

Influência do folículo dominante sobre a dinâmica folicular ovariana em vacas Nelore tratadas com FSH

Influence of the dominant follicle on the ovarian follicular dynamics in Nelore cows treated with FSH

Adriana GRADELA¹; Ramon MALHEIROS²; Elizabeth Crisciolo URBINATTI²;
José Carlos BARBOSA³; Ivo Luís de ALMEIDA JR¹; César Roberto ESPER¹

CORRESPONDÊNCIA PARA:
César Roberto Esper
Departamento de Medicina Veterinária
Preventiva e Reprodução Animal
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias da UNESP
Campus de Jaboticabal
Via de Acesso Prof. Paulo Donato
Castellane, s/n
14884-900 – Jaboticabal – SP
e-mail: cresper@fcav.unesp.br

1-Departamento de Medicina Veterinária
Preventiva e Reprodução Animal da
UNESP, Jaboticabal – SP
2-Departamento de Fisiologia da
UNESP, Jaboticabal – SP
3-Departamento de Estatística da
UNESP, Jaboticabal – SP

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram: 1) determinar o diâmetro máximo e a taxa de crescimento do folículo dominante (FD) em vacas Nelore; 2) determinar o intervalo entre a administração de PGF_{2α} e as manifestações de estro; 3) investigar a influência da remoção do FD sobre o número de corpos lúteos (CL) e folículos não ovulados (FNO) determinados por ultra-sonografia (CLus e FNOus); e 4) determinar as concentrações de progesterona (P4 ng/ml) e estradiol-17β (E2 pg/ml) em vacas Nelore submetidas a superovulação com FSH. Após os exames ultra-sonográficos no D0 (48 horas antes do início da superovulação), 42 vacas Nelore foram divididas em 3 grupos experimentais: GI (sem FD, n = 15), GII (com FD, n = 15), e GIII (com FD aspirado, n = 12). Sete dias após a primeira inseminação artificial (D6), foi determinado o número de CL e FNO e colhidos os embriões (D13). Amostras de sangue foram colhidas em D0, D2, D4 (injeção de PGF_{2α}), D6 e D13. Os resultados permitem concluir que, embora o diâmetro máximo e a taxa de crescimento apresentados pelos FD tenham sido semelhantes aos descritos previamente em doadoras européias, na raça Nelore a ação do FD sobre a dinâmica folicular ovariana ocorre de maneira diferente.

UNITERMOS: Folículo ovariano; FSH; Gado Nelore; Ultra-sonografia.

INTRODUÇÃO

O controle fisiológico do recrutamento, seleção, crescimento, dominância e atresia de folículos ovarianos ainda não está claramente entendido em bovinos. Com o uso da ultra-sonografia os estudos têm progredido rapidamente e resultados mais confiáveis e esclarecedores têm sido obtidos, tornando-se este método o ideal para monitoramento do desenvolvimento folicular¹⁵.

Em bovinos tem sido relatada a existência de 2^{7,8}, 3^{7,16,26} e até 4²⁴ ondas de crescimento e desenvolvimento folicular durante um único ciclo estral, sendo o folículo pré-ovulatório derivado da última onda¹⁹.

Guilbault *et al.*¹³, Huhtinen *et al.*¹⁵ e Bungartz e Niemann³ verificaram diminuição nos números de corpos lúteos (CL), estruturas recuperadas (ER) e embriões transferíveis (ET) em fêmeas européias superovuladas na presença de um folículo dominante (FD). Por outro lado, Staigmiller *et al.*²⁷, superovulando vacas e novilhas européias, não observaram influência da presença de um grande folículo morfologicamente dominante sobre a taxa ovulatória e o

número de ET, e Gray *et al.*¹² obtiveram resultados semelhantes com relação ao número de ER. A despeito da menor resposta superovulatória observada em animais com FD no início da superovulação, Bungartz e Niemann³ verificaram que a aspiração do FD, dois dias antes do início do tratamento superovulatório, produziu respostas comparáveis àquelas de animais superovulados na ausência de um FD.

