

Braz. J. vet. Res. anim. Sci.,
São Paulo, v.31, n. 3/4, p.288-94, 1994.

EFEITOS DO HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH) E DA GONADOTROFINA DA MENOPAUSA HUMANA (hMG) COMO AGENTES SUPEROVULANTES EM TRATAMENTOS SUCESSIVOS DE VACAS DA RAÇA HOLANDESA, VARIEDADE PRETA E BRANCA, UTILIZADAS EM TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

EFFECT OF FOLLICLE STIMULATING HORMONE (FSH) AND HUMAN MENOPAUSAL GONADOTROPHIN (hMG) AS SUPEROVULATING AGENTS IN CONSECUTIVE TREATMENTS OF HOLSTEIN BLACK AND WHITE COWS USED IN EMBRYO TRANSFER

Paulo Garcez de OLIVEIRA¹; José Antonio VISINTIN²; Valquíria Hyppólito BARNABE³; Renato Campanarut BARNABE³

RESUMO

Para verificar o efeito superovulante de 38mg de FSH e de 2400 U.I. de hMG (1200 U.I. de FSH + 1200 U.I. de LH) em doses diárias decrescentes durante 4 dias consecutivos, a partir do 10^o dia do ciclo estral, foram utilizadas 10 vacas Holandêsas, variedade preta e branca. No 3^o dia após o início do tratamento, os animais receberam 500µg de Cloprostenol para sincronização do ciclo estral, sendo inseminados 12 e 24 horas após o início do cio. O processo de superovulação foi repetido por 5 vezes, com intervalo de 60 dias, empregando-se os mesmos animais e as mesmas doses hormonais para verificar as possíveis alterações das respostas superovulatórias. Realizaram-se as colheitas dos embriões no 7^o dia após o cio, através do método não cirúrgico, em sistema fechado e com o auxílio de catéter Neustadt Ad-Aisch. Utilizaram-se, para cada corno uterino, 500ml do meio de Dulbecco modificado (PBS), aquecidos a 37°C e enriquecidos com 1% de soro fetal bovino. O meio recuperado permaneceu em repouso por 30 minutos, sifonando-se o sobrenadante. Os 100ml restantes foram colocados em placas de Petri quadriculadas para localização das estruturas, empregando-se estereomicroscópio com aumentos de 10 e 40 vezes. Das 105 estruturas obtidas com FSH e 43 com hMG, 79 (75%) e 31 (72%) eram viáveis, sendo os embriões inovulados nos cornos uterinos ipsolaterais aos corpos lúteos através do método não cirúrgico. O diagnóstico de gestação foi realizado através de palpação retal, 45-60 dias após as transferências, obtendo-se taxas de 43% (34/79) para o FSH e 55% (17/31) para o hMG.

UNITERMOS: Superovulação; FSH; Embriões; Prenhez, diagnóstico; Bovinos, Raça Holandêsa; Vacas; Transferência de embriões

INTRODUÇÃO

A liberação de apenas um ou dois óvulos por ciclo estral nas espécies uníparas e o reduzido número de gestações devido ao longo período da prenhez, fazem com que uma fêmea produza poucos descendentes durante a sua vida. Isto pode ser aumentado, ao se permitir que este animal fique temporariamente prenhe, recolhendo-se os embriões nos estágios iniciais de desenvolvimento e transferindo-os para os tratos reprodutivos de outras fêmeas para completarem as gestações. Este processo pode ser, ainda, ampliado se a doadora for superovulada³⁵.

Os hormônios comumente utilizados para superovular fêmeas bovinas são: a gonadotrofina da égua prenhe-PMMSG¹⁵, o hormônio folículo estimulante-FSH¹² e a gonadotrofina da menopausa humana - hMG^{21,22}, com doses, esquemas de aplicações e resultados diferentes.

A primeira superovulação em bovinos foi feita com FSH de origem hipofisária, aplicado por via subcutânea, uma a duas vezes ao dia durante 5 dias².

