

# **SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA EM VACAS DA RAÇA GIR LEITEIRO COM USO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FSH**

*(OVARIAN SUPERSTIMULATION IN GIR LEITEIRO COWS WITH DIFFERENT CONCENTRATIONS OF FSH)*

*(SUPERESTIMULACIÓN OVARIANA EN VACAS DE LA RAZA GIR LECHERO CON EL USO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FSH)*

**F. R. A. PRADO<sup>1</sup>, G. H. TONIOLLO<sup>2</sup>, J. A. OLIVEIRA<sup>3</sup>**

## **RESUMO**

As vacas foram distribuídas em três grupos de forma aleatória, onde A (n=19), B (n=19) e C (n=19). As doadoras do grupo A foram superovuladas com 300UI de FSH, o grupo B com 400UI de FSH e o grupo C com 500UI de FSH. Para análise estatística do potencial de resposta aos protocolos de superovulação, as proporções de embriões viáveis entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), adotando os níveis de significância de 5% e 1%. Com o nível de significância de 1% nos tratamentos 300 e 400 UI foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas proporções de embriões viáveis. Com o nível de significância de 5% entre os tratamentos 300 (33/95) e 500 (33/56) UI houve diferenças e no tratamento com 400 (65/106) e 500 (33/56) UI não houve diferenças. O tratamento utilizando 400 UI de FSH apresentou maior número de embriões viáveis.

PALAVRAS-CHAVE: Gir. Superovulação. Embrião.

## **SUMMARY**

The cows assigned to this study were randomly allocated in three groups, where A (n=19), B (n=19) and C (n=19). Superovulation was induced in the cows from group A with 300UI of FSH, whereas group B received 400UI of FSH, and group C 500UI of FSH. To analyze statistically the potential of reply to the superovulation protocols, the ratios of viable embryos between the treatments had been compared by the Qui-square test ( $\chi^2$ ), adopting the levels of significance of 5% and 1%. When the level of significance was set as 1%, differences in the ratios of viable embryos were seen in the treatments 300 and 400 UI. With the level of significance of 5% significant differences existed between the treatments 300 (33/95) and 500 (33/56) UI, whereas no differences existed in the treatment with 400 (65/106) and 500 (33/56) UI. The treatment using 400 UI of FSH presented greater number of viable embryos.

KEY-WORDS: Gir. Superovulation. Embryo.

---

1 Médico Veterinário, Doutorando em Reprodução Animal, Unesp - Jaboticabal. Email: fabricio.prado@posgrad.fcav.unesp.br

2 Médico Veterinário, Professor Titular, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Unesp - Jaboticabal.

3 Professor Titular, Departamento de Ciências Exatas, Unesp - Jaboticabal.

## RESUMEN

Las vacas fueron distribuidas en tres grupos de forma aleatoria, donde A (n=19), B (n=19) y C (n=19). Las donadoras del grupo A fueron superovuladas con 300UI de FSH, el grupo B con 400UI de FSH y el grupo C con 500UI de FSH. Para el análisis estadístico del potencial de respuesta a los protocolos de superovulación, las proporciones de embriones viables entre los tratamientos fueron comparadas con el teste de Qui-cuadrado ( $\chi^2$ ), adoptando niveles de significancia de 5% y 1%. Con el nivel de significancia de 1% en los tratamientos 300 y 400 UI fueron observadas diferencias estadísticamente significativas en las proporciones de embriones viables. Con el nivel de significancia de 5%, entre los tratamientos 300 (33/95) y 500 (33/56) UI hubo diferencias y en el tratamiento con 400 (65/106) y 500 (33/56) UI no hubo diferencias. El tratamiento utilizando 400 UI de FSH presentó mayor número de embriones viables.

PALABRAS-CLAVE: Gir. Superovulación. Embrión.

