

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA APÓS ABLAÇÃO FOLICULAR USANDO UM
DISPOSITIVO SIMPLIFICADO EM BOVINOS (*Bos taurus taurus*)

WAGNER MARQUES DE LIMA

PORTO ALEGRE

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA APÓS ABLAÇÃO FOLICULAR USANDO UM
DISPOSITIVO SIMPLIFICADO EM BOVINOS (*Bos taurus taurus*)

Wagner Marques de Lima
Médico Veterinário

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de Biotécnicas de Reprodução
Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Macedo Gregory
Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos

PORTO ALEGRE

2007

L732r Lima, Wagner Marques de

Resposta superovulatória após ablação folicular usando um dispositivo simplificado em bovinos (*Bos taurus taurus*). / Wagner Marques de Lima. Porto Alegre: UFRGS, 2007.

35 f.; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2007. Ricardo Macedo Gregory, Orient.

1. Transferência embrionária: veterinária: bovinos 2. Superovulação: bovinos 3. Indução da ovulação: veterinária I. Gregory, Ricardo Macedo, Orient. II. Mattos, Rodrigo Costa, Co-orient. III. Título.

CDD 619.38

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

Wagner Marques de Lima

RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA APÓS ABLAÇÃO FOLICULAR USANDO UM
DISPOSITIVO SIMPLIFICADO EM BOVINOS (*Bos taurus taurus*)

Aprovada em 12 de março de 2007.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Ricardo Macedo Gregory
Orientador e Presidente da Comissão

Profª. Dra. Mari Lourdes Bernardi
Membro da Comissão

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli
Membro da Comissão

Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Macedo Gregory e ao co-orientador Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos pela amizade, pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal, pela confiança e pelo apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

A Estância 3M por ter disponibilizado os animais e instalações para a realização das coletas de embriões.

A todos os funcionários que me acompanharam no campo, ajudando intensamente na realização desse trabalho.

Especialmente ao amigo Dr. Arnaldo Diniz Vieira que se não fosse seu incentivo e, principalmente, a sua colaboração não teria sido possível a realização deste sonho.

Aos meus companheiros de trabalho e amigos Antônio Celso Lapenta Janzanti (*in memoriam*) e José Bim Neto pela amizade e ensinamentos que tanto contribuiu para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos meus familiares que mesmo distante sempre me apoiaram e torceram por mim em mais esta etapa de minha vida.

Em especial à minha noiva Renata pelo amor, incentivo e paciência, que foram essenciais para conclusão deste trabalho.

RESUMO

RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA APÓS ABLAÇÃO FOLICULAR USANDO UM DISPOSITIVO SIMPLIFICADO EM BOVINOS (*Bos taurus taurus*)

Dissertação de Mestrado

Autor: Wagner Marques de Lima

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Macedo Gregory

A influência do momento da ablação do folículo dominante antes do início do tratamento superovulatório, e seu efeito sobre a dinâmica folicular ovariana e a taxa de produção de embriões, ainda permanece indeterminada em bovinos. O presente estudo foi desenvolvido com objetivo de avaliar a resposta superovulatória de fêmeas da raça Limousin, determinando os efeitos da influência do dia de início da superovulação (SOV) de animais no diestro; da presença ou ausência de folículos palpáveis nos ovários no momento de início do tratamento (*status* ovariano); e do tempo, em horas, entre a ablação folicular e o início da SOV. Foram realizadas 244 lavagens uterinas para coleta de embriões em novilhas (n=98) e vacas (n=146), divididas em cinco grupos de acordo com o *status* ovariano no momento de início da SOV, durante o intervalo de 8 a 12 dias após o estro: grupo sem folículo perceptível (n=106); grupo com folículo mantido intacto (n=62) e grupos com folículo puncionado 48 h (n=10), 24 h (n=35) e 0 h (n=31) antes do início da SOV. Nos grupos em que foi realizada a ablação, utilizou-se uma cânula de metal contendo uma agulha para transposição da parede vaginal e ovariana até a aspiração do conteúdo folicular sob controle tátil por via retal. Os resultados obtidos determinaram que a presença de folículos palpáveis no momento de início da SOV reduz significativamente a resposta superovulatória. Os dados de ablação folicular realizada imediatamente ou até 24 h antes do início do tratamento de SOV aumentaram significativamente o número total de embriões viáveis. Entretanto, a resposta do tratamento superovulatório não foi afetada pelo dia do início da aplicação de gonadotrofina no período de 8 a 12 dias após o estro e nem pela categoria animal (novilha ou vaca). Em conclusão, a ablação de folículos perceptíveis por palpação retal entre os dias 8 a 12 do ciclo estral, quando realizada até 24 h antes do início do tratamento de SOV, aumentou o número total de embriões transferíveis por coleta em gado de corte (*Bos taurus taurus*).

Palavras chave: transferência de embriões, ablação folicular, superovulação, bovino.

ABSTRACT**SUPEROVULATORY RESPONSE FOLLOWING FOLLICLE ABLATION USING A SIMPLIFIED TRANSVAGINAL DEVICE IN BEEF CATTLE (*Bos taurus taurus*)**

Master of Science Dissertation

Author: Wagner Marques de Lima

Advisor: Prof. Dr. Ricardo Macedo Gregory

*The influence of the timing for the ablation of dominant follicle prior to superovulatory treatment, and its effect on ovarian follicular growth and embryo yield, still remain elusive in cattle. The present study was designed to evaluate the superovulatory response of Limousin cattle, aiming to determine the effect of the day at mid-diestrus for the onset of superovulation (SOV); presence or absence of large ovarian follicles (ovary status); and the time of follicular ablation, in hours, prior to the SOV. A total of 244 uterine flushings for embryo collections were made using two female categories (heifers or cows) at 8 to 12 days after the estrous. Based on ovary status, the females were allocated into 5 groups: group without palpable follicle(s) (n=106); group with intact follicle(s) (n=62), and groups with follicle ablation at 48 h (n=10), 24 h (n=35) and 0 h (n=31) before the beginning of SOV. Follicles were aspirated transvaginally using a specially designed custom-built steel cannula for follicular cyst puncture. Ovaries bearing follicles were positioned adjacent to the vaginal wall by rectal manipulation. The needle was pushed through the vaginal wall for the puncture and aspiration of the follicular contents. Data obtained demonstrated that the presence of large follicles at the onset of SOV treatment reduced the superovulatory response. The follicular ablation performed immediately or up to 24 h before the SOV increased the total number of viable embryos. However, the superovulatory response was not affected by the day of the start the SOV and by the animal category (heifer or cow) at the period of 8 to 12 days after estrus. In conclusion, the ablation of palpable follicles between days 8 to 12 of the estrous cycle, when accomplished up to 24 h before the beginning of the treatment of SOV, increased the total number of transferable embryos per flushing in beef cattle (*Bos taurus taurus*).*