O FSH tem sido intensamente utilizado para promover superovulações em bovinos leiteiros, geralmente em doses decrescentes por 4 ou 5 dias em concentrações que variam de 26 a 50mg^{4,5,6,7,11,12,13,16,17,18,19,23,24,25,26,30,34,36,37}, com a maioria dos trabalhos empregando 32mg.

O efeito da lactação sobre o tratamento superovulatório foi investigado, encontrando-se significativa diferença entre vacas lactantes ou não, em relação ao número de embriões transferíveis¹⁰. Por outro lado, a redução de duas aplicações diárias de FSH para uma ao dia ou uma a cada dois dias resultou em diminuição nas taxas de ovulações e, consequen-

1-Médico Veterinário

2-Professor Doutor - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

3-Professor Titular - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

temente, de embriões recuperados e embriões viáveis⁸.

Animais com baixas respostas superovulatórias foram classificados em dois grupos: os que apresentam menos de 200 folículos em crescimento por ovário no início do tratamento e aqueles com grande número de folículos normais em crescimento, porém manifestando alta taxa de atresia de folículos com diâmetro superior a 1,7mm²⁹.

Os efeitos da classificação morfológica dos embriões e da qualidade dos corpos lúteos das receptoras sobre os índices de gestação também foram estudados, concluindo-se que um rigoroso critério em tais avaliações é altamente benéfico¹.

A existência de diferenças entre a taxa de recuperação e o número de corpos lúteos estimados por palpação retal levou à recomendação de uma segunda colheita 24 horas após, corrigindo possíveis falhas técnicas e recuperando estruturas que se encontravam no oviduto durante a primeira colheita²⁰.

Semelhante ao FSH quanto aos esquemas para superovulação e quanto às dosagens, o hMG tem sido empregado isoladamente^{21,22,32,33} ou em comparação com o FSH^{3,9,27}.

Diante dos dados obtidos na literatura, objetivou-se neste trabalho comparar as respostas ovarianas e as taxas de gestações oriundas de vacas Holandesas, variedade preta e branca, quando submetidas a técnicas de superovulação com FSH ou hMG. Procurou-se, também, comparar as respostas superovulatórias entre cinco tratamentos consecutivos, em intervalos de 60 dias, com ambos os hormônios, empregando as mesmas doadoras e as mesmas dosagens.

MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi realizado na Fazenda Lagoa Bonita, de propriedade do Instituto Adventista de Ensino, localizada no Município de Artur Nogueira, Estado de São Paulo. Como doadoras foram utilizadas 10 vacas Holandesas variedade preta e branca e 110 novilhas mestiças como receptoras, idade variável de 30 a 110 meses, em bom estado de higiene e nutrição.

As doadoras foram separadas ao acaso em 2 grupos de 5, o primeiro recebendo 38mg de FSH* a partir do 10^o dia do ciclo, divididos em 8 doses decrescentes por via intramuscular a intervalos de 12 horas. Quarenta e oito horas após o início do tratamento, foram aplicados 500µg de cloprostenol** para indução de luteólise. O segundo grupo recebeu 16 ampolas de

hMG*** (cada ampola contém 75 U.I. de FSH e 75 U.I. de LH), em idêntico esquema ao Grupo 1.

Os sintomas de cio foram observados 4 vezes ao dia a partir da 30^a hora da aplicação da prostaglandina e as inseminações artificiais praticadas 12 e 24 horas após o início do cio, utilizando-se sêmen envasado em palhetas de 0,25ml, desgelado a 37°C durante 20 segundos²⁸.

A reação ovariana das doadoras foi avaliada por palpação retal contando corpos lúteos e folículos. Em seguida, procedeu-se à higienização da região perineal e à anestesia epidural com 5ml de cloridrato de xilocaína**** a 2% sem vaso constritor. As colheitas de embriões foram feitas por método não cirúrgico, 7 dias após o cio, através de catéter modelo Neustadt Ad-Aisch³¹. A lavagem uterina foi feita com 500ml do meio de Dulbecco modificado (PBS)*****, aquecido a 37°C e enriquecido com 1% de soro fetal bovino (SFB)*****, em cada corno uterino. Após recuperação do meio em frascos de 500ml, deixou-se em repouso durante 30 minutos para decantação e, em seguida, o sobrenadante foi sifonado, mantendo-se 100ml transferidos para placas de Petri quadriculadas para localização de estruturas sob estereomicroscópio com aumento de 10 vezes. Com aumento de 40 vezes foi feita avaliação morfológica, selecionado-se embriões viáveis que foram envasados em palhetas de 0,25ml.