## INTRODUÇÃO

Os índices reprodutivos e produtivos da pecuária brasileira estão muito abaixo do desejável. Os aumentos na produção de leite nas últimas décadas foram, em parte, muito mais devidos à expansão das áreas exploradas e ao aumento do efetivo de rebanho que pelo aumento real da produtividade. Quanto mais maximizada for a produção, utilizando biotecnologias como inseminação artificial, sincronização estral, transferência de embriões e fecundação *in vitro*, tanto maior será a exigência de uma ótima eficiência reprodutiva (NEVES et al., 2002).

Segundo a revista ABCZ (2002), explicar o surgimento da raça Gir sugere, ao que tudo indica, a explicação do surgimento da espécie zebuína. A filogenia do Gir é uma incógnita, e sua morfologia, um arquivo para novas descobertas na zebuinoicultura. O Gir não foi o primeiro zebuino a chegar no Brasil, mas foi o primeiro do gênero *Bos Indicus* que trouxe fortuna para seus criadores. A raça Gir entrou oficialmente no Brasil, via importação direta da Índia, no ano de 1911. A raça concentrou-se, inicialmente, no Triângulo Mineiro, região que já era tradicional na criação de gado zebu, com foco nas raças Guzera e Nelore.

A raça Gir, por sua rusticidade e resistência ao estresse climático, teve seu desenvolvimento e multiplicação favorecidos nas condições bioclimáticas brasileiras, sendo utilizada para a produção de leite e carne (LEDIC, 1994), bem como serviu de base para cruzamentos visando à produção de genótipos leiteiros, por exemplo, o Girolando (MENEZES, 1999).

A utilização do FSH como agente indutor de superovulação tem sido extensivamente estudada, conseqüentemente, já foi testado o uso de diferentes concentrações (PAWLYSHYN et al., 1996, GONZALEZ et al., 1990, SAUNDERS et al., 1990) e vias de administração (HOCKLEY et al., 1992, TRIBULO et al., 1993), a eficiência de produtos comerciais das mais variadas marcas e procedências (DONALDSON, 1989, PAGE et al., 1989, DEL CAMPO et al., 1990, TRIBULO et al., 1993,

DONALDSON, 1995) e as variações na relação FSH:LH entre preparados comerciais (DONALDSON e WARD, 1987).

A utilização de fármacos na área reprodutiva, mais especificamente os hormônios, sofreu significados progressos na última década, de modo que, atualmente, eles são intensamente pesquisados. Mediante os fármacos é possível incrementar os índices reprodutivos dos rebanhos de corte e de leite, utilizando-se a hormonioterapia, tanto para o tratamento individual, caso das afecções ovarianas, quanto o de rebanhos, como, por exemplo, programas de inseminação artificial ou mesmo de superestimulação ovariana em animais de elevado valor genético e que, evidentemente, deve ser otimizado no seu aproveitamento (KOZICKI et al., 2005).

A principal meta do programa de transferência de embriões é a superovulação, obtendo-se o número alto e satisfatório de embriões viáveis por doadora, pelo aumento do número de oócitos liberados após administração de hormônios exógenos e posterior transferência dos embriões obtidos para o trato reprodutivo de receptoras para completarem a gestação (RUMPF et al., 2000).

Segundo Cupps (1991), a função ovariana nos bovinos tem início ainda no período fetal e estende-se após a puberdade, até idades que podem atingir 15 anos. Durante o desenvolvimento fetal, sob a influência dos hormônios maternos, os ovários do feto apresentam crescimento e atresia folicular. Do nascimento à puberdade, na ausência de função do hipotálamo e da hipófise, as gônadas femininas permanecem em repouso. Após a puberdade, quando o sistema nervoso central e a hipófise iniciam a liberação do GnRH e das gonadotrofinas (FSH e LH), respectivamente, os ovários passam a funcionar realizando um conjunto de atividades, as quais denominamos de ciclo ovariano. Nas diferentes fases do ciclo estral existem nos ovários um número de folículos entre 200 e 400 que se encontram em fase de crescimento; destes, 25 a 50 são folículos terciários, dos quais 1 será selecionado como folículo dominante, adquirindo características para realizar a maturação e a ovulação.

