

USO DE LH OU eCG NO ÚLTIMO DIA DO PROTOCOLO SUPEROVULATÓRIO EM BOVINOS

USE OF LH OR ECG IN THE LAST DAY OF SUPEROVULATORY PROTOCOL IN CATTLE

Ronaldo Luiz Ereno¹; Ana Carolina Santos Oliveira²; Fernanda Souza Rosa³; Marcelo Fábio Gouveia Nogueira⁴; Ciro Moraes Barros¹

¹Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Unesp;

²Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade Integrado – Campo Mourão;

³Faculdade de Itapiranga;

⁴Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Unesp.

Resumo

Na última década, inúmeros protocolos para induzir ovulação múltipla e transferência de embriões foram desenvolvidos. A sincronização da ovulação permite a utilização da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em doadoras de embriões bovinos, facilitando o manejo destes animais. Embora os protocolos que utilizam a IATF tenham evoluído e produzam tantos embriões viáveis quanto os protocolos convencionais que necessitam da observação do estro, não se observou aumento significativo na produção de embriões provenientes de fêmeas bovinas superestimuladas. Esta revisão tem por objetivo dar ênfase aos protocolos superestimulatórios nos quais as últimas duas doses de pFSH são substituídas por eCG ou LH. Estudos recentes indicam que um estímulo extra de LH (por meio da aplicação de eCG ou LH), no último dia do tratamento superestimulatório, parece aumentar o número de embriões viáveis de raças zebuínas e taurinas.

Palavras chaves: transferência de embriões; superovulação; bovino; FSH; LH; eCG.

Abstract

In the last decades several hormonal treatments to induce multiple ovulation and embryo transfer (MOET) have been developed. Tight control of the time of ovulation allowed the use of fixed-time artificial insemination (FTAI) in bovine embryos donors, facilitating animal management. Although, protocols that allow FTAI have evolved and yield as much embryo as conventional protocols that requires estrus detection, substantial increase in viable embryo production has not been observed in superstimulated bovine cattle. The present review put emphasis on superstimulatory protocols in wich the last two doses of pFSH are replaced by eCG or LH. Recent results indicate that an extra LH stimulus (using eCG or LH), on the last day of P-36 superstimulatory treatment, seems to improve transferable embryo yield in both *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle.

Key words: superovulation; bovine; FSH; LH; eCG.

Recebido em: 12/05/2014.

Aceito em: 28/11/2014.

Introdução

As fêmeas bovinas têm sido alvo de numerosas pesquisas visando a otimização dos gametas. Gordon (2003) relata que bezerras ao nascimento possuem mais de 100.000 oócitos em seus ovários, que pelas vias naturais podem gerar 0,01% de produtos viáveis, totalizando por volta de dez descendentes durante a vida reprodutiva.

A fim de ampliar o aproveitamento dos gametas femininos, é necessário o uso de biotecnologias como a indução de múltipla ovulação e transferência de embriões e a produção in vitro de embriões (MERTON et al., 2007).

Vários protocolos para induzir múltiplas ovulações em bovinos têm sido desenvolvidos (BARUSELLI et al., 2006; BÓ et al., 2006; BARROS; NOGUEIRA, 2005). Dentre os hormônios

empregados nestes protocolos destacam-se a gonadotrofina coriônica equina (eCG) administrada isoladamente (BOLAND et al., 1978) ou em combinação com antissoros contra eCG (DIELEMAN et al., 1987), o hormônio folículo estimulante (FSH) de origem suína, ovina ou de extratos da pituitária equina (DONALDSON, 1989), ou ainda, o FSH recombinante bovino (LOONEY; BONDIOLI, 1988).

Existem relatos na literatura de que a presença de um folículo dominante no início do tratamento superestimulatório diminui a produção de embriões (LUSSIER et al., 1995; GUIBAULT et al., 1991). Entretanto, algumas estratégias são utilizadas para impedir os efeitos do folículo dominante durante o tratamento superestimulatório, tais como iniciar as administrações de FSH no primeiro dia do ciclo estral (ROBERTS et al., 1994; GOULDING et al., 1990), aspiração do folículo dominante ou de todos os folículos maiores que 5 mm de diâmetro (BODENSTEINER et al., 1996; BERGFELT; LIGHTFOOT; ADAMS., 1994) ou a sincronização da onda folicular utilizando progesterona e estradiol (BÓ et al., 2006; BÓ et al., 1995).