Para sincronização do ciclo estral, as receptoras receberam 500µg de cloprostenol, 6 horas após as doadoras, admitindo-se uma assincronia de mais ou menos 24 horas. Uma vez detectado o cio, as receptoras, sob anestesia epidural baixa, receberam os embriões por via cervical, na porção média do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo. O diagnóstico de gestação foi efetuado por palpação retal 45 a 60 dias após a inovação. Os resultados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey, calculando-se a diferença mínima significativa ao nível de 5%¹⁴.

RESULTADOS

A Tab. 1 mostra o número de corpos lúteos, estruturas e embriões transferidos de doadoras superovuladas com o hormônio folículo estimulante (FSH) e com a gonadotrofina da menopausa humana (hMG), bem como o número e porcentagem de gestações resultantes nas receptoras.

A Tab. 2 mostra as médias e os desvios padrões do número de corpos lúteos, de estruturas, de embriões recuperados, de embriões viáveis transferidos e de gestações, nos 5 tratamentos consecutivos com FSH e/ou hMG.

* - Folitropina Elea - Argentina
** - Ciosin - Coopers do Brasil
*** - Pergovet 500 - Sero do Brasil
**** - Anestésico Pearson
***** - Cultilab - Campinas

TABELA 1

Total de corpos lúteos, estruturas e embriões transferidos de animais superovulados, em 5 tratamentos consecutivos com FSH e hMG. Número e porcentagem de gestações em receptoras. São Paulo, 1992.

ANIMAIS (FSH)	C.L.	ESTRUTURAS			EMBRIÕES TRANSF.	GESTAÇÕES		
		Viáveis	Deg.	óvulos		Total	Nº	%
T	41	08	04	01	13	08	05	62,5
G	19	10	05	00	15	10	05	50,0
A	34	21	03	01	25	21	06	28,6
M	59	20	04	01	25	20	09	45,0
N	50	20	06	01	27	20	09	45,0
Total	203	79	22	04	105	79	34	43,0
(hMG)								
V	41	01	00	00	01	01	00	00,0
U	12	02	00	01	03	02	01	50,0
D	27	10	05	00	15	10	07	70,0
P	14	00	01	00	01	00	00	00,0
C	28	18	05	00	23	18	09	50,0
Total	122	31	11	01	43	31	17	54,8

C.L. = corpos lúteos

Deg. = degeneradas

Transf. = transferidos

DISCUSSÃO

A média de 8,1 corpos lúteos (Tab. 2) obtida com 38mg de FSH mostrou-se inferior à conseguida com 30mg⁹, 32mg^{7,30}, 40mg³⁷ e 50mg²⁶, equiparou-se com a obtida com 44mg²⁵ e 50mg¹¹, mas foi superior às alcançadas com 40mg⁴ e também com vacas não lactantes e em diferentes estágios de lactação¹⁰.

No caso do hMG, que tem-se mostrado equivalente ao FSH⁹, a média de 4,9 corpos lúteos (Tab. 2) obtida com 2.400U.I., foi inferior aos resultados de trabalhos que empregaram 1.050 U.I.^{9,22,27,32,33}, 1.350 e 2.100 U.I.²¹ e 1.425 U.I.³. Já com o emprego de 900 U.I.³² de hMG, foram obtidos em média 3,8 corpos lúteos.

Ao comparar as médias totais de corpos lúteos entre o FSH e o hMG, a diferença significativa ($p < 0,05$) foi favorável ao FSH, assim como entre os tratamentos 2 e 4, com FSH, enquanto com hMG não ocorreu diferença entre os tratamentos de 1 a 5 (Tab. 2).