O acompanhamento diário das estruturas ovarianas por ultra-sonografia tem mostrado que os bovinos apresentam ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral. Vacas e novilhas podem ter duas ou três ondas por ciclo, com um folículo tornando-se dominante em cada uma delas. Por isso, uma população de pequenos, médios e grandes folículos é encontrada em cada ovário, durante todos os dias do ciclo estral (BORGES et al., 2001).

A importância básica da transferência de embriões para a produção animal consiste na possibilidade de uma fêmea produzir um número de descendentes muito superiores ao que seria possível obter fisiologicamente durante sua vida reprodutiva (REICHENBACH et al., 2002).

O controle farmacológico do ciclo estral e da ovulação de vacas zebuínas (*Bos taurus indicus*) depende primeiramente do entendimento do comportamento fisiológico reprodutivo da vaca, o qual está ligado diretamente com o seu estado nutricional e condição reprodutiva. Nesse mesmo sentido, as interações e funções de hormônios aplicados para esse fim requerem compreensão e análise do seu funcionamento fisiológico (FONSECA et al., 2001).

Para o melhoramento zootécnico, a técnica de transferência de embriões é um importante instrumento porque acelera e confere maior precisão no processo de seleção animal (REICHENBACH et al., 2002).

O objetivo deste estudo foi avaliar o número de ovócitos, embriões totais, degenerados e viáveis com o intuito de conhecer qual o melhor programa de superovulação para vacas da raça Gir, após aplicação de protocolos hormonais distintos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local

Os animais encontravam-se no município de Bauru, na região centro-oeste do estado de São Paulo. O período de execução do experimento foi ao longo dos meses de março de 2005 a março de 2006.

### Animais e nutrição

Neste experimento foram avaliadas cinquenta e sete vacas da raça Gir Leiteiro PO, não lactantes, de 4 a 7 anos, com escore de 3,5 a 4,0 numa escala de cinco pontos. Os animais, durante o período do experimento foram mantidos em regime de pasto, em piquetes de capim Braquiária (*Braquiaria decumbes*), recebendo água e sal mineral *ad libidum*.

### Tratamentos

As doadoras foram submetidas a controle de dois ciclos estrais consecutivos antes do início do experimento e posteriormente distribuídos em três grupos (A, B e C) de forma aleatória, com 19 animais em cada um. As doadoras do grupo A foram superovuladas com 300UI de FSH, as do

grupo B com 400UI de FSH e as do grupo C com 500UI de FSH. O programa de superovulação foi iniciado em fase aleatória do ciclo estral dos animais (Tabela 1).

No protocolo hormonal foram utilizados dispositivos intravaginais contendo progesterona e administrado, via intramuscular, 2,5 mg de benzoato de estradiol. Cinco dias mais tarde, no início de uma nova onda folicular, iniciou-se o tratamento superestimulatório, com diferentes concentrações de FSH (quatro dias consecutivos, com doses decrescentes administradas duas vezes ao dia, com aplicação intramuscular). Juntamente com a última aplicação do hormônio, administrou-se dose luteolítica de PGF<sub>2</sub>α, via intramuscular e doze horas após foi retirado o dispositivo intravaginal. Os animais superovulados receberam uma dose de 50 µg de GnRH, via intramuscular, doze horas após a retirada do dispositivo intravaginal. As doadoras foram inseminadas doze horas após a aplicação de GnRH com duas doses de sêmen, em intervalos de doze horas. Foram utilizadas doses de sêmen congeladas do mesmo touro e da mesma partida para os três grupos.

A colheita dos embriões foi realizada por um mesmo médico veterinário nos três grupos pelo método não-cirúrgico, no dia 7,0 após a primeira inseminação artificial, com o cateter de Foley 20 Fr/ch, fixado no corpo do útero para lavagem simultânea dos dois cornos uterinos, utilizando-se 1000 ml de Dmpbs<sup>4</sup> por doadora. Após a colheita, as estruturas foram classificadas no laboratório como viáveis, degeneradas ou ovócitos.

Para análise estatística do potencial de desenvolvimento dos protocolos de superovulação, a proporção de embriões viáveis entre os tratamentos foi comparada pelo teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), adotando os níveis de significância de 5% e 1%.