O uso de progesterona em associação com a administração intramuscular de estradiol promove a atresia dos folículos e induz o início de uma nova onda folicular aproximadamente 4 dias após o início do tratamento (BÓ; BARUSELLI; MARTINEZ, 2003; BÓ et al., 1995). A fim de evitar a presença do folículo dominante, o tratamento superestimulatório com FSH é administrado no início da onda folicular, isto é, 4 dias após a inserção do dispositivo intravaginal contendo progesterona e administração de estrógeno. Dois dias após o início da aplicação de FSH, é administrada também uma dose luteolítica de PGF₂α e 12 horas mais tarde a fonte de progesterona é removida. As doadoras de embrião são inseminadas 12 e 24 horas após a detecção do estro e após sete dias, os embriões são coletados, classificados, transferidos ou criopreservados. Este protocolo apresenta duas vantagens, pode ser iniciado em qualquer dia do

ciclo estral e dispensa a detecção do estro antes de iniciar o tratamento superestimulatório.

A detecção do estro ainda é necessária para realização da inseminação artificial das doadoras, pois não são utilizados indutores de ovulação. Suspeita-se que folículos que não ovularam após o tratamento superestimulatório com FSH, não se desenvolveram ou não possuem quantidades suficientes de receptores para LH (LHR) para responderem ao pico pré ovulatório de LH (D'OCCHIO et al., 1997; XU et al., 1995; LIU; SIROIS, 1998). Portanto, tem sido proposto que o adiamento no pico pré ovulatório de LH pode ser uma forma de aumentar a produção de embriões (VAN LEEMPUT et al., 2001; LIU; SIROIS, 1998; D'OCCHIO et al., 1997), além de permitir a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) das doadoras após o protocolo superestimulatório (BARROS et al., 2009; BARROS; NOGUEIRA, 2005; BARROS; NOGUEIRA, 2001).

Esta revisão tem por objetivo dar ênfase aos protocolos superestimulatórios nos quais as últimas duas doses de pFSH são substituídas por eCG ou LH.

Revisão Bibliográfica

Os protocolos superestimulatórios associados a IATF apresentam bons resultados para doadoras zebuínas (*Bos indicus*) (NOGUEIRA et al., 2002), entretanto, quando doadoras taurinas (*Bos taurus*) são submetidas aos mesmos tratamentos, o número de estruturas colhidas tem sido insatisfatório (BARUSELLI et al., 2006). Estes resultados podem ser atribuídos às particularidades fisiológicas que diferenciam vacas *Bos indicus* de *Bos taurus*. Dentre elas, o diâmetro folicular, sendo que fêmeas *Bos taurus* atingem a fase de desvio folicular com diâmetro superior ao de fêmeas *Bos indicus* (6,1 mm; SARTORELLI et al., 2005 para *Bos indicus* e 8,5 mm; GINTHER et al., 1996 para *Bos taurus*). Deste modo, supõe-se que os folículos de fêmeas taurinas, para atingirem capacidade ovulatória, necessitam alcançar diâmetros superiores aos de fêmeas zebuínas.