Dos 8,1 corpos lúteos obtidos com 38mg de FSH, foram recuperadas, em média, 4,2 estruturas (Tab. 2), o que corresponde a uma taxa de recuperação de 51,9% em relação

ao número de corpos lúteos. Na literatura disponível encontram-se resultados superiores a 4,8³⁷, 5,3⁵ e 5,68 estruturas³ com o emprego de 40mg; 6,4 estruturas com a utilização de 50mg¹¹; 6,9¹² e 5,5³⁴ com 32mg; 9,6 com doses de 26 a 50mg²³ e 10,6 e 6,1 estruturas, respectivamente, com a administração de 26 a 50mg¹⁸.

Por outro lado, os resultados aqui apresentados foram superiores a 3,5 e 4 estruturas obtidas com FSH nacional ou importado²⁵ e as 2,4 registradas por LANDSVERK et al.²⁰ (1991), segundo os quais, não raramente, colhem-se menos estruturas que as esperadas em relação ao número de corpos lúteos estimados por palpação retal e recomendam, nesses casos, uma segunda colheita, 24 horas mais tarde. Esta recomendação poderia ser aplicada a duas vacas (T e M) do experimento com FSH: em 2 tratamentos (1º e 5º) o animal T apresentou cio e reação ovariana, porém, após a lavagem dos cornos uterinos, não foi possível recuperar nenhuma estrutura; o animal M, em 2 tratamentos (2º e 4º) apresentou cio e reação ovariana e, ao serem realizadas as colheitas, o resultado foi negativo. Efetuou-se então uma segunda colheita nesses animais (mais ou menos 12 horas após a primeira), recuperando-se, respectivamente, 2 e 4 blastocistos no 1º e 4º tratamentos.

TABELA 2

Médias e desvios padrões do número de corpos lúteos, de estruturas, de embriões recuperados, de embriões viáveis transferidos e de gestações, nos 5 tratamentos consecutivos com FSH e hMG. São Paulo, 1992.

HORMÔNIOS	TRATAMENTOS					
	T1	T2	T3	T4	T5	TOTAL
(CORPOS LÚTEOS)						
FSH	9,4 ± 3,3	11,2 ± 5,1 (a-1)	7,0 ± 4,5	5,2 ± 5,4 (2)	7,6 ± 2,5(a)	8,1 ± 4,1(a)
hMG	7,2 ± 5,0	6,6 ± 4,4 (b)	4,8 ± 1,3	2,6 ± 2,5	3,2 ± 4,4(b)	4,9 ± 3,9(b)
(ESTRUTURAS)						
FSH	3,8 ± 4,3	7,0 ± 8,4(a)	3,0 ± 2,2	4,0 ± 3,6 (a)	3,2 ± 2,3	4,2 ± 4,6(a)
hMG	2,6 ± 2,5	3,0 ± 4,1(b)	1,6 ± 1,8	0,2 ± 0,4 (b)	1,2 ± 2,6	1,7 ± 2,6(b)
(EMBR.RECUP.)						
FSH	3,6 ± 4,1	6,8 ± 8,0(a)	2,8 ± 2,3	3,8 ± 3,4 (a)	3,2 ± 2,3	4,0 ± 3,8(a)
hMG	2,4 ± 2,5	3,0 ± 4,1(b)	1,6 ± 1,8	0,2 ± 0,4 (b)	1,2 ± 2,6	1,7 ± 2,3(b)
(EMBR.VIAV.TRANSF.)						
FSH	3,0 ± 4,2	5,4 ± 7,1(a)	1,8 ± 1,7	2,6 ± 2,4	3,0 ± 2,1	3,2 ± 4,4(a)
hMG	1,8 ± 2,0	2,2 ± 3,0(b)	1,2 ± 1,6	0,2 ± 0,4	0,8 ± 1,7	1,2 ± 1,8(b)
GESTAÇÕES						
FSH	1,2 ± 1,6	1,8 ± 1,6	0,2 ± 0,4	1,8 ± 1,8	1,8 ± 1,3	1,4 ± 1,5
hMG	1,0 ± 1,0	1,4 ± 1,9	0,6 ± 0,9	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,9	0,7 ± 1,4

a, b = letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si estatisticamente ($p < 0,05$).