Keywords: *embryo transfer, follicular ablation, superovulation, bovine.*

LISTA DE TABELAS

TABLE 1.	Effect of ovary status regarding either the presence or absence of large follicle(s), or follicular ablation at 0, 24 or 48 h prior to superstimulatory treatment in Limousin cattle at mid-diestrus (Days 8 to 12 after estrus) on superovulatory response in terms of total ova/embryo and viable embryos.....	19
----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AI: Inseminação artificial;
cm: centímetro (s);
eCG: Gonadotrofina Coriônica equina;
FSH: Hormônio Folículo Estimulante;
GnRH: Hormônio Liberador de Gonadotrofinas;
h: hora (s);
i.m.: intramuscular;
hCG: Gonadotrofina Coriônica humana;
kg: quilogramas;
LH: Hormônio Luteinizante;
mg: miligramas;
ml: mililitros;
mm: milímetros;
SOV: superovulação;
TE: Transferência de Embriões.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3	ARTIGO	14
	Abstract	15
3.1	Introduction	16
3.2	Materials and methods	17
	3.2.1 Animals and experimental design.....	17
	3.2.2 Follicular ablation.....	17
	3.2.3 Superovulatory treatments.....	18
	3.2.4 Embryo recovery and evaluation.....	18
	3.2.5 Statistical analyses.....	18
3.3	Results	19
3.4	Discussion	20
3.5	Conclusion	21
	Acknowledgements	22
	References	22
4	DISCUSSÃO GERAL	25
5	CONCLUSÕES	28
	REFERÊNCIAS.....	29
	ANEXO.....	33

1. INTRODUÇÃO

Desde o primeiro relato de sucesso na transferência de embriões em mamíferos (HEAPE, 1891), foi desenvolvida uma série de trabalhos voltados para compreensão da fisiologia do desenvolvimento embrionário e de métodos que permitissem a aplicação da técnica em espécies de interesse comercial. Os maiores avanços foram obtidos a partir da segunda metade da década de 40 mediante esforços desenvolvidos principalmente na Inglaterra, Estados Unidos e Japão (BETTERIDGE, 2003).

O primeiro resultado efetivo foi obtido em Wisconsin pela equipe de Elwin Willet, com o nascimento de “Prima” em 19/12/1950 (BETTERIDGE, 2000). Entretanto, nesta fase inicial, a recuperação e transferência de embriões bovinos eram realizadas com alguma eficiência unicamente através de procedimentos cirúrgicos, limitando a difusão da técnica. Contudo, a partir da década de 70, a demanda por raças exóticas de carne, criada pela abertura de importações Canadenses, despertou o interesse comercial pela transferência de embriões (TE). A partir da segunda metade desta década, a TE teve um importante impulso com a descoberta da prostaglandina F_{2α} e seus análogos (PHILLIPO & ROWSON, 1975) e, especialmente, com a determinação de um método eficiente de inovulação trans-cervical (DROST *et al.*, 1976).

No Brasil, foram realizadas várias tentativas, sendo o primeiro relato feito pelo Dr. João Carlos Giudice em 1973, na Cabanha Azul em Quaraí-RS. Novamente no Rio Grande do Sul, em 1977, foi realizada uma nova tentativa na Universidade Federal de Santa Maria, com a utilização de embriões da raça holandesa importados da Alemanha. Os procedimentos foram desenvolvidos sob a orientação do Dr. Joachim Hahn em trabalho conjunto com o Dr. Carlos Antônio Mondino Silva (RUBIN, 2005). Um ano após, em Lages-SC, o Dr. Assis Roberto de Bem e sua equipe da Escola Superior de Medicina Veterinária realizaram a primeira tentativa de coleta e transferência de embriões no Estado. Entretanto, o nascimento dos primeiros produtos derivados de TE (“Ariano” e “Odisséia”) ocorreu somente após a transferência de embriões Fleckvieh importados da Alemanha. As transferências foram realizadas em 1978 sob a orientação do Dr. Joachim Hahn em trabalho conjunto com o Dr. Walther Antônio de Pádua

Becker (UNESP – Jaboticabal-SP). Contudo, somente em 1979 foi obtido o primeiro produto derivado de um programa completo de coleta e transferência de embriões bovinos no Brasil. O nascimento de “Eureka” foi o fruto de três anos de trabalho da equipe do Dr. Jorge Nicolau Neto na Fazenda São Pedro em Sorocaba-SP (Rev. Veja 12/12/1979, pág 93).

Atualmente, o Brasil é um dos países onde a biotécnica de TE é largamente empregada na multiplicação de plantéis selecionados ou na produção de touros para utilização em cruzamentos. Apesar de no ano de 2003 ter havido uma pequena retração em relação aos anos anteriores (THIBIER, 2004), No ano de 2005 houve uma recuperação com a catalogação de 20.370 coletas e 107.217 transferências no Brasil (THIBIER, 2006). Entretanto, espera-se uma tendência de estabilização e até de retração no emprego da indução de múltiplas ovulações (superovulação - SOV) como também já foi observada nos Estados Unidos (HASLER, 2003). Este efeito foi atribuído ao fato de que os procedimentos de SOV ainda são relativamente ineficientes, determinando uma média de produção inferior a seis embriões viáveis por coleta (HASLER, 2006) e com aproximadamente 20% das doadoras não respondendo ao tratamento hormonal (MAPLETOFT *et al.*, 2002; HASLER, 2003). A alta variabilidade de resposta superovulatória e a qualidade dos embriões obtidos têm determinado que 64% das doadoras não atinjam a média de produção e que apenas 30% das doadoras sejam responsáveis por 70% dos embriões transferíveis coletados (MAPLETOFT *et al.*, 2002). A variabilidade na resposta superovulatória é atribuída a uma série de fatores que atuam de forma isolada ou conjunta (HAHN, 1992; MAPLETOFT *et al.*, 2002; KANITZ *et al.*, 2002). Entretanto, atualmente sabe-se que a resposta superovulatória é diretamente influenciada pelo número de folículos com diâmetro $\geq 2\text{mm}$ presentes nos ovários no início da onda folicular (SINGH, 2004) e pelo momento de início do tratamento hormonal (NASSER *et al.*, 1993, ADAMS *et al.*, 1994a). Assim, quando se considera a duração das fases de desenvolvimento do folículo dominante em animais que apresentam duas ou três ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral, 80% dos ciclos estrais não são adequados à obtenção de uma boa resposta superovulatória (BÓ *et al.*, 2002; MAPLETOFT *et al.*, 2002). Este fato determina a necessidade do monitoramento da dinâmica folicular e até mesmo, estudos no sentido de evitar o mecanismo de dominância folicular antes do início do tratamento superovulatório

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O acompanhamento dos níveis plasmáticos de FSH, em ciclos de duas ou três ondas foliculares, demonstrou o surgimento de ondas de FSH um a dois dias antes da emergência de cada onda folicular, demonstrando assim ser o responsável por este mecanismo. Sabe-se ainda que o folículo dominante suprime seus subordinados, bem como a emergência da próxima onda, por supressão do FSH através da produção de estradiol e inibina (ADAMS *et al.*, 1992). Além disso, o folículo dominante produz fator de crescimento semelhante à insulina, a ativina e o fator de crescimento tumoral β que o torna mais sensível ao FSH, o que possibilita crescimento continuado, mesmo com baixa concentração deste hormônio (ADAMS *et al.*, 1992; FORTUNE, 1994). Ainda, o folículo dominante parece mudar sua dependência gonadotrófica do FSH para o LH por meio da síntese de receptores para este hormônio, além da provável alteração na expressão da enzima aromatase (GINTHER *et al.*, 1996).