**TABELA 1** - Protocolo hormonal utilizado na superovulação das vacas Gir.

DIA	0	5	6	7	8	9	10
MANHÃ	P4 + E2 ↓CIDR	FSH	FSH	FSH	FSH	↑CIDR	IA
TARDE		FSH	FSH	FSH	FSH PGF <sub>2</sub> α	GnRH	IA

↓ Inserção do CIDR; ↑ Retirada do CIDR

4 Tampão Fosfato Salino, laboratório NUTRICELL

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

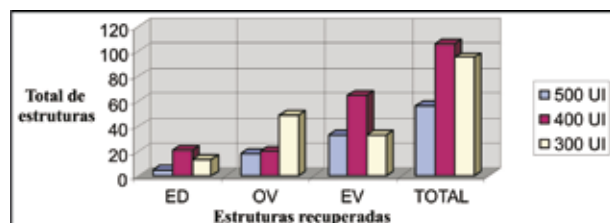
No tratamento com 300 UI de FSH obtiveram-se treze embriões degenerados, quarenta e nove ovócitos e trinta e três embriões viáveis, totalizando 95 estruturas recuperadas. No tratamento com 400 UI de FSH obtiveram-se vinte e um embriões degenerados, vinte ovócitos e sessenta e cinco embriões viáveis, totalizando cento e seis estruturas recuperadas. No tratamento utilizando 500 UI de FSH obtiveram-se cinco embriões degenerados, dezoito ovócitos e trinta e três embriões viáveis, totalizando cinquenta e seis estruturas recuperadas (Tabela 2).

**TABELA 2** - Resultados encontrados após a colheita de embriões nas doadoras bovinas da raça Gir

TRATAMENTO (UI)	ED	OV	EV	TOTAL
500	5	18	33	56
400	21	20	65	106
300	13	49	33	95
TOTAL	39	87	131	257

ED: Embriões degenerados; OV: Ovócitos; EV: Embriões viáveis.

A variação individual e o tipo de hormônio são fatores importantes que interferem na resposta superovulatória. De acordo com Monniaux et al. (1983), o estado ovariano no momento do tratamento parece ser fator determinante na resposta superovulatória, sendo uma característica constantemente pesquisada para elevar o índice de recuperação de embriões viáveis. Moor et al. (1984) relatam a existência de outros componentes da dinâmica folicular, como o tamanho, a distribuição e as condições dos folículos antrais que podem afetar a resposta ovulatória frente ao tratamento hormonal. Ainda salientam que, apesar das melhorias nas técnicas de transferência de embriões, o problema maior continua sendo a baixa taxa de recuperação de embriões viáveis, podendo ser devido à variação individual frente ao estímulo superovulatório.



**Figura 1** - Proporções de estruturas recuperadas nas doadoras da raça Gir.

Os resultados encontrados foram analisados pelo teste de Qui-Quadrado ( $X^2$ ), com nível de significância de 1% nos tratamentos 300 e 400 UI onde se observaram diferenças estatisticamente significativas nas proporções de embriões viáveis. Com o nível de significância de 5% entre os tratamentos 300 (33/95) e 500 (33/56) UI houve diferenças estatísticas significativas e no tratamento com 400 (65/106) e 500 (33/56) UI não houve diferenças estatísticas (Figura 1).

Prado e Toniollo (2006) superovularam 67 vacas da raça Gir leiteiro com 300, 400 ou 500 UI de FSH/LH, administradas em 8 subdoses decrescentes, com início em fase aleatória do ciclo estral, durante 4 dias consecutivos, com intervalo de 12 horas (Tabela 3). A colheita de embriões foi realizada pelo método não-cirúrgico sete dias após a primeira inseminação artificial. Das variáveis analisadas apenas o tratamento com 400 UI de FSH/LH influenciou a recuperação de embriões viáveis, sendo de 2,92. Nas vacas que receberam 300 UI e 500 UI a taxa de recuperação de embriões viáveis foi de 1,44 e 1,63, respectivamente, não apresentando diferença estatística ( $P > 0,05$ ).