A despeito destes fatores, diferenças nas respostas superovulatórias de doadoras das subespécies *Bos taurus* e *Bos indicus* têm sido relatadas⁶. Entretanto, devido à inexistência de estudos sobre a influência do FD na resposta superovulatória de fêmeas *Bos indicus*, este estudo teve por objetivo: 1) determinar o diâmetro máximo atingido pelo FD e sua taxa de crescimento; 2) determinar o intervalo entre a administração de PGF_{2α} e as manifestações de estro; 3) investigar a influência do folículo dominante sobre o número de corpos lúteos e de folículos não ovulados (FNO) determinados por ultra-sonografia (CLus e FNOus); e 4) determinar as concentrações de progesterona (P4 ng/ml) e estradiol-17β (E2, pg/ml), após superovulação com FSH, em vacas Nelore com FD, sem FD e com FD aspirado.

MATERIALE MÉTODO

Quarenta e duas vacas Nelore, com idades de 3 a 13 anos, foram selecionadas como doadoras de embriões após a detecção de um CL nos ovários e de ausência de anormalidades reprodutivas aparentes. Estas fêmeas foram mantidas a campo, recebendo sal mineral *ad libitum* e suplementação quando necessário, de acordo com suas exigências nutricionais.

Os ovários foram examinados por ultra-sonografia (Scanner 200 Vet; Pie Medical, Maastricht, Netherlands), utilizando-se as frequências de 5,0/7,5 MHz, 48 horas antes do início do tratamento superovulatório (D0), no dia do início da superovulação (D2) e no dia da colheita dos embriões (D13). Os animais foram divididos em três grupos: GI, sem FD (FND, n = 15); GII, com FD (FD, n = 15) e GIII, com FD aspirado (FDA, n = 12). Um folículo foi classificado como não dominante quando 10 ou mais folículos de 3-8 mm estavam presentes em ambos os ovários e como dominante quando menos do que 10 folículos de 3-8 mm estavam presentes³. Todos os exames ultra-sonográficos foram registrados em papel fotográfico (Vídeo Print P67, ECG) para análise posterior e sem o conhecimento dos resultados do tratamento superovulatório.

No GIII, a aspiração do FD foi realizada segundo a técnica descrita por Bols *et al.*². Para a confirmação de dominância funcional como proposto por Sunderland *et al.*²⁹, os líquidos foliculares aspirados foram centrifugados imediatamente após a colheita e estocados a -20°C para posterior análise das concentrações de P4 e de E2.

Dois dias após a primeira avaliação ultra-sonográfica (D2), a superovulação foi induzida com 8 injeções intramusculares de FSH (Pluset, Serovet, Roma, Itália) administradas em doses decrescentes, duas vezes ao dia, por 4 dias consecutivos (manhã/tarde: 62,5 UI/62,5 UI; 52,5 UI/52,5 UI; 35 UI/35 UI e 25 UI/25 UI; dose total de 350 UI). A luteólise foi induzida simultaneamente com a sexta injeção de FSH (D4), utilizando-se injeção única de 1,0 mg de PGF_{2α} (Ciosin, Coopers, Brasil). Inseminações artificiais foram realizadas com intervalos de 14, 20, 26 e 32 horas após a primeira visualização de estro (D6). No dia da colheita dos embriões (7 dias após o estro superovulatório, D13), o número de CL e de FNO foi determinado por ultra-sonografia (CLus e FNOus); os embriões foram colhidos pelo método não-cirúrgico²² e avaliados^{1,18}, sendo posteriormente transferidos cirurgicamente ou submetidos à congelação.

Amostras de sangue (10 ml) foram colhidas por venopunção da jugular externa utilizando-se tubos *vacutainer* (BECTON & DICKSON, USA) heparinizados para determinação das concentrações plasmáticas de P4 e intrafoliculares de P4 e E2 e não heparinizados para determinação das concentrações séricas de E2, nos dias D0, D2, D4, D6 e D13. Imediatamente após a colheita, as

amostras de sangue e de líquido folicular foram centrifugadas (2.500 rpm) e estocadas a -20°C até a análise das concentrações hormonais, para as quais foi utilizado RIE de fase sólida direta (Coat-A-Count TKPG para a P4 e Coat-A-Count TKE para o E2, DPC, Los Angeles, CA, USA), seguindo-se as instruções do fabricante. A sensibilidade dos ensaios de P4 plasmática e intrafolicular foi de 0,12 ng/ml e de 0,08 ng/ml, respectivamente, enquanto os erros intra e interensaios variaram de 3,50% a 13,20% e de 4,30 a 14,80%, respectivamente. A sensibilidade do ensaio de E2 sérico e intrafolicular foi de 5,00 pg/ml e de 0,02 ng/ml, respectivamente, enquanto os erros intra e interensaios variaram de 4,00 a 7,00% e de 4,20 a 8,10%, respectivamente.

Quando o teste F foi significativo, utilizou-se o teste de Tukey aproximado ao nível de 5% de significância²⁸. Os dados estão apresentados em valores de média ± erro padrão da média (EPM).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todos os fluidos foliculares aspirados de folículos classificados como dominantes no GIII, a proporção de E2:P4 foi superior a 1,0 pg/ml. Estes resultados confirmaram a dominância funcional e não apenas morfológica destes folículos²⁹.

O diâmetro máximo do maior folículo determinado no D0 (2 dias antes do início da superovulação) não diferiu entre os grupos e está exibido na Tab. 1. No GII, o diâmetro do FD foi menor ($p < 0,05$) no D0 ($9,60 \pm 1,32$ mm) em relação ao D2 ($12,30 \pm 0,13$ mm) e apresentou um crescimento médio diário de 1,35 mm. Os diâmetros máximos dos folículos dominantes (FD) observados neste estudo ($11,80$ a $13,60$ mm) foram similares àqueles relatados por Figueiredo *et al.*⁷ em vacas *Bos taurus indicus* (10 a 12 mm) mas menores que os descritos em novilhas *Bos taurus taurus* (14 a 20 mm) por Savio *et al.*²⁵ e em vacas *Bos taurus taurus* (15 a 18 mm) por Murphy *et al.*²¹. A taxa de crescimento do FD observada entre o D0 e D2 (1,35 mm/dia) foi semelhante à relatada por Sirois; Fortune²⁶ e por Knopf *et al.*¹⁷, e menor que a verificada por Savio *et al.*²⁵ e por Murphy *et al.*²¹ em vacas europeias, mas foi maior que a descrita em vacas zebu por Figueiredo *et al.*⁷.

O intervalo entre a administração de PGF_{2α} e as manifestações de estro não diferiram entre os grupos (Tab.1). A porcentagem de fêmeas que apresentaram estro na época esperada (até 48 horas após a administração de PGF_{2α}) foi de 93%. Estes resultados concordam com os relatados por Gradela *et al.*⁹ na raça Nelore, os quais observaram que 100% das doadoras que recebiam PGF_{2α} durante a superovulação com FSH exibiam estro na época esperada. Entretanto, são diferentes dos resultados de Hassler *et al.*¹⁴ e de Donaldson *et al.*⁶ em vacas *Bos taurus taurus* e de Coelho *et al.*⁵ em vacas *Bos taurus indicus*, que verificaram um número

expressivo de doadoras não apresentando estro após a PGF_{2α}.

As 3 doadoras que não manifestaram sinais de estro (7%) foram mantidas no estudo e apresentaram concentrações de P4 e de E2, bem como respostas superovulatórias (CL, ER e ET), semelhantes às demais. Estes resultados levam ao questionamento da eficiência dos sistemas de visualização de estro, pois sua não visualização pode não indicar ausência de luteólise, mas sim erros de detecção, ocorrência de estros noturnos²³ ou mesmo representar característica do próprio animal. Métodos adicionais de detecção de estro como o uso de rufões com sistema marcador e determinação das concentrações de P4 no leite poderiam evitar estes erros.

O número médio de CLus e de FNOs não diferiu entre os grupos estudados (Tab. 1). A avaliação ultrasonográfica tem sido o método de eleição para a avaliação da resposta ovulatória em fêmeas superovuladas, uma vez que a palpação retal foi julgada como imprecisa, particularmente quando mais do que 10 CL estavam presentes

nos ovários²⁰. Por outro lado, os resultados deste estudo contradizem os descritos em raças européias em que a presença de um FD no início do tratamento superovulatório causou diminuição na taxa de ovulação^{3,11,13,16,20}. Segundo esses autores, isto ocorreu porque o FD atrasou o aparecimento e reduziu o número de folículos maiores ou iguais a 7 mm de diâmetro. Os resultados deste estudo permitem inferir que, na raça Nelore, o FD não tem o mesmo efeito sobre o aparecimento e o número de folículos maiores ou iguais a 7 mm e que, portanto, a dinâmica folicular ovariana se processa de maneira diferente.

As concentrações plasmáticas de P4 (ng/ml) não diferiram entre os grupos nos dias D0, D2, D4 e D6, enquanto no D13 elas não diferiram entre GI e GII ou entre GII e GIII, mas foram maiores no GI comparadas ao GIII (Tab. 2). No dia do estro (D6), as concentrações de P4 foram menores que as observadas nos outros dias em todos os grupos, enquanto no D13 elas foram as mais elevadas,

Tabela 1

Diâmetro máximo do folículo dominante (FD, mm), intervalo entre administração de PGF_{2α} e o estro (PGF_{2α}-estro), corpos lúteos (CL) e folículos não ovulados (FNO) determinados por ultra-sonografia (us), em vacas Nelore tratadas com FSH.

	GI (FND) (n = 15)	II (FD) (n = 15)	GIII (FDA) (n = 12)
Diâmetro máximo do FD (mm)	12,60 ± 0,40 ^a	12,30 ± 0,50 ^a	13,10 ± 0,50 ^a
PGF _{2α} -estro (h)	42,86 ± 2,43 ^a	40,89 ± 2,43 ^a	43,17 ± 2,71 ^a
CLus	13,33 ± 0,94 ^{Aa}	11,60 ± 0,67 ^{Ba}	10,83 ± 1,27 ^{Aa}
FNOs	1,27 ± 0,59 ^{Ba}	2,27 ± 0,54 ^{Aa}	1,83 ± 0,54 ^{Aa}

^{a,b} Valores na mesma linha e ^{A,B} valores na mesma coluna diferiram pelo teste de Tukey (p < 0,05). (Nova Índia Genética, junho a dezembro/1997).

Tabela 2

Concentrações plasmáticas de progesterona (ng/ml) observadas nos três grupos em cada dia estudado.

Dias Grupos	D0	D2	D4	D6	D13
GI	5,10 ± 0,36 ^{Aa}	6,12 ± 0,51 ^{Aa}	7,05 ± 0,57 ^{Aa}	0,48 ± 0,07 ^{Ab}	30,44 ± 2,70 ^{A,c}
II	4,91 ± 0,36 ^{Aa}	6,18 ± 0,51 ^{Aa}	7,46 ± 0,64 ^{Aa}	0,56 ± 0,07 ^{Ab}	20,82 ± 2,70 ^{A,Bc}
GIII	4,95 ± 0,39 ^{Aa}	5,65 ± 0,53 ^{Aa}	6,84 ± 0,67 ^{Aa,c}	0,45 ± 0,07 ^{Ab}	11,00 ± 3,08 ^{Bc}

^{a,b,c} valores na mesma linha e ^{A,B} valores na mesma coluna diferiram pelo teste de Tukey (p < 0,05). D0 = primeira avaliação ultra-sonográfica, D2 = início da superovulação, D4 = administração de PGF_{2α}, D6 = estro da superovulação, D13 = colheita dos embriões. (Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, março/1998).

Tabela 3

Concentrações séricas de estradiol-17β (pg/ml) observadas nos três grupos em cada dia estudado.

Dias Grupos	D0	D2	D4	D6
GI	11,21 ± 4,04 ^{Aa}	5,54 ± 2,56 ^{Aa}	8,28 ± 2,04 ^{Aa}	44,38 ± 8,14 ^{Ab}
II	5,68 ± 4,04 ^{Aa}	5,97 ± 3,62 ^{Aa}	6,23 ± 2,63 ^{Aa}	53,69 ± 9,40 ^{Ab}
GIII	21,61 ± 5,71 ^{Aa,b}	6,10 ± 3,62 ^{Aa}	7,03 ± 2,04 ^{Aa}	52,94 ± 11,51 ^{Ab}

^{a,b} valores na mesma linha e ^{A,B} valores na mesma coluna diferiram pelo teste de Tukey (p < 0,05). D0 = primeira avaliação ultra-sonográfica, D2 = início da superovulação, D4 = administração de PGF_{2α}, D6 = estro da superovulação. (Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, maio/1998).

exceto no GIII, onde elas não diferiram das concentrações observadas no D4 (Tab. 2).

As concentrações séricas de E2 não diferiram entre os grupos GI, GII e GIII em nenhum dos dias estudados (Tab. 3). Não diferiram nos dias D0, D2 e D4, mas foram maiores no D6 em relação aos demais, exceto no GIII, onde elas não diferiram dos valores observados no D0.

A ausência de diferenças significativas entre a resposta ovulatória e as concentrações de P4 e de E2 observadas entre os grupos do presente estudo está em desacordo com o relatado em vacas zebu¹⁰ e européias⁴, em que foi verificada a existência de duas populações diferentes de doadoras: aquelas com níveis normais de P4 (P4 < 1,0 ng/ml com 24 e 48 horas após a administração de PGF_{2α}) e as com níveis anormais (P4 > 1,0 ng/ml nestes dias), tendo sido a viabilidade

das ER significativamente maior nas primeiras.

Pelos resultados do presente estudo, pode-se concluir que, embora o folículo dominante apresente diâmetros e taxas de crescimento diário semelhantes aos de animais de raças européias, na raça Nelore ele atua de modo diferente sobre o recrutamento de folículos potencialmente ovulatórios e, conseqüentemente, sobre a dinâmica folicular ovariana.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP pelo suporte financeiro; à Dalmares pela assistência no laboratório e à Nova Índia Genética S.A. pelo fornecimento das vacas, aos médicos veterinários Sérgio P.M. Matos, Juliana A. Lanza e Luís Alfredo G. Deragon.

SUMMARY

The objectives of this study were: (1) to determine the maximum diameter and the growth rate of the dominant follicle (DF) in Nelore cows; (2) to determine the interval between PGF_{2α} administration and the manifestation of estrus; (3) to investigate the influence of the DF removal on the number of corpora lutea (CL) and non-ovulated follicles (NOF) determined by ultrasonography (CLus and NOFus); and (4) to determine the progesterone (P4; ng/ml) and estradiol-17b (E2; pg/ml) concentrations in Nelore cows submitted to superovulation with FSH. After ultrasonographic examinations on D0 (48 hours before the beginning of the superovulatory treatment), 42 Nelore donors were divided into three experimental groups: GI (without a DF, n = 15), GII (with a DF, n = 15), and GIII (with an aspirated DF, n = 12). Seven days after the first artificial insemination (D6) the number of CL and NOF was determined and the embryos collected (D13). Blood samples were collected on D0; D2; D4 (PGF_{2α} injection), D6 and D13. The results permit to conclude that although the maximum diameter and the growth rate of the DF were similar to those previously observed in European donors, in the Nelore breed it acts in a different manner on the ovarian follicular dynamic.

UNITERMS: Ovarian follicle; FSH; Nelore; Ultrasonography.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- BOLAND, M.P.; CROSBY, T.F.; GORDON, I. Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG. **Theriogenology**, v.10, p.175-80, 1978.
- 2- BOLS, P.E.J.; VADENHEED, J.M.M.; VAN SOON, A.; KRUIF, A. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. **Theriogenology**, v.42, p.677-87, 1995.
- 3- 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.583-91, 1994.
- 4- CALLESEN, H.; GREVE, T.; HYTTEL, P. Preovulatory evaluation of the superovulatory response in donor cattle. **Theriogenology**, v.30, n.3, p.477-88, 1988.
- 5- COELHO, S.G. **Transferência de embriões em raças zebuínas**. 1988. 54 f. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- 6- DONALDSON, L.E. Cattle breed as a source of variation in embryo transfer. **Theriogenology**, v.21, p.1013-8, 1984.
- 7- FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L.; SOLER, J.M.P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47, p.1489-505, 1997.
- 8- GINTHER, O.J.; KNOPE, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycle with two or three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, p.223-30, 1989.
- 9- GRADELA, A.; ESPER, C.R.; ROSA E SILVA, A.A.M. Relationship between plasma 17b-estradiol on the day of estrus and number of viable embryos in *Bos indicus* (Nelore) cows superovulated with FSH. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.27, p.1663-8, 1994.
- 10- GRADELA, A.; ESPER, C.R.; ROSA E SILVA, A.A.M. Plasma concentrations of progesterone, 17B-estradiol and androstenedione and superovulatory response of Nelore cows (*Bos indicus*) treated with FSH. **Theriogenology**, v.45, p.843-50, 1996.
- 11- GRASSO, F.; GUILBAULT, L.A.; ROY, G.L.; MATTON, P.; LUSSIER, J.G. The influence of the presence a dominant follicle at the time of initiation of a superovulatory treatment on superovulatory responses in cattle. **Theriogenology**, v.31, n.1, p.199, 1989.
- 12- GRAY, B.W.; CARTEE, R.E.; STRIGFELLOW, D.A. RIDDELL, K.P.; WRIGHT, J.C. The effects of FSH-priming and dominant follicular regression on the superovulatory response of cattle. **Theriogenology**, v.37, n.3, p.631-9, 1992.

GRADELA, A.; MALHEIROS, R.M.; URBINATTI, E.C.; BARBOSA, J.C.; ALMEIDA JR., I.L.; ESPER, C.R. Influência do folículo dominante na dinâmica folicular ovariana em vacas Nelore tratadas com FSH. **Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 326-330, 2000.

- 13- GUILBAULT, 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, n.1, p.81-9, 1991.
- 14- HASSLER, Y.F. Superovulatory responses of Holstein cows. **Theriogenology**, v.19, p.83-99, 1983.
- 15- HUHTINEN, M.; RAINIO, V.; ALTO, J.; BREDBACKA, P.; MAKI-TANILA, A. Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. **Theriogenology**, v.37, n.2, p.457-63, 1992.
- 16- IRELAND, J.; ROCHE, J.F. Hypotheses regarding development of dominant follicles during a bovine estrous cycle. In: ROCHE, J.R.; O'CALLAGHAN, D. **Follicular growth and ovulation rate in farm animals**. Dordrecht : Martinus Nijhoff, 1987. p.1-18.
- 17- KNOF, L.; KASTELIC, J.P.; SCHALLENBERGER, E.; GINTHER, O.J. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v.6, p.111-9, 1989.
- 18- LINDNER, G.M.; WRIGHT JR., W. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenology**, v.20, n.4, p.407-16, 1983.
- 19- LUCY, M.C.; SAVIO, J.D.; BADINGA, R.; De La SOTA, R.L.; THATCHER, W.W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, v.70, n.11, p.3615-26, 1992.
- 20- MONNIAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. Superovulatory responses of cattle. **Theriogenology**, v.19, n.1, p.55-81, 1983.
- 21- MURPHY, M.G.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef sucler cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.90, p.523-33, 1990.
- 22- NEWCOMB, R.; CHRISTIE, W.B.; ROWSON, L.E.A. Non surgical recovery of bovine embryos. **Veterinary Record**, v.102, p.414-7, 1978.
- 23- PINHEIRO, O.L.; BARROS, C.M.; FIGUEIREDO, R.A.; VALLE, E.R.; ENCARNAÇÃO, R.O.; PADOVANI, C.R. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2alpha or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v.49, p.667-81, 1998.
- 24- RHODES, F.M.; DE'ARTH, G.; ENTWISTLE, K.W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. **Animal Reproduction Science**, v.38, p.265-77, 1995.
- 25- SAVIO, J.D.; KNEENAN, L.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Pattern of growth of dominant follicles during the estrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.83, n.2, p.663-71, 1988.
- 26- SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biology of Reproduction**, v.39, p.308-17, 1988.
- 27- STAIGMILLER, R.B.; MacNEIL, M.D.; BELLOWS, R.A.; SHORT, R.E.; PHELPS, D.A. The effect of estrus synchronization scheme, injection protocol and large ovarian follicle on response to superovulation in beef heifers. **Theriogenology**, v.43, p.823-34, 1995.
- 28- STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. Principles and procedures of statistics. New York : McGraw-Hill Book, 1980. 633p.
- 29- SUNDERLAND, S.J.; CROWE, M.A.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F.; IRELAND, J.J. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, p.547-55, 1994.

Recebido para publicação: 14/05/1999
Aprovado para publicação: 07/01/2000