O folículo dominante normalmente cresce por cerca de seis dias, passa por um período estático após atingir seu diâmetro máximo, podendo regredir ou ovular de acordo com a onda folicular em que se encontra (GINTHER *et al.*, 1989). Na média, a emergência da onda folicular foi detectada no dia 0 (dia da ovulação) e dia 10 para ciclo estral com duas ondas foliculares. Já para ciclos com três ondas, a emergência foi detectada nos dias 0, 9 e 16 (GINTHER *et al.*, 1989). Este padrão confirma a efetividade do protocolo convencional de SOV, originalmente baseado na observação de que as melhores respostas superestimulatórias eram obtidas com tratamentos iniciados entre os dias 8 e 12 após o estro (BÓ *et al.*, 1995; MAPLETOFT *et al.*, 2002). Este período do diestro (7 a 11 dias após a ovulação) corresponde aproximadamente ao dia de emergência da segunda onda de crescimento folicular em ciclos de duas ou três ondas (GINTHER *et al.*, 1989). Porém, em animais que apresentam três ondas foliculares por ciclo, o dia da emergência da segunda onda folicular pode ocorrer um ou dois dias antes do que em animais que apresentam padrão de duas ondas foliculares (MAPLETOFT *et al.*, 2002). Esta variação pode ser um importante fator de comprometimento no resultado da SOV, já que quando os tratamentos superestimulatórios são iniciados após o momento da emergência da onda folicular, há

uma redução significativa na resposta superovulatória, quando comparada ao tratamento iniciado no dia de emergência da onda (NASSER *et al.*, 1993; ADAMS *et al.*, 1994). Outro importante fator relacionado com a redução no número de corpos lúteos, estruturas recuperadas e embriões transferíveis em vacas superovuladas é a presença de um folículo dominante (> 8mm) no momento de início da SOV (GUILBAULT *et al.*, 1991; HUHTINEN *et al.*, 1992; BUNGARTZ & NIEMANN, 1994; STOCK *et al.*, 1996). Assim, a utilização de métodos de manipulação da dinâmica folicular pode adequar o momento de início da superestimulação ovariana com a emergência da onda folicular. Bem como, pode aumentar o número de estruturas coletadas em função da eliminação do folículo dominante antes do início da superestimulação ovariana (KOHARAM *et al.*, 1998; SHAW & GOOD, 2000; KIM *et al.*, 2001; MAPLETOFT, 2006).

A quebra do mecanismo de dominância folicular e sincronização de desenvolvimento de uma nova onda folicular antes do início do tratamento superovulatório pela eliminação do(s) folículo(s) de maior diâmetro/dominante podem ser realizadas mediante o emprego de métodos hormonais ou físicos (BÓ *et al.*, 1995). Nos protocolos com base na aplicação de GnRH e LH ou seus análogos, a emergência de uma nova onda folicular ocorre em 1,3 dias. Porém, a sincronização só é consistente nos animais que ovulam em resposta ao tratamento (MARTINEZ *et al.*, 1999). Problema menos evidente em protocolos que empregam a associação de estrógeno com progesterona/progestágeno. Tratamento que determina a emergência de uma nova onda de desenvolvimento folicular de forma consistente dentro de um período de 3 a 5 dias (BÓ *et al.*, 1994; BÓ *et al.*, 1995). Entretanto, apesar de permitir a sincronização da emergência da onda folicular, proporcionando a realização do programa de SOV em um momento eletivo, os resultados de produção de embriões não são diferentes dos obtidos com o protocolo convencional de início da SOV no período de 8 a 12 dias após o estro (BÓ *et al.*, 2002). Já com o emprego de métodos físicos, a quebra da dominância ocorre de forma imediata, com um aumento nos níveis séricos de FSH em cinco horas (GINTHER *et al.*, 1999) e emergência de uma nova onda de desenvolvimento folicular em até 48 horas após a eliminação do folículo em qualquer fase do ciclo estral (ADAMS *et al.*, 1992; BERGFELT *et al.*, 1994; BÓ *et al.*, 1995; MARTINEZ *et al.*, 2000), o que também permite a realização do programa de SOV em um momento eletivo. Adicionalmente, quando realizada dentro do período de 8 a 12 dias após o estro, a eliminação mecânica do(s) folículo(s) de maior diâmetro/dominante às 24 horas

(HAHM, 1992; BARACALDO *et al.*, 2000) ou 48 horas (KOHARAM *et al.*, 1998; SHAW & GOOD, 2000; KIM *et al.*, 2001) antes do início da SOV, determina um aumento no número de estruturas coletadas.

Dentre os métodos físicos, a eliminação do(s) folículo(s) pode ser obtida pela punção guiada por ultra-som, através da fossa paralombar (CALLESEN *et al.*, 1987) ou por via transvaginal (PIETERSE *et al.*, 1988; PIETERSE *et al.*, 1991), por cauterização mediante laparotomia ou laparoscopia (KO *et al.*, 1991; ADAMS *et al.*, 1992; BERGFELT *et al.*, 1994), por compressão manual (HAHN, 1993) ou através de punção transvaginal guiada pelo tato utilizando uma agulha longa (ALI *et al.*, 2001).

Resultados, provavelmente determinados pela variação no momento de eliminação do folículo dominante antes do início da SOV, levam a divergências entre relatos quanto ao aumento no número de embriões transferíveis (KANITZ *et al.*, 2002). Este fato gera a necessidade de estudos para determinar o melhor período para remoção do(s) folículo(s) de maior diâmetro (dominante) antes do início da aplicação de gonadotrofinas, objetivando um aumento na resposta superovulatória.

Os objetivos deste trabalho foram, determinar a influência da categoria animal sobre a resposta superovulatória, assim como do dia de início da SOV e do período mais adequado para remoção do folículo dominante. Igualmente foi avaliada a eficiência de um dispositivo rotineiramente usado para aspiração de cistos foliculares, como equipamento para ablação de folículos palpáveis antes do início da SOV.

3 ARTIGO

IMPROVED SUPEROVULATORY RESPONSE IN BEEF CATTLE FOLLOWING
FOLLICULAR ABLATION USING A SIMPLIFIED TRANSVAGINAL DEVICE

Artigo aceito para publicação na revista

Animal Reproduction Science

doi:10.1016/j.anireprosci.2006.10.023

**Improved superovulatory response in beef cattle
following ovarian follicular ablation using
a simplified transvaginal device**

**W.M. Lima^a,*, A.D. Vieira^b, A. Thaler Neto^b, A. Mezzalira^b, R.C. Mattos^a, R.M.
Gregory^a**

^a *Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
FAVET/UFRGS, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil*

^b *Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, CAV/UDESC, Lages, SC 88520-000, Brazil*

Received 23 June 2006; accepted 31 October 2006

Abstract

The influence of the timing for the ablation of dominant follicle(s) prior to superovulatory treatment, and its effect on ovarian follicular growth and embryo yield, still remain elusive in cattle. The present study was designed to evaluate the effects of: (1) the day of the estrous cycle, at mid-diestrus, for the onset of superstimulation of follicular development, (2) the presence or absence of large ovarian follicles (ovary status) and (3) the time of follicular ablation, in hours, prior to the superovulatory treatment, on the superovulatory response in cattle. From a total of 244 superovulatory treatments and embryo collections in nulliparous and multiparous females, 76 were conducted after follicular ablation using a simplified transvaginal puncture cannula. Results from the present study indicated that the presence of large palpable follicle(s) at the onset of superstimulation of follicular development markedly reduced the superovulatory response. In addition, follicular ablation at 0 h or at 24 h prior to the onset of the superstimulation treatment significantly increased the number of total viable embryos. However, superovulatory responses were not affected by the day of the estrous cycle for the onset of follicular superstimulation and by the animal category (heifers or cows). In conclusion, the ablation of palpable follicle(s) 24 h or immediately prior to the onset of gonadotropin treatment, from days 8 to 12 of the estrous cycle (day 0, behavioral estrus), increased the total number of transferable embryos per flushing in cattle.