**TABELA 3** - Protocolo de superovulação em vacas da raça Gir.

DIA	0	4	5	6	7	8	9
MA-NHÃ	E2 ↓CIDR	FSH	FSH	FSH	FSH PGF <sub>2</sub> α	CIO ↑CIDR	IA
TAR-DE		FSH	FSH	FSH	FSH PGF <sub>2</sub> α	GnRH	IA

↓ Inserção do CIDR; ↑ Retirada do CIDR

Os resultados encontrados condizem com os resultados encontrados por Prado e Toniollo (2006) dentro da raça Gir, mas diferentes dos resultados encontrados por Visintin et al. (1999) superovulando novilhas da raça Nelore com 300, 400 ou 500 UI de FSH/LH, onde a taxa de recuperação de embriões viáveis com 300 UI de FSH/LH foi compatível com a literatura, no entanto, 400 e 500 UI apresentaram baixos resultados. De acordo com Figueiredo et al. (1995), os animais da raça Nelore possuem ovários, folículos e corpos lúteos menores, o que pode estar relacionado à exigência de menor concentração de FSH para indução da superovulação, assim condiz com os resultados encontrados, pois o grupo com menor dose de FSH (300UI) apresentou maior número de embriões viáveis e de estruturas totais. Zanenga & Silva (1988) obtiveram média de estruturas e de embriões viáveis de 8,2 e 4,1, respectivamente, para fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*.

Donaldson et al. (1986), Gonzalez et al. (1990) e Mapletoft et al. (1992) demonstraram os efeitos negativos

de concentrações elevadas de LH na produção e na qualidade de embriões bovinos. Foi sugerido, pelos autores, que o nível máximo de contaminação com LH, numa preparação de FSH, deveria ser entre 15 a 20%.

Fonseca et al. (2001) superestimulou 26 doadoras das raças Nelore Padrão (16), Nelore Mocho (3), Gir Leiteiro (4), Brahman (2) e Guzerá (1) com 350 UI de FSH e o número de embriões viáveis colhidos em função da raça da doadora foi de: Nelore Padrão, 92 (68,2%), Nelore Mocho, 17 (12,6%), Gir Leiteiro 15 (11,1%), Brahman, 7 (5,2%) e Guzerá, 4 (3,0%). A média geral desse experimento foi de 5,2 (135/26) embriões viáveis por doadora. Essa média assemelha-se a resultados obtidos por equipes de transferência de embriões e em estudos anteriores em taurinos (Callesen et al., 1995) que relataram uma média de quatro a cinco embriões viáveis por doadoras superovuladas. A média encontrada neste trabalho superovulando vacas da raça Gir Leiteiro com os tratamentos de 500, 400 e 300 UI foram inferiores aos encontrados por Fonseca et al. (2001) dentro da raça Gir, sendo respectivamente de 1,7, 3,4 e 1,7, onde a média geral foi de 2,29 embriões viáveis por doadora.

Fonseca et al. (2001) avaliaram a resposta superovulatória de novilhas da raça Nelore tratadas com 250 ou 500 UI de FSH e concluíram que o tratamento com 250 UI de FSH foi tão eficaz quanto o tratamento com 500 UI de FSH para superestimular novilhas da raça Nelore, diferente dos resultados encontrados neste trabalho ao superestimular fêmeas da raça Gir Leiteiro com 300, 400 ou 500 UI de FSH, onde os tratamentos com 300 e 500 UI de FSH apresentaram diferenças estatísticas ao nível de significância de 5% e os tratamentos 300 e 400 UI apresentaram diferenças ao nível de significância de 1%.

Não há informações suficientes na literatura sobre o efeito de diferentes concentrações de FSH/LH em protocolos de superestimulação bovina dentro da raça Gir Leiteiro. Além disso, há escassez de trabalhos que avaliam efeito nutricional, dinâmica folicular e superovulação em bovinos da raça Gir Leiteiro.