1, 2 = números diferentes, na mesma linha, diferem entre si estatisticamente ($p < 0,05$).

Dos 4,9 corpos lúteos obtidos com 2.400 U.I. de hMG, foram recuperadas 1,7 estruturas por tratamento (Tab. 2). Esta baixa taxa de recuperação (34,6%) tem explicação em 3 doadoras (V, U e P) que representam 60% dos animais do grupo e que contribuíram com apenas 5 estruturas de um total de 67 corpos lúteos, em 15 tratamentos superovulatórios (Tab. 1). Neste particular, pode-se questionar a técnica de palpação retal para avaliar a resposta ovulatória das doadoras²⁹ e reforçar a recomendação de uma segunda lavagem 24 horas após a primeira²⁰, já que foram observadas estruturas no oviduto aos 7 dias após a inseminação artificial, às vezes não fertilizadas²⁷.

A média das estruturas obtidas com hMG (1,7) iguala-se a 1,9 relatada em vacas Holandêsas superovuladas com 900 U.I.³², porém é sensivelmente inferior a de 6,8 obtida por CRISTER et al.⁹, de 9,0 e 7,0 registradas por LAURIA et al.²² (1982) em novilhas e vacas, de 14,3 relatada por MCGOWAN et al.²⁷ (1985) e de 7,0, 4,6 e 6,0, respectivamente, observadas por NOVAES et al.³³ (1991) em bezerras recém púberes, novilhas sexualmente maduras e vacas primíparas.

As médias totais de estruturas foram significativamente favoráveis ao FSH (Tab. 2), assim como no tocante aos tratamentos 2 e 4. Entre os 5 tratamentos consecutivos não ocorreu diferença significativa, tanto com FSH quanto com hMG.

Neste experimento, foram obtidos 4,0 embriões recuperados em média, nos 25 tratamentos superovulatórios com FSH, resultado inferior aos citados na literatura de 6,5¹⁸, 6,7²⁶, 8,0¹⁶, 14,2³⁴, 17,0²⁴, 10,9 e 13,4⁸, porém próximo a 4,1 e a 3,8, relatados por outros autores^{4,6}. A variação na proporção FSH/LH de 0,2/1 parece ser uma das causas das grandes variações nas respostas superovulatórias²⁴. Mesmo assim, o resultado superou os 2,8³⁷ embriões de novilhas e 3,4¹⁰ de vacas em diferentes estágios de lactação.

Com hMG foram obtidos 1,7 embriões recuperados, em média, comparável aos 1,9³², porém inferior a 5,8, 7,0, 8,0 e 11,1 obtidos respectivamente por diferentes autores^{9,21,22,27}. Um dos fatores que pode ser responsável pelo reduzido número de embriões recuperados, apesar de uma avaliação ovariana satisfatória, é a semelhança existente entre os corpos lúteos e os folículos luteinizados²⁹. As médias totais, assim como nos tratamentos 2 e 4, foram significativamente superiores nos animais tratados com FSH. Entre os tratamentos de 1 a 5 não ocorreu diferença significativa com o FSH nem com o hMG (Tab. 2).

Pode-se observar, na literatura consultada, ampla variação no número de embriões transferíveis, mesmo em experimentos em que se empregaram produto, dose e raça iguais. A

média de 3,2 embriões viáveis transferidos (Tab. 2) no tratamento com FSH, aproxima-se dos 3,4 e dos 3,5 obtidos por vários autores^{10,11,19}, sendo ligeiramente superior aos 2,2, 2,3, 2,7, 2,8 e 2,9, citados por outros autores^{1,6,9,10,25}. Não obstante, ficou aquém das médias relatadas em outros experimentos: 4,3 e 5,5⁷, 4,4²⁹, 4,8¹⁶, 5,5, e 5,1⁸, 5,6²³, 6,4 e 6,5³⁰ e 7,2^{24,37}.

Os resultados com hMG foram, em média, 1,2 embriões viáveis transferidos (Tab. 2) superando os 1,1 de NOVAES et al.³² (1991), mas situando-se abaixo dos obtidos em outros experimentos: 2,7, 2,3 e 4,0³³, 2,9, 7,3 e 2,5²⁷, 3,0³², 5,2^{9,21}, 6,0 e 4,7²² e 7,3³.

Comparadas às médias totais de embriões viáveis transferidos, obtidas com os dois hormônios empregados, a diferença, também aqui, foi favorável ao FSH, assim como o foi em relação ao tratamento 2. Entre os tratamentos de 1 a 5, com ambos os hormônios, não houve diferença significativa (Tab. 2).

Dos 79 embriões viáveis obtidos com FSH foram conseguidas 34 gestações (Tab. 2), que correspondem a uma taxa de 43%. Embora existam inúmeras pesquisas analisando a resposta superovulatória do FSH ministrado em diferentes doses e esquemas, poucas relatam a taxa de prenhez: 49%¹², 50%¹¹, 50,7%¹, 68%¹⁸, 71,7%¹⁷, 72,5% e 77,2%²³.

Dos 31 embriões viáveis obtidos com hMG conseguiram-se 17 gestações (Tab. 1), correspondendo a uma taxa de 54,8%, situada entre os 50% e os 68% relatados por outros autores^{3,33}.

Embora a média de gestações obtida com o tratamento com FSH tenha sido o dobro da conseguida com hMG (1,4 e 0,7, respectivamente) a diferença não foi estatisticamente significativa, o mesmo ocorrendo entre os tratamentos de 1 a 5 (Tab. 2).

CONCLUSÕES

Analisando os resultados obtidos nas condições deste experimento, podemos concluir que:

1. as duas gonadotrofinas (FSH e hMG) provocaram o crescimento de múltiplos folículos, quando administradas em doses decrescentes durante 4 dias, iniciando-se os tratamentos no 10º dia do ciclo estral.
2. houve variação nas respostas superovulatórias entre os 5 tratamentos consecutivos. Entretanto, não foram obtidos subsídios técnico-científicos para explicar as oscilações nas respostas superovulatórias entre os 5 tratamentos consecutivos, tanto com o FSH quanto com o hMG,

empregando os mesmos animais.

3. a taxa de gestação nos animais tratados com FSH foi o

dobro em relação aos tratados com hMG, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa.

SUMMARY

Ten Holstein cows were used as embryo donors in an experiment to compare two superovulatory hormones: FSH (38mg) and hMG (2.400 U.I. = 1.200 U.I. FSH + 1.200 U.I. LH), in decreasing twice daily doses, for 4 days following day 10th of the estrous cycle. On 3rd day after treatments had started, prostaglandin F₂ alfa (500µg) was applied for synchronization of oestrus. A.I. was performed 12 and 24 hours after first signs of oestrus. Same procedure was repeated for 5 times, with 60 days interval, in the same cows, to verify possible changes in superovulatory response. Embryos were recovered by non surgical procedure on 7th day after oestrus, through a Neustadt Ad-Aisch catheter. Each uterine horn was washed with 500 ml of modified Dulbecco's medium plus 1% fetal bovine serum. Recovered medium was allowed to rest during half an hour, then supernatant was siphoned. Detailed examination of the embryos was performed in remaining 100 ml medium, with a stereomicroscope (10 to 40 x magnification). From 105 structures obtained with FSH and 43 obtained with hMG, 79 (75%) and 31 (72%) embryos were able, respectively, for transfer to uterine horn ipsilaterally to corpora lutea, also through non surgical procedure. Pregnancy diagnosis was performed by rectal palpation 45-60 days after embryo transfers. The pregnancy rates were 43% (34/79) for FSH treatment and 55% (17/31) for hMG treatment.