Keywords: Ovarian follicular superovulation; Bovine; Cattle; Ovarian follicular ablation; Embryo transfer

3.1. Introduction

Despite considerable progress in the understanding of ovarian follicular growth in cattle, the variable and unpredictable superovulatory response of donor animals is still one of the most limiting factors to the success in the embryo transfer industry (KOHARAM *et al.*, 1998; BÓ *et al.*, 2002; HASLER, 2003). The initiation of gonadotropin treatments at the time of follicular wave emergence optimizes the number of follicles capable of responding, usually resulting in significantly improved superovulatory responses (HAHN, 1992; NASSER *et al.*, 1993; ADAMS *et al.*, 1994). The common practice is to start gonadotropin treatments between days 8 and 12 of the estrous cycle in an attempt to initiate stimulation at the expected time of the second ovarian follicular wave emergence. Although theoretically sound, this strategy is still confounded by variations among cows for both length and number of individual follicular waves. The presence or absence of a dominant follicle in the ovaries at the time of gonadotropin treatment markedly influences the superovulatory response in cows (GUIBAULT *et al.*, 1991; HUHTINEN *et al.*, 1992; STOCK *et al.*, 1996). A retrospective analysis of 1385 embryo recovery records from cows receiving follicular ablation or no ablation prior to gonadotropin stimulation, beginning between days 7 and 13 (day 0, behavioral estrus) of the estrous cycle, revealed a positive association between dominant follicle ablation and a total ova/embryo recovered (SHAW and GOOD, 2000). Different methods are described for mechanical follicular ablation (KO *et al.*, 1991; HAHN, 1992; BERGFELT *et al.*, 1994; BARACALDO *et al.*, 2000; ALI *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2001), and its use at 24 h (HAHN, 1992; BERGFELT *et al.*, 1997; BARACALDO *et al.*, 2000), 36 h (SINGH *et al.*, 2004) or 48h (BERGFELT *et al.*, 1994; KOHRAM *et al.*, 1998; SHAW and GOOD, 2000; KIM *et al.*, 2001) before the onset of follicular superstimulation appear to improve the superovulatory response in cattle. However, contradictory results regarding the period of removal of the dominant follicle and its effect on follicular growth and embryo yield still limit the widespread use of the procedure.

Based on the premise that follicular superstimulation is optimal when gonadotropin treatment is initiated without large follicles on the ovary at mid-diestrus, the present study aimed to determine the effect of: (1) the day of the estrous cycle, at mid-diestrus, for the onset of the follicular superstimulation, (2) the ovary status (presence or absence of large follicle(s) prior to the gonadotropin treatment) and (3) the

time of follicular ablation prior to the superovulatory treatment on the superovulatory response (i.e., total ova/embryo and total number of viable embryos) in cattle.

3.2. Materials and methods

3.2.1. Animals and experimental design

The present study was conducted over a 20-month interval on a herd of 132 female donor animals from a commercial embryo transfer operation (Estância 3M, Marilândia do Sul, PR, Brazil). Limousin purebred heifers (15–20 months old, weighing from 380 to 500 kg) and cows (2–8 years of age, weighing from 500 to 700 kg) were maintained under common grazing conditions (Tifton 85), in outdoor paddocks with access to a shelter from the climatic conditions. Lactating cows were fed a concentrate grain supplementation. All animals had free access to water, salt and mineral supplement. Animals were observed for estrous behavior twice a day. Following rectal examination of the genital tract and detection of ovary status, heifers and cows at 8–12 days after natural estrus were allocated to five treatment groups prior to follicular superstimulation, as follows: (a) group 1: nonpalpable follicles, (b) group 2: palpable follicle(s), (c) group 3: ablation of palpable follicle(s) at 0 h, (d) group 4: ablation of palpable follicle(s) at 24 h and (e) group 5: ablation of palpable follicle(s) at 48 h prior to gonadotropin treatment. Animal use and procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Center of Agroveterinarian Sciences of the Santa Catarina State University (Lages, SC, Brazil).

3.2.2. Ovarian follicular ablation

The decision to perform follicular ablation or not was made by the clinician during transrectal examination of the donor reproductive tract. Animals with palpable follicle(s) were randomly assigned to each group (ablation at 0, 24, or 48 h, or non-ablation) prior to superovulation treatment initiation. Ablation of the large palpable follicle(s) was performed by follicular puncture as previously described (Ali et al., 2001), with a few modifications. Follicles were aspirated transvaginally using a specially designed custom-built steel cannula for follicular cyst puncture (Horsy Haron Toolworks, Garça, SP, Brazil). Ovaries bearing follicles estimated to be ≥ 10 mm were positioned adjacent to the vaginal wall by rectal manipulation. The tip of the aspiration device (outer cannula: 1.6 cm diameter/45 cm length) was introduced into the vagina, close to the cervical fornix, and positioned against the ovary, adjacent to the vaginal

wall. The inner cannula (1.3 cm diameter/57 cm length) containing a Luer lock connector enclosing a needle (size 18 G 1½'') was directed to the ovary in the region where the ovarian follicle was located. The needle was pushed through the vaginal wall for the puncture of the follicle(s). Suction was made by using a 10mL syringe connected to a silicon tube; drainage of follicular contents was determined to occur following collapse of the palpable follicle and/or recovery of fluid into the silicon tube. If necessary, these procedures were repeated for both ovaries.

3.2.3. Superovulatory treatments

Gonadotropin treatment consisted of a total dose of 160–200 mg or 240–260 mg NIH-FSH-PI (FolltropinV, Bioniche, Belleville, Ontario, Canada), for heifers or cows, respectively, given twice daily for 4 days (i.e., eight i.m. injections of equal sub-doses). Cloprostenol (Croniben, Biogenis, Buenos Aires, Argentina) was given i.m. at 60 h (0.15 mg) and 72 h (0.075 mg) after the onset of the gonadotropin treatment. Animals were artificially inseminated (AI) twice, at 12 h and 24 h after the onset of estrus using high standard frozen–thawed semen.

3.2.4. Embryo recovery and evaluation

Embryos were collected from 62 heifers and 70 cows, for a total of 244 ovarian follicular superstimulations, by non-surgical whole uterine flushing (body and horns) 6 to 7 days after AI. After embryo collection, donors received Cloprostenol (0.15 mg) i.m. The recovered flushing medium was filtered through an embryo filter (Millipore, Nutricell, Campinas, SP, Brazil). Embryos were searched under a stereomicroscope and transferred to holding media (TQC Holding Plus, Nutricell, Campinas, SP, Brazil), to be morphologically evaluated according to procedures from the International Embryo Transfer Society manual (Stringfellow and Seidel, 1998).