Barros et al. (2009) testaram em novilhas Nelore a eficácia de diferentes protocolos nos quais o tempo esperado para a ovulação foi atrasado em 6 ou 12 horas e a ovulação foi induzida pela administração de LH ou GnRH. Embora, estes protocolos não tenham aumentado significativamente a quantidade de embriões viáveis quando comparados a protocolos com detecção do estro, foi possível sincronizar o momento da ovulação por meio de protocolos hormonais, possibilitando o uso de IATF. A partir destes experimentos, um novo protocolo foi desenvolvido, denominado Protocolo P-36 (BARROS; NOGUEIRA, 2005), em que o dispositivo intravaginal liberador de progesterona foi retirado 36 horas após a administração da PGF2 α (motivo pelo qual o protocolo denomina-se P-36) e a ovulação foi induzida com LH exógeno, administrado 12 horas após a retirada do dispositivo intravaginal (isto é, 48 horas após a aplicação de PGF2 α). Visto que a ovulação ocorre entre 24 e 36 horas após a administração do LH (NOGUEIRA; BARROS et al., 2003) a IATF é realizada 12 e 24 horas após o LH, dispensando a necessidade de observação do estro. Nesses estudos, a manutenção do dispositivo de progesterona 24 ou 36 horas após a aplicação da PGF2 α , objetivou controlar de maneira mais precisa o pico pré-ovulatório de LH (endógeno) e viabilizar a IATF após a SOV (BARUSELLI et al., 2006; BARROS; NOGUEIRA, 2001).

A eficácia do protocolo P-36 tem sido confirmada (BARUSELLI et al., 2006; NOGUEIRA; BARROS et al., 2003), e recentemente Nogueira et al. (2007a) reportaram média de 9,4 \pm 0,63 embriões viáveis e taxa de viabilidade de 71% (1279/1807), em 136 coletas realizadas em vacas da raça Nelore. Estes resultados são semelhantes aos obtidos em protocolos em que a IA é realizada 12 e 24 horas após a detecção do estro (NOGUEIRA; BARROS, 2003; NOGUEIRA et al., 2002). O protocolo P-24 é uma variação do P-36, onde a fonte de progesterona é removida 24 horas depois da PGF2 α e o LH administrado 48

horas após a aplicação da PGF2 α . Os resultados relatados foram semelhantes aos obtidos com o protocolo P-36 (BARUSELLI et al., 2006; ZANENGA et al., 2003).

Normalmente as doadoras são inseminadas duas vezes, 12 e 24 horas após a administração de GnRH ou LH. No protocolo P-36 a IATF pode ser realizada com apenas uma dose de sêmen, sem redução significativa da produção de embriões, quando a IA é realizada, 16 horas após a administração de LH, (BARUSELLI et al., 2006).

Outra modificação no protocolo P-36 foi testada em vacas Bonsmara (BARCELOS et al., 2007) e Nelore (BARCELOS et al., 2006), onde as duas últimas administrações de FSH foram substituídas pela administração de eCG. Esperava-se com este protocolo, que a eCG, graças a sua capacidade de estimular tanto receptores de LH quanto de FSH (MURPHY; MARTINUK, 1991) induziria o crescimento dos folículos com diferentes diâmetros, de tal forma que os folículos adquirissem receptores de LH e, posteriormente, ovulariam em resposta ao LH exógeno. Vacas Nelore (n=20) foram separadas aleatoriamente em dois grupos, protocolo P-36 e P-36/eCG e cada animal recebeu os dois tratamentos alternadamente (delineamento "cross-over"). No protocolo P-36/eCG, as duas últimas administrações de FSH foram substituídas por duas administrações intramuscular (i.m.) de 200UI de eCG. O número de folículos > 6 mm no momento da administração do pLH (21,1 \pm 2,9 vs 15,3 \pm 2,1) e o número de estruturas totais recuperadas (10,0 \pm 1,5 vs 6,7 \pm 1,2, p<0,03) foram maiores nos animais que receberam eCG (BARCELOS et al., 2006). Estes resultados indicam que a administração de eCG estimula o crescimento folicular final, possivelmente devido a presença de receptores de LH em folículos maiores que 7 mm (SIMÕES et al., 2010; BARROS et al., 2009; NOGUEIRA et al., 2007b), resultando em maior número de folículos aptos a ovularem em resposta a administração exógena de LH.



Conseqüentemente, o tratamento com a eCG aumentou o número total de oócitos/embriões recuperados, porém, não houve aumento significativo no número médio de embriões viáveis produzidos pelas vacas tratadas eCG (7,3±1,20 vs 5,1±1,10). Entretanto, o número total de embriões viáveis produzidos pelas vacas tratadas com o protocolo P-36/eCG (146 vs 102) sugere que é vantajoso substituir as últimas duas doses de pFSH por eCG.