O valor do investimento dentro de um programa de superovulação bovina é de aproximadamente \$ 550,00 (quinhentos e cinquenta dólares), incluindo neste valor o técnico, o hormônio, o sêmen e todo material empregado durante a colheita de embriões. Em relação a esses aspectos não se verificou, observando a literatura consultada, nenhuma consideração sobre o investimento.

## CONCLUSÃO

Os resultados encontrados no presente trabalho permitem concluir que o tratamento hormonal utilizando 400 UI de FSH apresentou maior número de embriões viáveis, porém com maior número de estruturas degeneradas.

Os tratamentos com 500 e 300 UI apresentaram números iguais de embriões viáveis, porém com a concentração 500 UI de FSH apresentou menor número de estruturas degeneradas e menor número de ovócitos e com 300 UI de FSH houve maior número de ovócitos.

Os protocolos hormonais utilizados para superovulação em bovinos ainda não são estáveis dentro de diferentes raças, idade e manejo das doadoras. Os protocolos devem ser adequados na sua individualidade para cada animal para obtenção de respostas cada vez melhores.

**ARTIGO RECEBIDO: Agosto/2006**  
**APROVADO: Outubro/2007**

## REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE ZEBU A raça Gir. **Revista ABCZ** n.8, p.30-35, 2002.

BORGES, A. M., TORRES, C. A. A., RUAS, J. R. M., ROCHA JÚNIOR, V. R., CARVALHO, G. R. Dinâmica folicular ovariana em novilhas mestiças Holandês-Zebu. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2001, v.53, n.5, p.595-604. ISSN 01102-0935.

CALLESEN, H., LOVENDAHL, P., BAK, A. et al. Factors affecting the developmental stage of embryos recovered on day 7 from superovulated dairy cattle. **Journal Animal Science**, v.73, p.1539-1543, 1995.

CUPPS, T. P. **Reproduction in Domestic Animals** 4<sup>th</sup>ed. Davis: Department of Animal Science, University of California, 1991.

DEL CAMPO, M. R., BECERRA, F., GONZALEZ, M., MURPHY, B. D., MAPLETOFT, R. J. Superovulation with three different comercial pituitary extracts in the cow. **Theriogenology**, p.33-208, 1990.

DONALDSON, L. E., WARD, D. N., GLENN, S. D. Use of porcine follicle stimulating hormone after chromatographic purification in superovulation of cattle. **Theriogenology**, p.747-757, 1986.

DONALDSON, L. E. Porcine, equine and ovine FSH in the superovulation of cattle. **Theriogenology**, p.31-183, 1989.

DONALDSON, L. E. A comparison of FSH products. In: INTERNATIONAL WORKSHOPS OF EMBRYO TRANSFER, BIOTECHNOLOGY AND ADVANCED TECHNOLOGIES, 1., 1995, Montevideo. **Anais...Montevideo: Universidad de la Republica**, 1995. p.01-08.