3.2.5. Statistical analyses

Data were analyzed for normality using a normal probability plot and the Shapiro-Wilkins normality test. Analyses were conducted with the Proc GLM of SAS (SAS, 2005). Data were compared by a 5×5×2 factorial considering ovary status (groups 1–5 above), day of the cycle (days 8–12) and animal category (heifer, cow) as main effects. Pairwise comparisons were performed by least square means. As day of the estrous cycle, animal category and their interactions were not significant, data

considering ovary status were pooled and re-examined by ANOVA, including the examination of possible interactions, and least square means. A probability of <0.05 was defined as significant.

3.3. Results

No differences were detected on the superstimulatory response regarding animal category and day of the estrous cycle for the initiation of the superovulatory treatments during mid-diestrus (days 8–12, data not shown). Consequently, such data were pooled according to the ovary status (Table 1). The superstimulatory response were influenced by ovary status in terms of total ova/embryo ($P = 0.0291$) and total viable embryo ($P = 0.0004$). The presence of palpable ovarian follicle(s) prior to follicular superovulation treatment (group 2) resulted in a significantly lesser ($P = 0.0512$) numbers of transferable embryos per donor than the group without palpable follicles (group 1). In addition, the ablation of large follicle(s) at 0 or 24 h (groups 3 and 4) enhanced ($P < 0.05$) the superstimulatory response in terms of total viable embryos recovered per flush, when compared with groups 1 and 2 (Table 1). Ovarian follicular ablation 48 h before the onset of gonadotropin treatment (group 5) was not different than all other treatment groups, resulting in an intermediate response (Table 1).

Table 1. Effect of ovary status regarding either the presence or absence of large ovarian follicle(s), or follicular ablation at 0, 24 or 48 h prior to follicular superstimulatory treatment in cattle at mid-diestrus (days 8–12 after estrus) on superovulatory response in terms of total ova/embryo and viable embryos.

Ovary status	Animal category ^a			Total ova/embryo ^b	Total viable embryos ^c	
	Heifers	Cows	Total	LSM ± SEM	LSM ± SEM	(%)
Non-palpable follicle	37	69	106	11.2 ^{ac} ± 0.66	8.1 ^a ± 0.51	(72.3)
Follicle left-intact	28	34	62	10.2 ^a ± 0.86	6.4 ^b ± 0.67	(62.7)
Follicular ablation at 0 h	13	18	31	14.2 ^b ± 1.22	10.3 ^c ± 0.94	(72.5)
Follicular ablation at 24 h	16	19	35	13.6 ^{bc} ± 1.15	10.9 ^c ± 0.89	(80.1)
Follicular ablation at 48 h	4	6	10	9.6 ^{ab} ± 2.15	7.3 ^{abc} ± 1.66	(76.0)

Numbers in the same column without common superscripts (a–c) differ, $P < 0.05$.

^a Number of embryo collections per animal category ($n = 62$ heifers; $n = 70$ cows).

^b As results for animal category (heifers, cows) and day of the estrous cycle for superovulation were not different, data for total ova/embryo and total viable embryos were pooled by ovary status.

3.4. Discussion

Several studies have demonstrated that the induction of an ovarian follicular wave emergence allows the initiation of superstimulatory treatments at random stages of the estrous cycle (BERGFELT *et al.*, 1994, 1997; MARTINEZ *et al.*, 1999; BARACALDO *et al.*, 2000; DEYO *et al.*, 2001). This can be achieved either mechanically (KO *et al.*, 1991; HAHN, 1992; BERGFELT *et al.*, 1994, 1997; ALI *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2001) or pharmacologically (MARTINEZ *et al.*, 1999; DEYO *et al.*, 2001). However, the superovulatory response after the pharmacological induction of follicle wave emergence was only comparable to conventional follicular superstimulatory treatments initiated at mid-diestrus (BERGFELT *et al.*, 1997; BO *et al.*, 2002). At mid-diestrus, the cow-to-cow variation can be attributed to ovary status at the onset of the superstimulatory treatment. Diagnosis of follicles <10mm by palpation *per rectum* can be inaccurate, and may depend on the overall size of the ovary, the degree of relaxation of the rectal wall, body condition score of the animal, and the skill of the examiner (HANZEN *et al.*, 2000). In cattle, a dominant follicle is defined as the largest follicle on the ovary, with deviation or dominance beginning at about 8.5mm (GINTHER *et al.*, 1999). In this study, the presence of palpable follicle(s) of ≥ 10 mm in the ovaries at the time of exogenous gonadotropic stimulation showed a markedly negative influence on superovulatory response in terms of total ova/embryo ($P = 0.0291$) and total viable embryo ($P = 0.004$). The mechanical removal of those large ovarian follicles in heifers and cows at 24 or 0 h prior to the initiation of the follicular superstimulation, between days 8 and 12 of the estrous cycle, increased the total ova/embryo and viable embryos per each flushing of the reproductive tract. These results agreed with those by Kim *et al.* (2001), but only partially with results by Kohram *et al.* (1998) and Shaw and Good (2000), whose observations demonstrated a consistent increase in response (total number of recovered ova/embryos) that was exclusively reflected on non-viable embryos and non-fertile ova after follicular ablation. In the present study, the average number of both total ova/embryo and total transferable embryos after follicular ablation at 0 and 24 h were consistent and greater than results from the non-ablated group (14.2 compared with 10.3 and 10.2 compared with 6.4, respectively) and from results from commercial embryo transfer operations (11.5 ova/embryo and 6.2 transferable embryo per donor female) described by others (SHAW and GOOD, 2000; THIBIER, 2004).

Considering the day effect, no differences on the superovulatory response, irrespective of the ovary status or animal category, were observed between day 8 and day 12 after estrus for the onset of the gonadotropin treatment. The absence of detectable differences in superstimulatory responses among days of the mid-diestrus may be attributed to the possible inclusion of females with two-and three-waves of ovarian follicular development during the estrous cycles, increasing the variability for the day of emergence during the second wave of follicular development in the estrous cycle. In the present study, superovulatory responses were less with the presence as compared with the absence of palpable follicles, with the follicular ablation at 48 h to prior to the follicular superstimulatory treatment showing no significant effect on embryo yield. However, when follicular ablation was performed 24 h or immediately prior to the gonadotropin treatments, the superovulatory response was significantly greater in terms of viable embryos. Possibly, follicular ablation at 48 h may still allow the selection and/or dominance of further follicle(s) prior to the onset of the superstimulation still in time to influence negatively the recruitment of viable follicles by the exogenous gonadotropin treatment. Conversely, the follicular ablation at the time of the initiation of superstimulatory treatment, if palpable follicle(s) are detected, is more practical than at 24 h and may result in significant increase in embryo yield in cattle.

In the present study, a simple, inexpensive and reliable procedure for the mechanical follicular ablation was used after the detection of palpable ovarian follicles by rectal palpation prior to follicular superstimulation treatment. This is an effective procedure for follicular ablation under field conditions, particularly to those who do not have access to ultrasonography. The increase in superovulatory response in cows in the present study using a simplified, non-visual approach was inexpensive and practical, and can be successfully and readily applied to embryo transfer operations in beef cattle.