UNITERMS: Superovulation; FSH; Embryos; Pregnancy, diagnosis; Cows, holstein; Embryo transfer

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01-BASILE, J.R.; CHEBEL, R.J. Efeito do embrião e do corpo lúteo da receptora no índice de prenhez na raça holandêsa. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, p.39, 1989. Suplemento 1.
- 02-CASIDA, L.E.; MEYER, R.K.; MESHAN, W.H.; WISNICKY, W. Effects of pituitary gonadotrophins on the ovaries and the induction of superfecundity in cattle. *American Journal Veterinary Research*, v.4, p.76-94, 1943.
- 03-CHEBEL, R.J.; BASILE, J.R. Eficiência do Pergonal (hMG) na superovulação de vacas da raça holandêsa. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.12, p.115-9, 1988.
- 04-CHEBEL, R.J.; BASILE, J.R. Avaliação comparativa entre FSH-P e PMSG na superovulação de vacas da raça holandêsa. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, p.132-3, 1989. Suplemento 1.
- 05-CHEBEL, R.J.; COELHO, S.G.; OLIVEIRA, H.N. Desempenho de doadoras da raça holandêsa em um programa comercial de transferência de embriões. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, p.133-4, 1989. Suplemento 1.
- 06-CHUPIN, D.; COMBARNOUS, Y.; PROCUREUR, R. Different effect of LH on FSH induced superovulation in two breeds of cattle. *Theriogenology*, v.23, p.184, 1985.
- 07-CHUPIN, D.; PROCUREUR, R. Use of pituitary FSH to induce superovulation in cattle: effect of injection regimen. *Theriogenology*, v.17, p.81, 1982.
- 08-CHUPIN, D.; PROCUREUR, R. Efficiency of pituitary extracts (FSH) for induction of superovulation in cattle. *Animal Reproduction Science*, v.6, p.11-23, 1983.
- 09-CRISTER, E.S.; CRISTER, J.K.; WINCH, R.P.; ELTIS, C. Efficacy of pergonal as a superovulatory drug in cattle. *Theriogenology*, v.17, p.83, 1982.
- 10-DARROW, M.D.; LINDNER, G.M.; GOEMANN, G.G. Superovulation and fertility in lactating and dry dairy cows. *Theriogenology*, v.17, p.84, 1982.
- 11-DEL CAMPO, R.P. Current of bovine embryo transfer in Chile. *Theriogenology*, v.19, p.123, 1983.
- 12-ELSDEN, P.R.; HASLER, J.F.; SEIDEL Jr., G.E. Non-surgical recovery of bovine eggs. *Theriogenology*, v.6, p.523-33, 1976.
- 13-ELSDEN, P.R.; NELSON, L.D.; SEIDEL Jr., G.E. Superovulation in cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology*, v.9, p.17-26, 1978.
- 14-GOMES, F.P. *Curso de estatística experimental*. 6.ed. Piracicaba, ESALQ, 1976.
- 15-GORDON, I. Problem and prospects in cattle egg transfer. *Irish Veterinary Journal*, v.29, p.21-30, 1975.
- 16-HASLER, J.F.; BROKE, C.P.; McCAULEY, A.D. The relationship between age and response to superovulation in Holstein cows and heifers. *Theriogenology*, v.15, p.109, 1981.

- 17-HASLER, J.F.; McCAULEY, A.D.; LATHRAP, W.F.; FOOTE, R.H. Effect of donors-recipient interaction on pregnancy in large scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology*, v.27, p.139-68, 1987.
- 18-HASLER, J.F.; McCAULEY, A.D.; SCHERMERHORN, E.C.; FOOTE, R.H. Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology*, v.19, p.83-99, 1983.
- 19-HERRLER, A.; ELSAESSER, F.; PARVIZI, N.; NIELMAN, H. Superovulation of dairy cows with purified FSH supplemented with defined amounts of LH. *Theriogenology*, v.35, p.633-43, 1991.
- 20-LANDSVERK, K.; REFSDAL, A.O.; VATN, T. Results of non-surgical flushing of donor cows repeated after 24 hours. *Theriogenology*, v.35, p.229, 1991.
- 21-LAURIA, A.; GENAZZANI, A.R.; OLIVA, O.; INAVDI, P.; CREMONESI, F.; MONITTULA, C.; AURELI, G. Clinical and endocrinological investigations on superovulation induced in heifers by human menopausal gonadotrophin. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.66, p.219-25, 1982.
- 22-LAURIA, A.; OLIVA, O.; GENAZZANI, A.R.; CREMONESI, F. Improved method to induce superovulation in cattle using human menopausal gonadotrophin (hMG). *Theriogenology*, v.18, p.357-64, 1982.
- 23-LERNER, S.P.; THAYNE, W.V.; BAKER, R.D.; HENSCHEN, T.; MERREDITH, S.; INSKEEP, E.K.; DILEY, R.A.; LEWIS, P.E.; BUTCHER, R.L. Age dose of FSH and other factor affecting superovulation in Holstein cows. *Journal Animal Science*, v.63, p.176-83, 1986.
- 24-LINDESELL, C.E.; MURPHY, B.D.; MAPLETOFT, R.J. Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology*, v.26, p.209-19, 1986.
- 25-LISBOA, S.L.; RODRIGUES, J.L.; LOPES, R.F.F.; CHRISTMANN, L. Superovulação com FSH-P nacional e importado. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, p.138-9, 1989. Suplemento 1.
- 26-LUBBADEH, W.F.; GRAVES, C.N.; SPAHRS, S.L. Effect of repeated superovulation on ovulatory responses of dairy cows. *Journal Animal Science*, v.50, p.124-27, 1980.
- 27-McGOWAN, M.R.; BRAITWAITE, W.; JOCHLE, W.; MAPLETOFT, R.J. Superovulation of beef heifers with pergonal (hMG) a dose response trial. *Theriogenology*, v.24, p.173-83, 1985.
- 28-MIES FILHO, A. **Inseminação artificial**. 6.ed. Porto Alegre, Sulina, 1987.
- 29-MONNIAUX, D.; CHUPIN, A.; SAUMANDE, J. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*, v.19, p.55-79, 1983.
- 30-NELSON, L.D.; SEIDEL Jr., G.R.; ELSDEN, R.P.; BOWEN, R.A. Superovulation of cows using follicle stimulating hormone and PGF₂ alfa. *Theriogenology*, v.11, p.104, 1979.
- 31-NIBART, M.; BOUYSSOU, B. Transfert embryonaire. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, v.157, p.71-87, 1981.
- 32-NOVAES, A.S.; VALE FILHO, V.R.; CARVALHO, J.C.C. Comparação entre dois tratamentos com hMG para indução de superovulação em fêmeas bovinas holandesas P.B. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9., Belo Horizonte, 1991. *Anais*, v.2, p.285.
- 33-NOVAES, A.S.; VALE FILHO, V.R.; CARVALHO, J.C.C. Respostas superovulatórias em bezerras recém-púberes, novilhas sexualmente maduras e vacas primíparas da raça holandesa P.B. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9., Belo Horizonte, 1991. *Anais*, v.2, p.286.
- 34-RAJAMAHENDRAM, R.; CANSECO, R.S.; DENBOW, C.J.; GAZDAUSKASF, C.; VINSON, W.E. Effect of low dose of FSH given at the beginning of the oestrus cycle and subsequent superovulatory response in holstein cows. *Theriogenology*, v.28, p.59-65, 1987.
- 35-SUGIE, T. Successful transfer of a fertilized egg by non-surgical techniques. *Journal Reproduction and Fertility*, v.10, p.197-201, 1965.
- 36-TAHIRA, J.K.; LEME, M.C.J.; ZAMBRIM, A.L.M.; HACCKETT, A. Efeitos do pré-tratamento e doses de FSH na superovulação de vacas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9., Belo Horizonte, 1991. *Anais*, v.2, p.288.
- 37-TAKAHASHI, Y.; KANAGAWA, H. Induction of superovulation using several FSH regimens in Holstein-Friesian heifers. *Japanese Journal of Veterinary Research*, v.33, p.45-50, 1985.

Recebido para publicação em 04/02/93
Aprovado para publicação em 04/02/94