- FIGUEIREDO, R. A., BARROS, C. M., ROCHA, G. P., PAPA, F. O. Prevalência de duas ondas de crescimento foliular ovariano em vacas da raça Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.19, n.3-4, p.153-235, 1995.
- FONSECA, J. F., SILVA FILHO, J. M., PINTO NETO, A., PALHARES, M. S. Superovulated zebu cows embryonic developmental stages. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.6, p.671-676.
- GONZALEZ, A., LUSSIER, J. G., CARRUTHERS, T. D., MURPHY, B. D., MAPLETOFT, R. J. Superovulation of beef heifers with Folltropin-V: A new FSH preparation containing reduced LH activity. **Theriogenology**, p.33-519, 1990.
- HOCKLEY, D. K., BO, G. A., PALASZ, A. T., DEL CARMO, M. R., MAPLETOFT, R. J. Superovulation with a single subcutaneous injection of Folltropin in the cow: effect of dose and site of injection. **Theriogenology**, p.37-224, 1992.
- KOZICKI, L. E., SEGUI, M. S., FANTINI FILHO, J. C., PRADO, F. R. A., MATTÉ, F., GLASER JR., P., WEISS, R. R. A somatotrofina bovina (bst) e sua relação com o recrutamento foliular ovariano durante o ciclo estral de vacas. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n.1, p.35-44, 2005.
- LEDIC, I. L. Gir leiteiro. **Revista dos Criadores**. p.23-35, abril 1994.
- MAPLETOFT, R. J., NASSER, L. F., BO, G. A., DEL CAMPO, M. R. The effect of LH content in a porcine pituitary extract on superovulatory response to a single subcutaneous injection in beef heifers. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 12., 1992, The Hague. **Anais...De Hague: INCAR**, 1992. p.237-239.
- MENEZES, C. Feita para o trópico. **Revista Globo Rural**, n.159, p.44-49. 1999.
- MONNIAUX, D., CHUPIN, D., SAUMANDE, J. Superovulatory responses of cattle. **Theriogenology**, v.19, n.1, p.55-81, 1983.
- MOOR, R. M., KRUIP, T. A., GREEN, D. Intraovarian control of folliculogenesis: limit to superovulation? **Theriogenology**, v.21, n.1, p.103-116, 1984.
- NEVES, J. P., GONÇALVES, P. B. D., OLIVEIRA, J. F. C., MACIEL, M. N.. Eficiência Reprodutiva em Gado Leiteiro. In: GALINA, C., PIMENTEL, C. A., NEVES, J. P., MORAES, J. C. F., HENKES, L. E., GONÇALVES, P. B., WEINER, T. **Avanços na reprodução bovina**. Pelotas: Ed. Universitária, 2000. p.35-37.
- PAGE, R. D., JORDAN, J. E., JOHNSON, S. K. Superovulation of Holstein heifers under heat stress with FSH-P or Folltropin. **Theriogenology**, p.31-236, 1989.
- PAWLYSHYN, V., LINDSELL, C. E., BRAITHWAITE, M., MAPLETOFT, R. J. Superovulation of beef cows with FSH-P: A dose-response trial. **Theriogenology**, p.21-37.
- PRADO, F. R. A., TONIOLLO, G. H. SUPEROVULAÇÃO EM VACAS DA RAÇA GIR COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FSH/LH EM OITO SUBDOSSES **Net**. São Paulo, 2006. Radar técnico em reprodução. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br>> Acesso em: 01 mar. 2006.
- REICHENBACH, H. D., OLIVEIRA, M. A. L., LIMA, P. F., SANTOS FILHO, A. S., ANDRADE, J. C. O Transfêrência e criopreservação de embriões bovinos. In: Gonsalves, P.B.D.; Figueiredo, J.R.; Freitas, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**, São Paulo: Ed. Varela, 2002. p.153-160.
- RUMPF, R., BEM, D. E., PEIXER, M. A. S., SOUZA, R.V. **Manual de transferência e micromanipulação de embriões nas espécies bovina e eqüina**. Brasília: EMBRAPA – Recursos genéticos e biotecnologia, 2000. p.71-103.
- SAUNDERS, J., WILMOTT, N., PALASZ, A., MAPLETOFT, R. J. Dose titration of Folltropin in the cow. **Theriogenology**, p.33-319, 1990.
- TRIBULO, H., JOFRE, F., CARCEDO, J., ALONSO, A., TRIBULO, R., BO, G. A.. Superovulation in *Bos indicus* cattle with a single subcutaneous injection of commercial pituitary extrats. **Theriogenology**, p.39-331, 1993.
- VISINTIN, J. A., ARRUDA, R. P., MADUREIRA, E. H., MIZUTA, K., CELEGHINI, E. C. C., ASSUMPÇÃO, M. E. O. A., GUSMÕES, P. P. G., CANDINI, P. H. 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. Disponível em: World Wide Web: [http://www.scielo.br.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-5961999000500009&Ing=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br.php?script=sci_arttext&pid=S1413-5961999000500009&Ing=pt&nrm=iso). ISSN 1413-9596. Acessado em: 13nov.2004.
- ZANENGA, C. A., SILVA, A. Número de embriões viáveis obtidos em relação às superovulações consecutivas em *Bos indicus*. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, Universidade Federal de Santa Maria, v.18, supl.32, p.32, 1988.