3.5. Conclusion

The follicular ablation using a simplified transvaginal hand-guided apparatus up to 24 h prior to the onset of ovarian follicular superstimulatory treatment in heifers and cows, initiated at any day at mid-diestrus (days 8–12), significantly improved the superovulatory response in cattle in terms of total viable embryos per uterine flushing.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Marcelo Bertolini for his valuable comments and suggestions during the preparation of this manuscript, and to the 3M Ranch for making donor females available for embryo collection.

References

- ADAMS, G.P.; NASSER, L.F.; BO, G.A.; GARCIA, A.; DEL CAMPO, M.R.; MAPLETOFT, R.J. Superovulatory response of wave 1 versus wave 2 in heifers. **Theriogenology**, v.42, p.1103–1113, 1994.
- ALI, A.; LANGE, A.; GILLES, M.; GLATZEL, P.S. Morphological and functional characteristics of the dominant follicle and corpus luteum in cattle and their influence on ovarian function. **Theriogenology**, v.56, p.569–576, 2001.
- BARACALDO, M.I.; MARTINEZ, M.F.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J.; Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. **Theriogenology**, v.53, p.1239–1250, 2000.
- BERGFELT, D.R.; LIGHFOOT, K.C.; ADAMS, G.P.; Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. **Theriogenology**, v.42, p.895–907, 1994.
- BERGFELT, D.R.; BÓ, G.A.; MAPLETOFT, R.J.; ADAMS, G.P.; Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, V.49, p.1–12, 1997.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRÍBULO, R.; TRÍBULO, H.; MAPLETOFT, R.J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v.57, p.53–72, 2002.
- DEYO, C.D.; COLAZO, M.G.; MARTINEZ, M.F.; MAPLETOFT, R.J.; The use of GnRH or LH to synchronize follicular wave emergence for superstimulation in cattle. **Theriogenology**, v.55, p.513, 2001. (Abstract)
- GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; KULICK, L.J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: Establishment of follicle deviation in less than 8 h through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, v.52, p.1079–1093, 1999.
- GUIBAULT, L.A.; GRASSO, F.; LUSSIER, J.G.; ROUILLIER, P.; MATTON, P. Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. **J. Reprod. Fertil.** V.91, p.81–89, 1991.
- HAHN, J. Attempts to explain and reduce variability of superovulation. **Theriogenology**, v.38, p.269–275, 1992.

HANZEN, C.H.; PIETERSE, M.; SCENZI, O.; DROST, M., Relative accuracy of the identification of ovarian structures in the cow by ultrasonography and palpation *per rectum*. **Vet. J.**, v.159, p.161–170, 2000.

HASLER, J.F., The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. **Anim. Reprod. Sci.** v.79, p.245–264, 2003.

HUHTINEN, M.; RAINIO, V.; AALTO, J.; BREDBACKA, P.; MÄKI-TANILA, A., Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. **Theriogenology**, v.37, p.457–463, 1992.

KIM, I.H.; SON, D.S.; YEON, S.H.; CHOI, S.H.; PARK, S.B.; RYU, I.S.; SUH, G.H.; LEE, D.W.; LEE, C.S.; LEE, H.J.; YOON, J.T., Effect of dominant follicle removal before superstimulation of follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. **Theriogenology**, v.55, p.937–45, 2001.

KO, J.C.; KASTELIC, J.P.; DEL CAMPO, M.R.; GINTHER, O.J.; Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. **J. Reprod. Fertil.** v.91, p.511–519, 1991.

KOHRAM, H.; BOUSQUET, D.; DUROCHER, J.; GUILBAULT, L.A.; Alteration of follicular dynamics and superovulatory responses by gonadotropin releasing hormone and follicular puncture in cattle: a field trial. **Theriogenology**, v.49, p.1165–1174, 1998.

MARTINEZ, M.F.; ADAMS, G.P.; BERGFELT, D.R.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, J.P., Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. **Anim. Reprod. Sci.**, v.57, p.23–33, 1999.

NASSER, L.F.; ADAMS, G.P.; BO, G.A.; MAPLETOFT, R.J.; Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. **Theriogenology**, v.40, p.713–724, 1993.

SAS, 2005. SAS User's Guide: Statistics. **SAS Institute**, Inc., Cary, NC.

SHAW, D.W.; GOOD, T.E., Recovery rates and embryo quality following dominant follicle ablation in superovulated cattle. **Theriogenology**, v.53, p.1521–1528, 2000.

SINGH, J.; DOMÍNGUEZ, M.; JAISWAL, R.; ADAMS, G.P., A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. **Theriogenology**, v.62, p.227–243, 2004.

STOCK, A.E.; ELLINGTON, J.E.; FORTUNE, J.E., A dominant follicle does not affect follicular recruitment by superovulatory doses of FSH in cattle but can inhibit ovulation. **Theriogenology**, v.45, p.1091–1102, 1996.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M., (Eds.), Manual of the International Embryo Transfer Society: A Procedural Guide and General Information of the Use of Embryo Transfer Technology, Emphasizing Sanitary Precaution, third ed. **IETS**, Savoy, IL, USA, 170 pp, 1998.

THIBIER, M., Stabilization of Numbers of in vivo Collected Embryos in Cattle but Significant Increases of in vitro Bovine Produced Embryos in Some Parts of the World. **Embryo Transfer Newsletter**, v.22, p.12–19, 2004.

4 DISCUSSÃO GERAL

O principal resultado obtido com este trabalho foi o desenvolvimento de um método prático de ablação do(s) folículo(s) para melhorar a resposta superovulatória em fêmeas bovinas. Adicionalmente, foi determinado o melhor momento para eliminação destes folículos antes do início da aplicação de FSH. Tais resultados possibilitam que profissionais sem a disponibilidade de equipamentos de ultrasonografia possam contornar os efeitos inibitórios da presença de folículos dominantes no início da superovulação.

Contudo, cabe ressaltar que a obtenção de altas taxa de recuperação embrionária obtidas neste estudo podem ter sido decorrentes da somatória dos procedimentos executados desde a seleção e nutrição das doadoras, até o processo de ablação folicular/sincronização da onda, superovulação e coleta dos embriões.

Durante a seleção das doadoras, além do mérito zootécnico é importante considerar as características do trato reprodutivo, onde o principal indicativo de boa capacidade de resposta superovulatória é a determinação do número de folículos com diâmetro $> 2\text{mm}$ (SINGH *et al.*, 2004). Entretanto, características individuais podem interferir diretamente na resposta, dificultando a elaboração de qualquer previsão do número de embriões que poderão ser recuperados.

Vários trabalhos (COSCIANI *et al.*, 2005; FIGUEIRA, *et al.*, 2005; BOLAND *et al.*, 2001; NOLAN *et al.*, 1998) foram desenvolvidos com o objetivo de determinar o grau de influência da dieta sobre a resposta superovulatória e/ou da qualidade dos embriões. A maioria dos resultados não foi conclusiva, havendo grande número de contradições que podem ter sido geradas por efeitos secundários relacionados aos protocolos de superovulação e coleta. Entretanto, Mikkola *et al.* (2005) observaram que animais recebendo uma dieta equilibrada de energia podem responder com aumento na qualidade embrionária quando recebem suplementação protéica. No presente estudo, apesar dos animais não receberem suplementação alimentar significativa, o pastejo em Tifton 85 pode ter influenciado a qualidade embrionária em função do teor equilibrado de proteína observado nesta categoria de gramíneas.