Na raça Brangus, o protocolo P-36/eCG melhorou a quantidade de embriões viáveis (10,9±1,5), quando comparado ao protocolo P-36 (7,1±1,4; REANO et al., 2009). Porém, Sartori et al. (2008) não observaram aumento na produção de embriões ao compararem o protocolo P-24/eCG (3,7±0,5 embriões viáveis) com o P-24 (4,9±0,7) em novilhas Nelore. Todavia, raça Sindi (*Bos indicus*), os mesmos autores verificaram que a adição de eCG no protocolo P-36 aumentou o número de embriões viáveis (6,5±1,2 vs 2,4±0,7; $p < 0,01$, MATTOS et al., 2010). Estes resultados indicam que a adição de eCG ao protocolo P-36 parece ser vantajosa, porém o seu uso no protocolo P-24 precisa ser melhor estudado. A diferença entre estes protocolos é que no P-24 a fonte de progesterona é retirada 12 horas antes, em relação ao P-36 e, conseqüentemente, pode permitir uma liberação precoce de LH que poderia adiantar a maturação oocitária e prejudicar a fertilização após a IATF.

Levando em consideração que o uso repetitivo de eCG reduz a produção de embriões, devido provavelmente a produção de anticorpos contra eCG (BARUSELLI et al., 2008), testou-se a substituição de eCG por LH, no último dia do tratamento superestimulatório. Rosa et al. (2010) trataram vacas Angus (n=22) com os protocolos P-36/LH60 (grupo controle), P-36/eCG (as últimas doses de FSH foram substituídas por duas doses de 200UI de eCG, totalizando 400 UI via IM), P-36/LH (as duas últimas doses de FSH foram substituídas por duas doses de 1,0mg de LH) e P-36/FSH+LH (juntamente com as duas últimas doses de FSH foi administrado 1,0mg de LH). Os

autores observaram que a substituição da eCG pelo LH (grupo P36/LH) resultou em declínio ($p < 0,05$) no do número de embriões viáveis, quando comparado aos outros grupos. No entanto, a adição de LH as duas últimas doses de FSH (P-36/FSH+LH) melhorou a qualidade e aumentou numericamente a quantidade total de embriões coletados (87) quando comparado ao grupo controle (43) e P-36/LH (13), e foi similar ao P36/eCG (67). Estes resultados indicam que a eCG não pode ser substituída apenas pelo LH (2,0 mg) no último dia do tratamento superestimulatório de vacas Angus. Entretanto, a combinação FSH+LH pode ser utilizada no lugar da eCG, no último dia do tratamento superestimulatório.

Para verificar se o aumento na dose do LH teria efeito benéfico na produção de embriões, Oliveira et al. (2010) distribuíram vacas Nelore (n=25) em quatro grupos: P-36, P-36/eCG, P-36/LH2,0 (as duas últimas administrações de FSH foram substituídas por 2 doses de 1,0 mg de LH) e P-36/LH4,0 (as duas últimas doses de FSH foram substituídas por duas doses de 2,0 mg de LH). Todas as doadoras foram superestimuladas quatro vezes e receberam todos os tratamentos (crossover).

Apesar da tendência de diminuição na taxa de ovulação nas vacas do grupo LH 2,0 quando comparadas às do grupo eCG (50,6 vs 67,8%, respectivamente, $p = 0,06$), não houve diferença na média de embriões viáveis recuperados nos quatro tratamentos, P-36 (3,3±0,7), P-36/eCG (4,5±0,5), P-36/LH2,0 (3,7±0,8) e P-36/LH4,0 (4,2±1,0). Os autores concluíram que a administração de eCG pode ser substituída pelo LH (4,0mg), no último do tratamento superestimulatório sem afetar a viabilidade de embriões recuperados de vacas Nelore.



Conclusões

Em suma, os resultados acima indicam que um estímulo extra de LH (usando eCG ou LH), no último dia do tratamento superestimulatório do protocolo P-36, melhora ou tende a melhorar a

quantidade de embriões viáveis recuperados em bovinos (*Bos indicus* e *Bos taurus*). Entretanto, experimentos adicionais são necessários para confirmar e ampliar estes achados.

Referências

- BARCELOS, A.C.Z.; GOUVÊA, L.M.; MENEGHEL, M.; et al. Efeito benéfico da substituição das duas últimas doses de pFSH por eCG no protocolo superestimulatório P-36, em vacas Nelore. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, p.1260, 2007.
- BARCELOS, A.C.Z.; SATRAPA, R.A.; NOGUEIRA, M.F.G. Protocolo superestimulatório P-36 na raça Bonsmara: uso de eCG e atraso na indução da ovulação com LH. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, p.514, 2006.
- BARROS, C.M.; ERENO, R.L.; MACHADO, M.F.; et al. Gene expression of luteinizing hormone receptor (LHR) isoforms in granulosa cells of follicles from Nelore heifers before, during, and after follicular deviation. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 21, p.187, 2009.
- BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1483-1496, 2001.
- BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. Superovulation in zebu cattle: protocol P-36. **Embryo Transfer Newsletter**, v.23, p.5-9, 2005.
- BARUSELLI, P.S.; DE SÁ FILHO, M.F.; MARTINS, C.M.; et al. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v.65, p.77-88, 2006.
- BARUSELLI, O.S.; MARTINS, C.M.; SALES, J.N.S.; FERREIRA, R.M. Novos avanços na superovulação de bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, p.433-448, 2008.
- BERGFELT, D.R.; LIGHTFOOT, K.C.; ADAMS, G.P. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. **Theriogenology**, v.42, p.895-907, 1994.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.39, p.193-204, 1995.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; CHESTA, P.M.; MARTINS, C.M. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. **Theriogenology**, v.65, p.89-101, 2006.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTINEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.307-326, 2003.
- BODENSTEINER, K.J., WILTBANK, M.C., BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J. Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. **Theriogenology**. v. 45, p. 499-512, 1996.
- BOLAND, M.P.; CROSBY, T.F.; GORDON, I. Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG. **Theriogenology**, v.10, p.175-180, 1978.



- DIELEMAN, S.J.; BEVERS, M.M.; GIELEN, J.T.H. Increase of the number of ovulations in PMSG/PG-treated cows by administration of monoclonal anti-PMSG shortly after the endogenous LH peak. **Theriogenology**, v.25-41, p.222, 1987.
- D'OCCHIO, M.J.; SUDHA, G.; JILLELA, D.; et al. Use of GnRH agonist to prevent the endogenous LH surge and injection of exogenous LH to induce ovulation in heifers superstimulated with FSH: a new model for superovulation. **Theriogenology**, v.47, p.601-613, 1997.
- DONALDSON, L.E. Porcine, equine and ovine FSH in the superovulation of cattle. **Theriogenology**, v.31, p.138, 1989.
- FERNANDES, P. 2008. Expressão dos transcritos do receptor de LH em células da granulosa de fêmeas Nelore submetidas ou não à superestimulação ovariana. 71f. Botucatu, SP. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- GINTHER, O.J., WILTBANK, M.C., FRICKE, P.M., GIBBONS, J.R., KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.48, p.1187-1194, 1996.
- GUIBAULT, L.A.; GRASSO, F.; LUSSIER, J.G.; ROULLIER, P.; MATTON, P. Decreased superovulatory response in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. **Journal Reproduction Fertility**, v.91, p.81-89, 1991.
- GORDON, I.R. 2003. **Laboratory production of cattle embryos**. 2.ed. London: CABI publishing, 548 pp.
- GOULDING, D.; WILLIAMS, D.H.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day 10 of the estrous cycle. **Theriogenology**, v.34, p.767-778, 1990.
- LIU, J.; SIROIS, J. Follicle size-dependent induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle. **Biology of Reproduction**, v.58, 1527-1532, 1998.
- LOONEY, C.R.; BONDIOLI, K.R. Bovine FSH produced by recombinant DNA technology. **Theriogenology**, v.29, p.235, 1988.
- LUSSIER, J.P.; LAMOTHE, P.; PACHOLEK, X. Effects of follicular dominance and different gonadotrophin preparations on the superovulatory response in cows. **Theriogenology**, v.43, p.270, 1995.
- MATTOS, M.C.C.; BASTOS, M.R.; GUARDIEIRO, M.M.; et al; R. Improvement of embryo quality by the replacement of the last two doses of porcine follicle-stimulating hormone by equine gonadotropin in superstimulated Sindi donors. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, p.364, 2010.
- MERTON, J.S.; ROOS, A.P.W.; MULLAART, E.; et al. Factors affecting oocyte quality in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 67, p. 1233-1238, 2007.
- MURPHY B.D. E; MARTINUK S.D. Equine chorionic gonadotrophin. **Endocrine Reviews**. v.12, p.27-44, 1991.
- NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, C.M. Timing of ovulation in Nelore cows superstimulated with P36 protocol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p.509, 2003.
- NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, B.J.P.; TEIXEIRA, A.B.; et al. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in superstimulated beef cows. **Theriogenology**, v.57, p.1625-1634, 2002.



