que captura cliques de vídeo diretamente do equipamento via conector padrão RCA. Posteriormente, esses vídeos, em formato

.mp4, foram transferidos para um computador e, neste, realizaram-se as análises do diâmetro dos folículos e contagem dos corpos lúteos. Utilizou-se para as mensurações a escala de gradação do próprio aparelho de ultrassom.

Os embriões foram colhidos pelo método não cirúrgico, sete dias após a primeira inseminação artificial (segundo Fernandes, 1994) e classificados segundo Lindner e Wright (1983).

Para as análises estatísticas, todas as variáveis foram submetidas ao teste T de Student para amostras pareadas, utilizando o programa Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG), segundo Ribeiro Júnior (2001). Para todas as análises considerou-se nível de significância a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como demonstrado na Tab. 2, o número de folículos avaliados, no D0 do protocolo, não diferiram entre os grupos (convencional e split) para os folículos até 3 mm de diâmetro e de 3 a 8 mm de diâmetro ( $P > 0,05$ ). Para os folículos maiores que 8mm de diâmetro, houve diferença ( $P < 0,05$ ), em que se contabilizou maior quantidade de estruturas no grupo convencional ( $1,50 \pm 0,89$ ) que no grupo split ( $0,87 \pm 0,72$ ). Porém, todos os animais foram sincronizados no início dos protocolos (D0) justamente para que houvesse uma organização de emergência de onda e não ocorresse diferença de número de folículos entre os animais dos dois grupos. Portanto, pode-se inferir que a diferença observada se deve ao efeito do tratamento utilizado.

Tabela 2. Média do número de folículos mensurados antes do processo de superovulação (D0) e no início da superovulação (D4) das 16 fêmeas bovinas submetidas aos dois grupos de superovulação (convencional e split)

Tratamento	N	DO			Início SOV D4	Início SOV D4	Início SOV D4
		Fols até 3mm	Fols entre 3 a 8mm	Fols > 8mm*	Fols até 3mm	Fols entre 3 a 8mm	Fols > 8mm
Convencional	16	7,75±3,41	5,12±2,75	1,50±0,89	9,50±3,81	4,00±2,92	1,125±0,50
Split	16	7,625±3,86	5,50±3,97	0,87±0,72	9,375±3,63	4,31±2,96	1,25±0,77
Total	32	7,69±3,59	5,31±3,36	1,19±0,86	9,44±3,66	4,16±2,90	1,1±0,64

\*Dados na mesma coluna diferem pelo teste T de Student ( $P < 0,05$ ).

### Redução da resposta...

Durante o início da superovulação (D4), a quantidade de folículos de até 3mm de diâmetro, tanto do grupo convencional quanto do grupo split, não apresentaram diferenças estatísticas ( $P>0,05$ ). Isso porque o tratamento com implante de progesterona (P4) associado ao benzoato de estradiol (BE) no D0 suprime a liberação do FSH e LH endógenos resultando em atresia na fase inicial da onda de desenvolvimento folicular. Uma vez que o estradiol foi metabolizado, restabelece-se a liberação de FSH e ocorre a emergência de uma nova onda de desenvolvimento folicular no D4 (Bo *et al.*, 1995). Dessa maneira, o início do protocolo de superovulação é o momento em que esses folículos emergentes estão em maiores quantidades, uma vez que a onda de crescimento folicular está sendo iniciada. Esse fato demonstra que o protocolo de sincronização com P4 e BE foi eficiente em “anular” as ondas foliculares anteriores (Kastellic *et al.*, 1996) e promover uma quantidade equivalente de folículos em emergência folicular.

De acordo com a Tab. 3, durante o protocolo de superovulação (D6) não houve diferenças estatísticas entre o grupo convencional e o split quando se comparou a quantidade de folículos ( $P>0,05$ ), o que demonstra que, até a metade do tempo decorrido dos dois protocolos, os tratamentos foram equivalentes em promover o crescimento folicular no processo da SOV. Os folículos maiores que 8mm de diâmetro presentes nessa etapa provavelmente devem ser folículos em regressão da onda anterior à sincronização (Ginther *et al.*, 1997).

No final da SOV do grupo split (D8), esperava-se maior quantidade de folículos maiores que 8mm. Neste experimento, ficou claro, de acordo com a Tabela 3, que o protocolo split não foi eficiente em promover tal efeito quando

comparado ao tratamento convencional ( $P<0,05$ ). Esse resultado pode ser devido ao fato de que, do dia 6 para o dia 8 dos tratamentos, os folículos do protocolo de SOV convencional receberam doses de 50 e 25 UI de FSH/LH segregados pelos dias 6 e 7; porém, já o SOV do grupo split recebeu 62,5 UI de FSH/LH numa única aplicação via SC apenas no dia 6.

Notou-se, portanto, que essa dose única de 62,5 UI de FSH/LH no D6, mesmo por via SC, em que a absorção do medicamento (FSH/LH) é mais lenta que pela via IM, não foi suficiente em promover o desenvolvimento final dos folículos em crescimento, resultados esses também derivados da meia vida do FSH que é pequena (aproximadamente cinco horas; Demoustier *et al.*, 1988).

A diferença em relação aos resultados apresentados por Alvarez *et al.* (2010), que demonstraram boa eficiência dos protocolos Split, pode ser devido a algumas variáveis relacionadas à resposta superovulatória em bovinos, que são distintas nos dois estudos. Dentre estas, pode-se ressaltar a raça das doadoras, que, no presente estudo, eram zebuínas e, nos estudos de Alvarez, eram taurinas. De fato, conforme indicado por Fernandes (1994), é complexo comparar resultados de superovulação em estudos realizados em situações de manejo, animais e épocas distintas.

Dessa maneira, supõe-se que uma administração adicional de FSH/LH no D7 pode ser utilizada para que haja a efetividade do tratamento de SOV no grupo split. E, por consequência, poderia melhorar esses resultados do número de CLs encontrados no dia da colheita dos embriões (Tab. 3). Para tal questão, um delineamento nessa condição seria sugerido para experimentos futuros.

Tabela 3. Média no número de folículos mensurados no meio (D6) e no final (D8) da superovulação das 16 fêmeas bovinas submetidas aos dois grupos experimentais de superovulação (convencional e split)

Tratamento	N	Meio SOV D6	Meio SOV D6	Meio SOV D6	Final SOV D8	Final SOV D8	Final SOV D8
		Fols até 3mm	Fols entre 3 a 8mm	Fols > 8mm	Fols até 3mm*	Fols entre 3 a 8mm	Fols > 8mm*
Convencional	16	3,12±1,86	8,25±3,84	4,44±2,58	2,19±1,22	3,62±2,093	9,06±4,54
Split	16	3,62±2,80	7,25±3,43	4,19±3,08	4,06±2,59	4,56±2,13	5,50±4,59
Total	32	3,37±2,35	7,75±3,62	4,31±2,80	3,12±2,20	4,09±2,13	7,28±4,84

\*: Dados na mesma coluna diferem pelo teste T de Student ( $P<0,05$ ).

No dia da colheita de embriões (D15; Tab. 4), houve diferenças entre o grupo convencional e o split ( $P<0,05$ ) para o número de folículos maiores que 8mm de diâmetro. Isto é, no D15, o grupo split ainda mantinha maior número de folículos superiores a 8mm de diâmetro, uma vez que poucos folículos conseguiram atingir diâmetro ideal para serem ovulatórios (11-13mm de diâmetro para fêmeas zebuínas, segundo Borges *et al.*, 2003), demonstrando que houve ausência de crescimento folicular final, o que se sugeriu ser devido à falta da administração de FSH no D7.

O número de corpos lúteos formados foi maior ( $P<0,05$ ) no grupo convencional ( $8,12\pm 3,26$ ) que no grupo split ( $4,69\pm 3,46$ ), sendo justificado, portanto, que no grupo convencional houve um maior número de ovulações que no grupo split, como já discutido anteriormente. Além disso, o número total de embriões e embriões viáveis foi superior ( $P<0,05$ ) no grupo convencional ( $6,69\pm 3,05$ ;  $5,25\pm 2,29$ , respectivamente) que no grupo split ( $3,37\pm 2,50$ ;  $2,37\pm 1,78$ , respectivamente), também refletindo o resultado do número final de CLs.

Tabela 4. Média no número de folículos mensurados no dia da colheita de embriões (D15), média dos corpos lúteos formados, média do número de embriões e média dos embriões viáveis das 16 fêmeas bovinas submetidas aos dois grupos experimentais (convencional e split)

Tratamento	N	Colheita de embriões D15					Total Embriões*	Embriões Viáveis*
		Fols até 3mm	Fols entre 3 a 8mm	Fols >8mm*	CLs*			
Convencional	16	1,94±0,77	1,37±0,50	0,81±0,98	8,12±3,26	6,69±3,05	5,25±2,29	
Split	16	2,31±1,81	1,37±1,36	1,81±0,83	4,69±3,46	3,37±2,50	2,37±1,78	
Total	32	2,125±1,38	1,375±1,01	1,31±1,03	6,45±3,74	5,03±3,22	3,81±2,49	

\*: Dados na mesma coluna diferem pelo teste T de Student ( $P<0,05$ ).

## CONCLUSÃO

Conclui-se que o protocolo split de superovulação tem pior resposta superovulatória e de produção *in vivo* de embriões em vacas zebuínas quando comparado ao protocolo convencional.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos órgãos FAPEMIG, CAPES e CNPq pelo apoio concedido.

## REFERÊNCIAS

ALVAREZ, R.H.; MARTINEZ, A.C.; PIRES, R.M.L. Superovulatory Response of Zebu Cows Treated with pFSH in a Single Subcutaneous Injection Followed by an Additional Intramuscular Sub-Dose 48h Later. *Reprod. Dom. Anim.*, v.45, p.42-44, 2010.

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, 1995.

BÓ, G.A.; TRIBULO, A.; RAMOS, M. *et al.* Simplification of superovulation protocols in cattle. *Acta Scien. Vet.*, v.38, p.277-315, 2010.

BORGES, A.M.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M. *et al.* Características da dinâmica folicular e regressão luteal de vacas das raças Gir e Nelore após tratamento com cloprostenol sódico. *R. Bras. Zootec.*, v.32, p.85-92, 2003.

BURATINI Jr., J. Avanços na superovulação proporcionados pela crescente compreensão da fisiologia ovariana. *Reprodução em dia*, v.15, p.3-5, 1997.

DEMOUSTIER, J.M.; BECKERS, J.F.; VAN DER ZWALMEN, P. *et al.* Determination of porcine plasma Folltropin-V levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology*, v.30, p.379-386, 1988.

FERNANDES, C.A.C. *Efeito do Tratamento com FSH Sobre a Taxa de Gestação de Novilhas Mestiças Usadas Como Receptoras de Embrião*. 1994. 64f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

*Redução da resposta...*

FERREIRA, A.M. *Efeito da amamentação e do nível nutricional na atividade ovariana de vacas mestiças leiteiras*. 1990. 134f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

GINTHER, O.J.; KOT, K; KULIC, L.J. *et al.* Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology*, v.48, p.75-87, 1997.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEREDO, J.R.; FREITAS, V.J. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. São Paulo: ROCA, 2008. 408p.

KASTELIC, J.P.; MCARTNEY, D.H.; OLSON, W.O. *et al.* Estrus synchronization in cattle using estradiol, melengestrol acetato and PGF. *Theriogenology*. v.46, p.295-304. 1996.

KELLY, P.; DUFFY, P.; ROCHE, J.F. *et al.* Superovulation in cattle: effect. of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Anim. Reprod. Sci.*, v.46, p.1-14, 1997.

LINDNER, G.M.; WRIGHT, R.W. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, v.20, p.407-16, 1983.

RIBEIRO JÚNIOR, J.I. *Análises Estatísticas no SAEG*. Viçosa: UFV, 2001. 301p.