Diferentes protocolos foram desenvolvidos com o objetivo de sincronizar o início de uma onda de crescimento folicular com o início do protocolo de superestimulação. Os tratamentos de sincronização a base de hormônios como GnRH, LH ou seus análogos mostraram-se efetivos, entretanto, com consistência de resultados apenas nos animais que ovularam em resposta ao tratamento. Já no caso de protocolos baseados na aplicação de progesterona/progestágeno associados a estrógenos, verificou-se maior consistência nos resultados, com pequena flutuação dependente do tipo do hormônio utilizado. As principais vantagens destes protocolos são de permitir a determinação eletiva de um programa de SOV dispensando a presença de um especialista. Isso é possível pelo fato destes protocolos estarem baseados na inserção de dispositivos subcutâneos ou intravaginais e injeções intramusculares. Contudo, os protocolos de sincronização com aplicação de hormônios não determinaram um incremento efetivo no número de embriões recuperados em relação ao protocolo convencional de SOV, iniciado entre os dias 8 a 12 do diestro. Possivelmente, este fato se deva a efeitos indesejáveis decorrentes dos hormônios aplicados.

No caso dos protocolos de sincronização de onda folicular baseados em métodos físicos de ablação folicular, tem-se a desvantagem da necessidade da presença do especialista no momento da execução do procedimento. Entretanto, como foi demonstrado neste trabalho, a possibilidade de execução da ablação do(s) maior(es) folículo(s) com um dia de antecedência ou no momento de início da SOV em qualquer momento no período de 8 a 12 dias após o estro, permite um grau satisfatório de programação de atividades. Também deve se considerar que esse procedimento pode ser facilmente executado com auxílio de uma guia de aspiração folicular guiada por ultrassom, ou ainda, como no caso do presente trabalho, mediante o uso de um equipamento guiado pelo tato. Porém, a principal vantagem observada no método físico é a consistência nos resultados de sincronização e de aumento no número de estruturas recuperadas por coleta.

A obtenção de superestimulação ovariana foi obtida mediante a aplicação de diferentes gonadotrofinas, tais como eCG, hCG e FSH. Entretanto, apesar destes preparados proporcionarem a obtenção de múltiplas ovulações, tem sido observado variados graus de influência negativa sobre a viabilidade dos embriões obtidos. Atualmente, o FSH de origem suína submetido à alta purificação quanto à contaminação por LH é uma gonadotrofina amplamente utilizada seguindo um protocolo de aplicação de 400mg NIH-FSH-PI recomendado pelo fabricante. Gonzalez *et al.* (1990) não

observaram comprometimento na qualidade embrionária quando do uso de doses de até 400mg do produto, entretanto, as melhores respostas superovulatórias são obtidas com concentrações de 180 a 200mg do produto de acordo com Baracaldo *et al.* (2000).

Por ser considerada “técnica estabelecida”, um pequeno número de trabalhos descreve detalhadamente os procedimentos de lavagem uterina para coleta de embriões. Entretanto, esta etapa do processo pode determinar importantes variações nas taxas de recuperação embrionária pela associação de efeitos como variações na técnica de lavagem, habilidade do operador e de diferentes aspectos fisiológicos inerentes ao tratamento superovulatório. Sartori *et al.* (2003), empregando o método de coleta corno a corno, observaram que o simples fato de lavar uma maior porção do corno uterino permite aumentar significativamente a taxa de recuperação embrionária. Resultado que vem ao encontro com o que Castro Neto *et al.* (2005), observaram após a lavagem e relavagem de todo o lume uterino. Porém, estes resultados contrastam com o fato de não ter havido diferença entre os métodos de coleta corno a corno em relação ao útero como um todo (HAY *et al.*, 1990). No presente experimento, procedeu-se a lavagem de todo o lume uterino mediante o posicionamento do balão da sonda na abertura cervical interna, o que permite ampla distensão da parede uterina e gera um importante fluxo de retorno. Tal procedimento, associado à habilidade do operador podem ter sido importantes fatores nos resultados obtidos.

5 CONCLUSÕES

A presença de um folículo palpável no momento do início da aplicação de FSH reduz a resposta superovulatória em fêmeas bovinas de corte.

A resposta superovulatória em fêmeas bovinas de corte é aumentada quando se procede a remoção física do folículo perceptível pela palpação retal dentro de um período de até 24 horas antes do início da aplicação de FSH.

O aumento na resposta superovulatória determinado pela ablação folicular, até 24 horas antes do início da aplicação de FSH, independe do dia do ciclo dentro do intervalo de 8 a 12 dias após o estro.

O uso do dispositivo simplificado mostrou-se eficiente para remoção do folículo palpável, determinando aumento na resposta superovulatória.

REFERÊNCIAS

ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.; GINTHER, O.J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.94, p.177-188, 1992.

ADAMS, G.P.; NASSER, L.F.; BO, G.A.; GARCIA, A.; DEL CAMPO, M.R.; MAPLETOFT, R.J. Superovulatory response of wave 1 versus wave 2 in heifers. **Theriogenology**, v.42, p.1103 – 1113, 1994.

ADAMS, G.P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization & superstimulation. **Theriogenology**, v.41, p.19-24, 1994.

ALI, A.; LANGE, A.; GILLES, M.; GLATZEL, P.S. Morphological and functional characteristics of the dominant follicle and corpus luteum in cattle and their influence on ovarian function. **Theriogenology**, v.56, p.569–576, 2001.

BARACALDO, M.I.; MARTINEZ, M.F.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. **Theriogenology**, v.53, p.1239-1250, 2000.

BERGFELT, D.R.; LIGHFOOT, K.C.; ADAMS, G.P. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. **Theriogenology**, v.42, p.895-907, 1994.

BERGFELT, D.R.; BO, G.A.; MAPLETOFT, R.J.; ADAMS, G.P. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.49, p.1-12, 1997.

BETERIDGE, K.J. Reflections on the golden anniversary of the first embryo transfer to produce a calf. **Theriogenology**, v.53, p.3-10, 2000.

BETTERIDGE, K.J.; A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. **Animal Reproduction Science**, v.79, p.203-244, 2003.

BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; TRIBULO, H.E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R.J. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v.41, p.1555-1569, 1994.

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.

BOLAND, M.P.; LONERGAN, P.; O'CALLAGHAN, D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. **Theriogenology**, v.55, P.1323-40, 2001.

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRÍBULO, R.; TRÍBULO, H.; MAPLETOFT, R.J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v.57, p.53-72, 2002.

BUNGARTZ, L.; NIEMANN, H. Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, p.583-591, 1994.

CALLESEN, H.; GREVE, R.; CHRISTENSON, F. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. **Theriogenology**, v.27, p.217, 1987. (Abstract)

CASTRO NETO, A.S.; SANCHES, B.V.; BINELLI, M.; SENEDA, M.M.; PERRI, S.H.; GARCIA, J.F. Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. **Theriogenology**, v.63, p.1249-1255, 2005.