NOGUEIRA, M.F.G.; BURATINI, JR.J.; BARROS, C.M. Tratamento com hCG e LH, como indutores da ovulação em doadoras superestimuladas da raça Nelore, não altera a produção embrionária ou a taxa de prenhez. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.33, p.263, 2005.

NOGUEIRA, M.F.G.; BURATINI, J. Jr.; PRICE, C.A.; et al. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p.680-686, 2007a.

NOGUEIRA, M.F.G.; FRAGNITO P.S.; TRINCA L.A.; BARROS, C.M. The effect of type of vaginal insert and dose of pLH on embryo production, following fixed-time AI in a progestin-based superestimulatory protocol in Nelore cattle. **Theriogenology**. v.67, p.655-660, 2007b.

OLIVEIRA, A.C.S.; MATTOS, M.C.C.; BASTOS, M.R.; et al. Efficiency of protocol P-36, associated with equine chorionic gonadotropin or luteinizing hormone administration, in the last day of superestimulatory treatment, in Nelore cows. In: 37th Annual Conference of the IETS, 2011, Orlando. 37th Annual Conference of the IETS, 2011. v. 23. p. 237.

REANO, I.; CARBALLO, D.; TRIBULO, A.; et al. Efecto de la adición de eCG a los tratamientos superovulatorios con Follitropin-V en la producción de embriones de donantes de embriones. VIII Simpósio Internacional de Reproducción Animal – IRAC, v.1, p.54, 2009.

ROBERTS, A.J.; GRIZZLE, J.M.; ECHTERNKAMP, S.E. Follicular development and superovulation response in cows administered multiple FSH injections early in the estrous cycle. **Theriogenology**, v.35, p.917-929, 1994.

ROSA, F.S. 2010. Eficiência do protocolo supervovulatório P-36, associado à administração eCG ou LH em doadoras da raça Angus. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Departamento de Farmacologia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SARTOTELLI, E.S.; CARVALHO, L.M.; BERGFELD, D.R.; et al. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, p.2382-1394, 2005.

SARTORI, R.; GUARDIEIRO, M.M.; BARROS, C.M.; et al. Lack of improvement on embryo production by the replacement of the last two doses of pFSH by eCG in superstimulated Nelore heifers. **Reproduction, Fertility and Development**. v.21, p.245-246, 2008.

SIMÕES, R.A.L.; SATRAPA, R.A.; ROSA, F.S.; et al. Follicular diameter, ovulation rate, and LH receptor gene expression in Nelore cows. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, p.270, 2010.

VAN LEEMPUT, E.; VOS, P.; HYTTEL, P.; et al. Effects of brief postponement of the preovulatory LH surge on ovulation rates and embryo formation in eCG/prostaglandin-treated heifers. **Theriogenology**, v.55, p.573-592, 2001.

XU, Z.; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W.; et al. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biology of Reproduction**, v.53, p.951-957, 1995.

ZANENGA, C.A.; PEDROSA, M.F.; LIMA, G.F.; et al. Comparação entre dois protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*). **Acta Scientiae Veterinariae**. v.31, p.626-627, 2003.