COSCIONI, A.C.; PEGORARO, L.M.C.; PIMENTEL, C.A.; FISCHER, V.; SANTOS, J.E.P.; STUMPF JUNIOR, W.; Diferentes níveis de gordura na dieta de vacas Jersey em lactação influenciam a resposta superovulatória? **Ciência Rural**, v.35, p.644-649, 2005.

DROST, M.; BRAND, A.; AARTS, M.H. A device for non-surgical recovery of bovine embryos. **Theriogenology**, v.6, p.503-507, 1976.

FIGUEIRA, E.L.M.; RIGOLON, L.P.; PRADO, I.N.; CAVALIERI, F.L.B.; SCOMPARIN, V.X.; NASCIMENTO, W.G.; CANALLI JUNIOR, I.C. Efeito da condição corporal sobre as alterações metabólicas, hormonais, produção e viabilidade de embriões em vacas nelore recebendo *flushing* nutricional. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.27, p.11-16, 2005.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v.50, p.225-232, 1994.

GINTHER, O.J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, p.223-230, 1989.

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.55, p.1187-1194, 1996.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; KULICK, L.J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, v.52, p.1079-1093, 1999.

GUIBAULT, L.A.; GRASSO, F.; LUSSIER, J.G.; ROUILLIER, P.; MATTON, P. Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.91, p.81-89, 1991.

GONZALEZ, A.; LUSSIER, J.G.; CARRUTHERS, T.D.; MURPHY, B.D.; MAPLETOFT, R.J. Superovulation of beef heifers with Folltropin: A new FSH preparation containing reduced LH activity. **Theriogenology**, v.33, p.519-529, 1990.

HAHN, J. Attempts to explain and reduce variability of superovulation. **Theriogenology**, v.38, p.269-275, 1992.

HASLER, J.F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.79, p.245-264, 2003.

HASLER, J.F. The Holsten cow in embryo transfer today as compared to 20 years ago. **Theriogenology**, v.65, p.4-16, 2006.

HAY, J.H.; PHELPS, D.A.; HANKS, D.R.; FOOTE, W.D. Sequential uterine horn versus simultaneous total uterine flush to recover bovine embryos non-surgically. **Theriogenology**, v.33, p.563-567, 1990.

HEAPE, W. Further note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. **Proc. Roy. Soc. London**, v.62, p.178-183, 1897.

HUHTINEN, M.; RAINIO, V.; AALTO, J.; BREDBACKA, P.; MÄKI-TANILA, A. Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. **Theriogenology**, v.37, n.2, p.457-463, 1992.

KANITZ, W.; BECKER, F.; SCHNEIDER, F. Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. **Reproduction Nutrition and Development**, v.42, p.587-599, 2002.

KIM, I.H.; SON, D.S.; YEON, S.H.; CHOI, S.H.; PARK, S.B.; RYU, I.S.; SUH, G.H.; LEE, D.W.; LEE, C.S.; LEE, H.J.; YOON, J.T. Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in holstein cows. **Theriogenology**, v.55, p.937-945, 2001.

KO, J.C.; KASTELIC, J.P.; DEL CAMPO, M.R.; GINTHER, O.J. Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.91, p.511-519, 1991.

KOHRAM, H.; BOUSQUET, D.; DUROCHER, J.; GUILBAULT, L.A. Alteration of follicular dynamics and superovulatory responses by gonadotrophin releasing hormone and follicular puncture in cattle: a field trial. **Theriogenology**, v.49, p.1165-1174, 1998.

MAPLETOFT, R.J. Bovine Embryo Transfer. **IVIS Reviews in Veterinary Medicine, (Ed.) International Veterinary Information Service**, Ithaca NY (www.ivis.org), Last updated: 17-Nov-2006.

- MAPLETOFT, R.J.; STEWARD, K.B.; ADAMS, G.P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reproduction Nutrition and Development**, v.42, p.601-611, 2002.
- MARTINEZ, M.F.; ADAMS, G.P.; BERGFELT, D.R.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, J.P. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. **Animal Reproduction Science** v.57, p.23-33, 1999.
- MARTINEZ, M.F.; ADAMS, G.P.; KASTELIC, J.P.; BERGFELT, D.R.; MAPLETOFT, R.J. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. **Theriogenology**, v.54, p.757-769, 2000.
- MIKKOLA, M.; MÄNTYSAARI, P.; TAMMIRANTA, N.; PEIPPO, J.; TAPONEN, J. Effect of dietary protein on embryo recovery rate and quality in superovulated heifers. **Animal Reproduction Science**, v.87, p.193–202, 2005.
- NASSER, L.F.; ADAMS, G.P.; BO, G.A.; MAPLETOFT, R.J. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. **Theriogenology**, v.40, n.4, p.713-724, 1993.
- NOLAN, R.; O'CALLAGHAN, D.; DUBY, R.T.; LONERGAN, P.; BOLAND, M.P.; **Theriogenology**, v.50, p.1263-1274, 1998.
- PHILLIPPO, M.; ROWSON, L.E.A. Prostaglandins and superovulation in the bovine. **Ann Biol Anim Biochim Biophys**, v.15, p.233-240, 1975.
- PIETERSE, M.C.; KAPPEN, K.A.; KRUIP, Th.A.M.; TAVERNE, M.A.M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, v.30, p.1, 1988. (Abstract).
- PIETERSE, M.C.; VOS, P.L.A.M.; KRUIP, TH.A.M.; WURTH, Y.A.; VAN BENEDEN, TH.H.; WILLEMSE, A.H.; TAVERNE, M.A.M. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.35, p.857-862, 1991.
- RUBIN, M.I.B. Histórico dos 20 anos da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (1985-2005) **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33 (Supl 1), p.35-54, 2005.
- SARTORI, R.; SUÁREZ-FERNÁNDEZ, C.A.; MONSON, R.L.; GUENTHER, J.N.; ROSA, G.J.M.; WILTBANK, M.C. Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. **Theriogenology**, v.60, p.1319-1330, 2003.
- SAS. SAS User's Guide: Statistics. **SAS Institute**, INC, Cary, NC 2005.
- SHAW, D.W.; GOOD, T.E. Recovery rates and embryo quality following dominant follicle ablation in superovulated cattle. **Theriogenology**, v.53, p.1521-1528, 2000.
- SINGH, J.; DOMÍNGUEZ, M.; JAISWAL, R.; ADAMS, G.P. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. **Theriogenology**, v.62, p.227-243, 2004.

STOCK, A.E.; ELLINGTON, J.E.; FORTUNE, J.E. A dominant follicle does not affect follicular recruitment by superovulatory doses of FSH in cattle but can inhibit ovulation. **Theriogenology**, v.45, p.1091-1102, 1996.

THIBIER, M. Stabilization of numbers of *in vivo* collected embryos in cattle but significant increases of *in vitro* bovine produced embryos in some parts of the world. **Embryo Transfer Newsletter – IETS**, v.22, n.4, p.12-19, 2004.

THIBIER, M. Transfers of both *in vivo* derived and *in vitro* produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species in 2005. **IETS Newsletter** v.24, n.4, p.12-18, 2006.

Veja. 1979. Nasceu Eureka. **Revista Veja**. São Paulo/SP. 12 set: 92. home page: www.vejaonline.abril.com.br.

ANEXO

- Fotos do dispositivo utilizado na ablação folicular:

