

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES DE  
VACAS NELORE (*B. taurus indicus*) SUPEROVULADAS**

**João Carlos Cardoso da Silva**

Médico Veterinário

Jaboticabal – São Paulo – Brasil

2002

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES DE VACAS  
NELORE (*B. taurus indicus*) SUPEROVULADAS**

**João Carlos Cardoso da Silva**

Orientador: Prof. Dr. Rafael Herrera Alvarez

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – UNESP, para obtenção do Título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal.

Jaboticabal - SP  
Dezembro de 2002

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**JOÃO CARLOS CARDOSO DA SILVA** – filho de Manoel Cardoso da Silva e Dorvalina Pereira da Silva, nascido em 13 de janeiro de 1962, em Aquidauana-MS, é Médico Veterinário formado pela Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – Campo Grande, em dezembro de 1983. Obteve o grau de Especialista em Administração Rural pela Universidade Federal de Viçosa em parceria com a Associação Brasileira de Ensino Agrícola Superior, em novembro de 1995. Trabalhou na Iniciativa Privada de 1984 a 1986. Trabalhou como professor do ensino técnico profissionalizante e responsável pelo setor agropecuário na Fundação BRADESCO, no período de outubro de 1986 a março de 1989 e, na Fundação CERA no período de abril de 1989 a abril de 1994. É docente na Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Unidade de Ensino de Aquidauana desde maio de 1994.

## DEDICATÓRIA

À minha esposa Ana Jane e aos meus filhos Tainá Maria e Kauê de Lucas, pela compreensão e estímulo durante o período afastado da residência, mesmo quando estava presente.

À minha mãe que juntamente com meu pai (*in memoriam*), que de uma maneira ou outra sempre me estimularam aos estudos, afirmando que o mesmo seria a minha herança.

## AGRADECIMENTOS

- ❖ À UNESP – FCAV Câmpus de Jaboticabal, Departamento de Reprodução Animal pela oportunidade oferecida
- ❖ Ao Dr. Rafael Herrera Alvarez, pela confiança depositada, orientação e amizade
- ❖ Ao Médico Veterinário Carlos Alberto Zanenga pela autorização em utilizar os dados das coletas
- ❖ Ao Professor Dr. Gener Tadeu Pereira pela introdução na ciência da estatística e auxílio nas análises desenvolvidas
- ❖ Ao Professor MSc. Henrique Jorge Fernandes pelo auxílio nas análises desenvolvidas
- ❖ Ao “irmão” MSc. Antonio Campanha Martinez pelo auxílio prestado nas etapas da capacitação
- ❖ Aos pesquisadores e funcionários do Laboratório de Reprodução Animal do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa pela amizade e carinho
- ❖ A UEMS, apesar dos pesares, pelo afastamento concedido durante a Pós Graduação
- ❖ Aos professores da UEMS - Unidade de Ensino de Aquidauana, em especial ao Professor Dr. Alfredo Raúl Ábot e sua esposa Professora MSc. Carolina da Silva Barbosa pelo apoio e incentivo
- ❖ Agradeço a todos que me auxiliaram no desenvolver da minha capacitação
- ❖ Agradeço a DEUS pelo início e encerramento com sucesso de mais uma etapa da minha vida

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DAS TABELAS .....	viii
LISTA DAS FIGURAS .....	ix
RESUMO .....	x
SUMMARY .....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Aspectos fisiológicos do crescimento folicular em bovinos .....	3
2.2. Condição ovariana e reprodutiva em função da idade .....	4
2.3. Variabilidade da resposta aos tratamentos de superovulação.....	5
2.3.1. Fatores de variação intrínsecos ao animal.....	6
2.3.1.1. Raça.....	6
2.3.1.2. Dominância folicular .....	7
2.3.1.3. Idade .....	8
2.3.1.4. População de folículos .....	9
2.3.1.5. Nutrientes.....	9
2.3.1.6. Patologias .....	10
2.3.2. Fatores de variação extrínsecos ao animal.....	10
2.3.2.1. Hormônio e dose .....	10
2.3.2.2. Estação do ano.....	12
2.3.2.3. Propriedade .....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Descrição dos dados .....	13
3.2. Parâmetros analisados .....	15
3.3. Análise estatística .....	16
4. RESULTADOS .....	17
5. DISCUSSÃO .....	29
6. CONCLUSÕES .....	34
7. REFERÊNCIAS.....	35
8. APÊNDICE .....	44
8.1. Apêndice A .....	45

**LISTA DE TABELAS**

	<b>Página</b>
TABELA 1	Resultado da coleta de embriões de vacas Nelore submetidas ao tratamento de superovulação .....20
TABELA 2	Total de estruturas e embriões transferíveis coletados em vacas Nelore submetidas a superovulações repetidas .....20
TABELA 3	Resultado da coleta de embriões de vacas Nelore submetidas a um ou mais tratamentos de superovulação .....23
TABELA 4	Total de estruturas e embriões transferíveis coletados em função das classes de idade .....25
TABELA 5	Taxa de prenhez das receptoras em função da classe de idade das doadoras.....26
TABELA 6	Total de estruturas e embriões transferíveis coletados nas propriedades.....26
TABELA 7	Número de embriões transferíveis coletados em função da propriedade interagindo com as classes de idade.....27
TABELA 8	Total de estruturas e embriões transferíveis coletados em função do tipo de hormônio e da dose de superovulação.....28
TABELA 9	Total de estruturas e embriões transferíveis coletados em função dos hormônios utilizados.....28
TABELA 10	Total de estruturas e embriões transferíveis coletados em diferentes estações do ano.....29
TABELA 11	Total de estruturas e embriões transferíveis coletados em função do dia em que iniciou o protocolo de superovulação... ..29

## LISTA DE FIGURAS

		<b>Página</b>
FIGURA 1 -	Desempenho de vacas Nelore submetidas à superovulação única e coleta de embriões .....	19
FIGURA 2 -	Desempenho de vacas Nelore submetidas a uma ou mais superovulações e coleta de embriões .....	22
FIGURA 3 -	Gráfico da equação de regressão para total de estruturas e embriões transferíveis coletados em função da idade contínua linear e quadrática.....	23
FIGURA 4 -	Gráfico da equação de regressão para total de estruturas e embriões transferíveis coletados em função da idade contínua linear.....	24
FIDURA 5 -	Gráfico da equação de regressão para total de estruturas e embriões transferíveis coletados em função da idade contínua quadrática.....	24
FIGURA 6 -	Gráfico da equação de regressão para o percentual de receptoras gestante em função da idade contínua linear das doadoras.....	25

## **Fatores que Influenciam a Produção de Embriões de Vacas Nelore (*B. taurus indicus*) Superovuladas**

**RESUMO** – Fatores como idade, dose e tipo de hormônio utilizado na superovulação, início do tratamento de superovulação, uso de progestágeno, estação do ano, propriedade e superovulação repetida foram relacionados com a produção de embriões de vacas Nelore. Os dados analisados envolveram 884 tentativas de superovulação em 318 doadoras com idade entre dois e 21 anos, manejadas em seis propriedades localizadas no Estado de Mato Grosso do Sul. Os dados foram analisados utilizando o GLM do SAS. Dos fatores analisados, somente a idade das doadoras e a propriedade afetaram a produção e a qualidade dos embriões. Vacas senis (>14 anos) produziram, em média,  $5,0 \pm 0,2$  e  $3,0 \pm 0,1$  embriões (total e viáveis, respectivamente) a menos que vacas jovens ( $p < 0,001$ ), enquanto que um manejo diferenciado aumentou em aproximadamente  $2,0 \pm 0,4$  o número de embriões viáveis. O tipo de hormônio (Pluset<sup>TM</sup>, Super-Ov<sup>TM</sup>, Ovagen<sup>TM</sup>, FSH-P<sup>TM</sup>) ou dosagem (50, 75 ou 100%) utilizada na superovulação não influenciou a produção de embriões ( $p > 0,05$ ). Não houve diferença da resposta quando o tratamento de superovulação foi iniciado entre os dias 8 a 12 do ciclo ( $p > 0,05$ ). A superovulação associada a um implante com progestágenos, iniciado a qualquer momento do ciclo, foi tão eficiente ( $p > 0,05$ ) quanto o tratamento convencional iniciado no meio do ciclo. Finalmente, constatou-se que a superovulação repetida por 6 ou mais vezes não afetou a produção ou qualidade dos embriões. Concluiu-se que o manejo e, a idade da doadora são fatores que devem ser considerados ao implementar um programa de transferência de embriões na raça Nelore, por limitar a produção de embriões nessa sub-espécie.

**Palavras-chave:** *Bos indicus*; FSH; Idade da doadora; Superovulação.

## **Factors Influencing the Embryo Production of Nelore Cows (*B. taurus indicus*) Superovulated**

**SUMMARY** – Factors such as age, dose and kind of superovulatory hormone, starting point of the superovulatory treatment, use of progestagens, season, property and repetition of superovulatory treatments were related to embryo production in Nelore cows. Analysed data comprised 884 superovulation attempts on 318 donor cows, with their ages ranging between two and 21 years, managed by six different property owners, in Mato Grosso do Sul State, Brazil. Data were analysed using the General Linear Model of SAS. Among all the studied factors, only the age of donor cows and the property affected embryo production and quality. Older cows (>14 years old) produced a mean of five and three embryos (total and viable, respectively) less than younger ones ( $p < 0,001$ ), and a better management (property) was responsible for a mean of two more viable embryos. The kind of superovulatory hormone (Pluset™, Super-Ov™, Ovagen™, FSH-P™) and its dose (50, 75 or 100%), did not affect embryo production ( $p > 0,05$ ). Superovulatory response wasn't different when treatments started on day 8, 9, 10, 11 or 12 of the cycle ( $p > 0,05$ ), nor when it began with a progestagen implant at any moment of the cycle, as compared to conventional treatments, beginning at the middle of the cycle ( $p > 0,05$ ). Finally, it was stated that repetition of six or more superovulatory treatments, didn't affect embryo production or quality. It is concluded that management, and specially age of the donors are factors to be taken into account when an embryo transfer program is to be performed in Nelore females, because they affect superovulatory performance in this breed of cows.

**Keywords** – Age of donor cows; *Bos indicus*; FSH; Superovulation.

## 1. INTRODUÇÃO

A transferência de embriões (TE) pode ser definida como o processo de colher um ou mais embriões, no início do desenvolvimento, de uma determinada fêmea (doadora) e transferi-los ao útero de outras fêmeas (receptoras) fisiologicamente sincronizadas com a doadora, para dar continuidade à prenhez. O principal uso da TE, em bovinos, está relacionada com o melhor aproveitamento da via materna em programas de melhoramento genético, sanitários, de preservação de espécies e zootécnicos. Igualmente, a TE também constitui uma ferramenta de grande valor para realizar estudos das relações feto-maternais, incluindo o estabelecimento, duração e manutenção da prenhez, bem como para a produção de animais experimentais especializados destinados à pesquisa, tais como gêmeos, quimeras e indivíduos de sexo conhecido, transgênicos e clonagens.

As fêmeas utilizadas como doadoras em programas de TE são, na maioria das vezes, animais adultos de comprovado valor genético, apresentando condição reprodutiva normal e idade variando entre 2 e 12 anos. Novilhas pre-púberes ou no início da puberdade podem também ser eventualmente utilizadas em programas de seleção em núcleos MOET fechados (MEUWISSEN, 1998). Já a recuperação de embriões de vacas senis se justifica nos casos em que sua descendência tenha algum valor comercial ou como ferramenta na preservação de raças raras ou em perigo de extinção. Em todos os casos, a implementação adequada de programas de TE estará condicionada à disponibilidade do maior número possível de embriões para serem transferidos em fêmeas receptoras. Atualmente, a fonte principal de embriões continua a ser a coleta uterina de doadoras previamente submetidas ao processo de estimulação ovariana (superovulação) com gonadotrofinas exógenas. Entretanto, os tratamentos de superovulação disponíveis caracterizam-se por provocar uma resposta extremamente

variável em todas as categorias de animais, tornando impossível à previsão do número de embriões que serão recuperados de um determinado animal.

Em razão das fêmeas senis apresentarem uma menor população folicular nos ovários, além de eventuais alterações fisiológicas nos órgãos relacionados com a reprodução (ovário, útero, hipófise e hipotálamo), os problemas de variabilidade individual da resposta ovariana parecem ser maiores nestes animais. Contudo, o efeito negativo da idade dos animais sobre a qualidade dos embriões não pode ser considerado uma resposta padrão, visto que vacas *Bos taurus taurus* com mais de 20 anos apresentam resposta semelhante à observada em vacas jovens (DONALDSON, 1984<sub>a</sub>). No caso da sub-espécie *Bos taurus indicus*, existe uma lacuna na informação sobre os fatores genéticos e/ou ambientais que afetam a resposta à superovulação e produção de embriões. A necessidade de uma avaliação rigorosa da influência desses fatores na produção de embriões nessa espécie se justifica pelo fato da mesma, particularmente a raça Nelore, participar com destaque no total de coletas de embriões realizadas no Brasil. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito de alguns fatores fisiológicos (idade dos animais), ambientais (propriedade, estação do ano) e aqueles relacionados com o tratamento de superovulação (tipo e dose de hormônio, data de início do tratamento, superovulações repetidas) na produção de embriões de vacas Nelore submetidas ao processo de superovulação e coleta de embriões.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Aspectos fisiológicos do crescimento folicular em bovinos

As fêmeas bovinas estabelecem seu estoque vitalício de oócitos pouco antes do nascimento. Neste período, os ovários contêm uma reserva aproximada de 200.000 oócitos (variação de 0 a 700.000), alojados dentro de folículos primordiais (ERICKSON, 1966). Do nascimento à puberdade, o destino de todos os folículos que iniciam o crescimento é a atresia (involução ou degeneração). Nesse período, o crescimento dos folículos acontece em um padrão cíclico, semelhante a ondas, em que vários folículos iniciam o crescimento até o momento em que um deles irá adquirir dominância, induzindo seus contemporâneos a cessarem seu crescimento e a degenerarem. O folículo dominante, por sua vez, não chega a ovular e entra em atresia, seguida da emergência de uma nova onda de crescimento folicular. Na puberdade, que nos bovinos acontece com idade aproximada de 10 a 12 meses, os folículos continuam a apresentar sucessivas ondas de crescimento folicular e atresia, de forma semelhante à observada em animais prepúberes, mas com intervalos maiores entre as ondas sucessivas e com maior atividade na síntese de estrógenos pelo folículo dominante (EVANS *et al.*, 1994). A elevação das concentrações de estrógenos resulta em mudança, de negativa para positiva, da ação dos estrógenos na retroação do eixo hipotálamo-hipofisário, resultando na secreção pulsátil de LH. O aumento da frequência desses pulsos, culmina a descarga preovulatória de LH, a qual provoca a retomada da meiose, a maturação citoplasmática do oócito e a ovulação do folículo dominante. Na maturidade sexual, semelhante às fases anteriores, o crescimento folicular acontece em ondas ao longo do ciclo estral. Na presença de um corpo lúteo funcional, o folículo dominante sofre regressão (atresia) e começa uma nova onda. Somente na última onda do ciclo estral acontece à ovulação do folículo dominante. Em bovinos, cada ciclo estral apresenta duas ou três ondas e, ocasionalmente, quatro ondas (PIERSON & GINTHER, 1987; SIROIS & FORTUNE, 1988).

## 2.2. Condição ovariana e reprodutiva em função da idade

Na espécie bovina, o número de folículos primordiais diminui com o avanço da idade, chegando a um valor aproximado de 100 a 2.000 em vacas com 20 anos (ERICKSON, 1966). Igualmente, a partir de uma determinada idade adulta, variável entre animais, observa-se uma queda na fertilidade à medida que aumenta a idade, sendo que esse declínio acontece antes da depleção total do estoque de oócitos (ARMSTRONG, 2001). Os fatores que contribuem para esse declínio incluem anomalias do eixo hipotálamo-hipofisário, deficiências endócrinas e/ou estruturais ovarianas, função alterada do oviduto, diminuição da receptividade endometrial e anomalias dos oócitos remanescentes (ADAMS, 1975). Estudos de substituição hormonal e transferência de embriões realizados em humanos, animais domésticos e de laboratório têm permitido identificar a contribuição de cada um desses fatores. Assim, estudos de transferência de embriões em camundongos, cobaias e coelhos mostraram que tanto a receptividade endometrial como as deficiências dos oócitos contribuem para reduzir a fertilidade à medida que avança a idade (TALBERT & KRHON, 1966). Igualmente, foi demonstrada em mulheres na idade próxima da menopausa que os oócitos defeituosos são a principal causa de infertilidade (SAUER, 1998). Nesse estudo, oócitos retirados de mulheres jovens resultaram em 30% de gestação em mulheres receptoras com menos de 40 anos e 40% em mulheres receptoras mais de 40 anos com de gestação, após fecundação *in vitro* e transferência. Observaram também que, apenas 9% das mulheres com mais de 40 anos que receberam um embrião formado de seu próprio oócito ficaram gestantes. Apesar da evidência que os oócitos defeituosos são a principal causa de infertilidade, pouco é conhecido sobre a natureza dessas deficiências, responsáveis pelo declínio na fertilidade à medida que avança a idade materna. Na espécie eqüina foi relatada uma mortalidade embrionária de 62%, entre os dias 4 e 14, nos animais com idade média de 19,4 anos em comparação com 9% de mortalidade embrionária em animais jovens com idade média de 5,7 anos (BALL *et al.*, 1989). No mesmo estudo foi constatado que a taxa de fecundação aparentemente não foi afetada, contudo, os embriões de 4 dias

recuperados de éguas jovens apresentaram uma maior taxa de sobrevivência em comparação aos provenientes de éguas senis (52 vs 23%, respectivamente) quando transferidos para éguas jovens. Os autores concluíram que os defeitos do embrião podem ser intrínsecos deles mesmo ou originados do ambiente do oviduto. A comparação morfológica dos oócitos de éguas jovens (de 3 a 10 anos) e senis (>19 anos) revelaram algumas diferenças menores presentes no citoplasma. Essas alterações incluíram uma pequena área ocupada por grânulos corticais, uma maior área de retículo endoplásmico liso, rodeado por mitocôndrias e vesículas citoplasmáticas maiores nos oócitos das éguas senis (CARNEVALE *et al.*, 1999). Esses achados foram interpretados como indicativos de uma maior incidência de defeitos degenerativos nos oócitos nessa classe de animais. Igualmente, em humanos, também tem sido relatado aumento na incidência de alterações degenerativas nos oócitos à medida que aumenta a idade (LIM & TSKOK, 1997). Entretanto, as implicações dessas diferenças morfológicas, em termos de competência do desenvolvimento, permanecem desconhecidas. Contrariamente, na espécie bovina, a análise de ovários de vacas entre 9 e 17 anos mostrou somente uma diminuição do número de folículos, sem qualquer diferença morfológica na qualidade dos oócitos (KATSKA & SMORAG, 1984). Por sua vez, NEWCOMB *et al.* (1978), em bovinos, mostraram que embriões de vacas com mais de 13 anos de idade, algumas das quais tinham deixado de reproduzir, foram capazes de se desenvolver normalmente, após transferência em fêmeas receptoras mais jovens. Esses resultados indicam que, em determinados casos, a idade avançada pode não afetar a competência dos oócitos, sendo a infertilidade basicamente conseqüência de uma função endometrial inadequada.

### **2.3. Variabilidade da resposta aos tratamentos de superovulação**

Os tratamentos de superovulação atualmente disponíveis, são caracterizados por provocar uma resposta extremamente variável em todas as categorias de animais (DONALDSON, 1984<sub>b</sub>) tornando impossível a previsão do número de embriões que serão recuperados de um determinado animal. Assim, o índice médio de recuperação de 5 embriões transferíveis por coleta de doadora superovulada esconde uma grande

variabilidade da resposta, com extremos de 0 a > 50 (HASLER, 1992). Os fatores responsáveis por essa variabilidade são de origem múltipla e ainda pouco compreendida, (ALVAREZ, 1994; KAFI & MCGOWAN, 1997). ARMSTRONG (1993), BREUEL *et al.* (1991) e KAFI & MCGOWAN (1997) consideram diversos fatores, intrínsecos e extrínsecos, como responsáveis pela variabilidade da resposta superovulatória de bovinos. Os fatores intrínsecos envolvem aspectos genéticos (raças mais ou menos prolíficas, sensibilidade às gonadotrofinas), fisiológicos (idade, condição do ovário ou dominância folicular e população de folículos no momento da superovulação), nutricionais (condição corporal, deficiência ou excesso de nutrientes) e sanitários (patologias do ovário, útero e oviduto). Entre os fatores extrínsecos consideram o hormônio utilizado (FSH recombinante, extratos hipofisários contendo FSH com maior ou menor conteúdo de LH, eCG, HMG, inibina), dose, via e forma de aplicação, estação do ano, manejo na propriedade, entre outros.

### **2.3.1. Fatores de variação intrínsecos ao animal**

#### **2.3.1.1. Raça**

BROADBENT *et al.* (1996) evidenciaram a ocorrência de variações, entre e dentro de raças, na resposta a uma determinada dose de superovulação. Ainda BREUEL *et al.* (1991) citaram que a resposta superovulatória era altamente específica da raça e podia ser influenciada, também, pela idade da doadora, dosagem do FSH e sua interação. Os autores relataram que a maior média de estruturas e embriões transferíveis foi coletada de doadoras da raça Simental, quando comparadas com doadoras da raça Poled Hereford, Angus ou Charolesa. Esses achados são similares aos de LERNER *et al.* (1986), os quais constataram maior número de estruturas e embriões transferíveis recuperados de doadoras da raça Simental quando comparado a outras raças de corte e de leite. DONALDSON (1984<sub>c</sub>) relatou, também, que vacas da raça Simental e cruzadas (Simbrah) produziram mais estruturas e embriões transferíveis do que doadoras da raça Poled Hereford, Angus ou Charolesa.

### 2.3.1.2. Dominância folicular

O estágio do ciclo estral em que é iniciada a superovulação é um dos fatores de variabilidade na resposta ovariana, com vários estudos publicados sobre o efeito na taxa de ovulação. Entretanto, devido às características individuais da velocidade de crescimento folicular, com animais apresentando duas, três, e ocasionalmente quatro ondas de crescimento folicular, a resposta à estimulação com o FSH também acompanha essa variabilidade (ARMSTRONG, 1993). Assim, nenhuma diferença na resposta superovulatória foi observada quando o tratamento com FSH foi iniciado nos dias 8, 9, 10, 11, 12 e 13 do ciclo estral (D'OCCHIO *et al.*, 1997). Igualmente, KIM *et al.* (1997<sub>a</sub>) relataram que o dia do ciclo em que a gonadotrofina foi administrada não afetou a produção de embriões em vacas leiteiras. As tentativas de melhorar a resposta, aproveitando a ausência de dominância folicular da primeira onda de crescimento folicular no início do ciclo, não produziram resultados satisfatórios. ROBERTS *et al.* (1994) não observaram diferença significativa na taxa de ovulação ou embriões transferíveis em vacas superestimuladas no início da primeira onda de crescimento folicular (nos dias 2 a 6) comparadas com animais superovulados na segunda onda (dias 10 ou 11). Porém, GRADELA *et al.* (2000) obtiveram resultados com fêmeas *Bos taurus indicus* que contradizem os descritos em raças européias, permitindo inferir que, na raça Nelore, o folículo dominante não tem o mesmo efeito sobre o aparecimento e o número de folículos maiores ou iguais a 7,0 mm e que, portanto, a dinâmica folicular ovariana se processa de maneira diferente.

A dificuldade para determinar o momento mais apropriado do ciclo em que deve ser iniciado o tratamento superovulatório, conduziu a tentativas para regular ou alterar a dominância folicular através de modificações do padrão normal da onda. Dessa forma, a eliminação da dominância folicular, por métodos físicos (punção folicular), aumentou a resposta ao tratamento de superovulação em fêmeas européias (KO *et al.*, 1991; ADAMS *et al.*, 1993; BUNGARTZ & NIEMANN, 1994). Entretanto, a eficiência desse método requer o registro ultra-sonográfico contínuo da dinâmica folicular do ovário para estabelecer se o maior folículo está crescendo, estável ou regredindo (GUILBAULT *et al.*, 1991; SAVIO *et al.*, 1991; HUHTINEN *et al.*, 1992). Igualmente, o controle da onda

folicular pela injeção de estradiol associado a um tratamento com progesterona também permite bons resultados (BO *et al.*, 1996) com a vantagem de poder iniciar a superovulação a qualquer momento do ciclo estral.

### **2.3.1.3. Idade**

Existe evidência na literatura que a resposta ao tratamento de superovulação é menos eficiente em vacas senis (ARCHBALD, 1978; HASLER *et al.*, 1983; DONALDSON, 1984<sub>a</sub>; LERNER *et al.*, 1986; GARCIA-WINDER *et al.*, 1988 e HASLER, 1992). Entretanto, em alguns estudos a análise dos resultados mostrou algumas contradições. Assim, o número médio de estruturas recuperadas não foi afetada pela idade das doadoras, dosagem de FSH ou sua interação nas raças Angus (BREUEL *et al.*, 1991) Holandesa (HASLER, 1992; LERNER *et al.*, 1986 ) e Texas Longhorn (DONALDSON, 1984<sub>c</sub>); ao contrario, na raça Charolesa, a idade dos animais influenciou negativamente o número de estruturas recuperadas (BREUEL *et al.*, 1991). Em determinadas raças (Holandesa, Hereford) o declínio no número de estruturas recuperadas de vacas senis foi parcialmente compensado ao aumentar a dosagem de FSH. Um resultado interessante mostrou, igualmente, a existência de padrões diferentes de resposta ao tratamento de superovulação conforme a raça (BREUEL *et al.*, 1991). Nesse estudo, o número médio de estruturas recuperadas de vacas Hereford foi afetada por uma interação entre a idade da doadora e a dosagem de FSH. Para idades jovens, o número médio de estruturas recuperadas diminuiu com doses aumentadas de FSH. Ao contrario, em vacas senis, o número médio de estruturas recuperadas aumentou com o aumento da dose de FSH. Já em vacas Simental, o número médio de estruturas recuperadas também foi afetado por uma interação entre a idade da doadora e a dosagem de FSH. Entretanto, o padrão de resposta foi diferente ao observado nas vacas Hereford. Na raça Simental, o número médio de estruturas recuperadas nas vacas jovens aumentou ao aumentar a dose de FSH enquanto que em vacas senis o número médio de estruturas recuperadas diminuiu ao aumentar a dose de FSH. As causas dessas diferenças na resposta entre as diferentes raças foi atribuída a maior taxa de ovulação natural das doadoras Simental ou ao fato aparente da raça

Simental apresentar maior sensibilidade às gonadotrofinas em comparação com outras raças. Essas observações, entretanto, precisam ser confirmadas uma vez que o número de animais com idade senil (> 14 anos) foi muito pequeno. Finalmente, o efeito negativo da idade dos animais sobre a qualidade dos embriões, estabelecido na maioria dos trabalhos (ARCHBALD, 1978; DONALDSON, 1984<sub>a</sub>; LERNER *et al.*, 1986; GARCIA-WINDER *et al.*, 1988; HASLER *et al.*, 1983 e HASLER, 1992), não pode ser considerada uma resposta padrão, visto que alguns animais com mais de 20 anos apresentam resposta semelhante à observada em vacas jovens (DONALDSON, 1984<sub>a</sub>).

#### **2.3.1.4. População de folículos**

O grande número de folículos pequenos e médios presente no dia do início da superestimulação parece estar associado com um aumento na resposta superovulatória e com uma diminuição da variabilidade da resposta ovariana (MONNIAUX *et al.*, 1983; ROMERO *et al.*, 1991). O aumento da população folicular no momento da superovulação tem sido relacionado à elevação dos níveis de FSH. Porém, CARVALHO *et al.* (2000) não encontraram diferença significativa na resposta a superovulação de fêmeas bovinas tratadas previamente com doses reduzidas de FSH (“priming”) nos dias 3 e 4 do ciclo estral. Por sua vez, os resultados de GONG *et al.* (1996) mostraram um aumento do total de estruturas recuperadas, mas não do número de estruturas transferíveis, de novilhas superovuladas que receberam um pré-tratamento com somatotrofina recombinante bovina (bST). Já MANIK *et al.* (1998) sugeriram que a população folicular passava por mudanças dinâmicas durante a superovulação e que a população folicular no momento da superovulação tinha aplicação limitada como indicador da resposta superovulatória.

#### **2.3.1.5. Nutrientes**

Apesar da dieta alimentar influenciar claramente a eficiência reprodutiva, a relação entre nutrição e reprodução é complexa. De acordo com BOLAND *et al.* (2001), um excesso de energia na dieta provocava um efeito negativo na capacidade de desenvolvimento do embrião. O tipo de alimento utilizado na dieta das doadoras pode

também influenciar a resposta superovulatória e a qualidade dos embriões (BLANCHARD *et al.*, 1990; YAAKUB *et al.*, 1999). Em experimento para padronizar o regime alimentar e o escore da condição corporal para a máxima resposta superovulatória em vacas zebus, SIDDIQUI *et al.* (2002) relataram que vacas apresentando escore corporal de 4,0 e 4,5 (em uma escala de 5,0) não produziram embriões e eram propensas à formação de cistos enquanto que as fêmeas que receberam dieta nutricional adequada e apresentavam escore corporal entre 2,5 e 3,0 responderam satisfatoriamente.

### **2.3.1.6. Patologias**

Existe pouca informação sobre o possível efeito adverso de doenças ou infecções subclínicas na resposta superovulatória em bovinos (KAFI & MCGOWAN, 1997). KAFI *et al.* (1994), observaram que corpos lúteos palpáveis e estruturas coletadas foram significativamente menores em novilhas infectadas com vírus da diarréia bovina a vírus (BVDV). Igualmente, infecções ao nível do ovário, útero ou trompas podem também explicar a variação na resposta ovariana ou a taxa de recuperação de embriões (ALVAREZ *et al.*, 1999).

## **2.3.2. Fatores de variação extrínsecos ao animal**

### **2.3.2.1. Hormônio e dose**

As gonadotrofinas comumente utilizadas para induzir superovulação em bovinos são o FSH (extrato parcialmente purificados de hipófise de origem suína, ovina ou eqüina), e a gonadotrofina sérica de égua prenhe (eCG). De forma geral, as melhores respostas são obtidas com FSH do que com eCG (BOLAND *et al.*, 1991), estando essa diferença atribuída à longa meia-vida do eCG (aproximadamente 4 dias) e à ação luteinizante desse hormônio. As preparações hipofisárias de FSH também podem estar “contaminadas” com uma elevada quantidade de LH (BROADBENT *et al.*, 1996). Existe uma variabilidade considerável na relação FSH:LH nas preparações de gonadotrofinas disponíveis (CHUPIN *et al.*, 1984; BOLAND *et al.*, 1991; KAFI & MCGOWAN, 1997). De acordo com KELLY *et al.* (1997), um alto conteúdo de LH no FSH geralmente resulta

em baixa resposta superovulatória. O excesso de LH pode causar luteinização prematura ou ovulação do folículo estimulado pelo FSH alterando sutilmente a fisiologia endócrina ou a interação de gametas. Em uma série de estudos, DONALDSON & WARD (1985); DONALDSON & WARD (1986) e DONALDSON (1990) mostraram que a contaminação de FSH com altas concentrações de LH afetava negativamente a resposta superovulatória das fêmeas bovinas. Também observaram que a remoção de LH do preparo de FSH aumentava a qualidade e número de embriões transferíveis coletados. Dados de MURPHY *et al.* (1984) também demonstraram que a adição crescente de LH ao tratamento de superovulação com FSH resultava em uma redução na taxa de fertilização, sendo que maiores quantidades de LH tiveram uma influência inibitória na resposta ovulatória, sugerindo que um nível ótimo de LH teria que estar presente em todos os preparados de FSH. Por outro lado, LINDSELL *et al.* (1986) não acharam nenhuma diferença significativa na resposta superovulatória e produção de embriões entre cinco partidas FSH com diferentes graus de contaminação com LH. As diferenças na resposta à superovulação entre hormônios com diferentes proporções FSH:LH são tão sutis que é requerido um grande número de animais para serem colocadas em evidencia.

Outro fator responsável pela variação da resposta à superovulação faz referencia à dosagem de FSH utilizado. De acordo com KANITZ *et al.* (1996), altas doses de FSH podem suprimir completamente a ovulação. Nesse estudo, a resposta ovariana aumentou na medida que aumentou a dose de FSH alcançando um platô e então diminuiu quando a dose de FSH foi aplicada acima do ótimo. Concluíram que o provável mecanismo responsável pela supressão da ovulação seria de que, quantidades elevadas de FSH, aumentariam a concentração de progesterona no período anterior à ovulação. Sob essas circunstâncias, o estradiol não pode induzir o pico de LH, sendo a ovulação completamente suprimida.

### **2.3.2.2. Estação do ano**

Estudos específicos realizados sobre o efeito da estação do ano na resposta superovulatória de bovinos têm mostrado resultados contraditórios. LERNER *et al.*

(1986) observaram maior número de embriões e de embriões transferíveis por coleta em fêmeas da raça Holandesa durante a primavera que durante outras estações. Já KIM *et al.* (1997<sub>b</sub>) trabalhando com fêmeas bovinas nativas coreanas superovuladas com FSH-P e SUPER-OV relataram que a porcentagem de embriões transferíveis era significativamente mais alta no verão e no outono, respectivamente. Em trabalho com vacas leiteiras, KIM *et al.* (1997<sub>a</sub>) não evidenciaram influência da estação do ano na produção de embriões. BASTIDAS & RANDEL (1987) e TOTEY *et al.* (1991) relataram que o número de embriões coletados de vacas Brahman foi menor no inverno, enquanto WICHMANN (1990) e MORAES (1990) não observaram este efeito em fêmeas *Bos taurus*. BASILE *et al.* (1998) estudando a influência de fatores sazonais no desempenho de vacas Holandesas superovuladas concluíram que o efeito da época do ano não afetava a resposta superovulatória. Por sua vez, TONHATI *et al.* (1999) comentaram que ao levar em consideração a espécie, ou mesmo a raça bovina, o ambiente pode afetar o número de embriões transferíveis obtidos de fêmeas superovuladas.

### **2.3.2.3. Propriedade**

O estudo mais consistente sobre os fatores ambientais e de manejo que afetam a resposta ao tratamento de superovulação foi realizado por HAHN (1992). O autor relatou que fatores diversos como propriedade, ano, mês, idade da doadora, número de coletas, intervalo entre nascimento e coleta e produção de leite explicam 24% e 27% do total da variação na produção de embriões e embriões transferíveis, respectivamente. Desses fatores, a propriedade constitui o fator mais relevante, totalizando 65% e 69,5% dessa variação.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Descrição dos dados

Os dados para a realização deste trabalho foram gentilmente cedidos pelo Médico Veterinário Carlos Alberto Zanenga da Central de Transferência de embriões EMBRIZA S/A, localizada em Campo Grande, no Estado de Mato Grosso do Sul.

Foram utilizados os resultados de superovulação e coleta de 318 doadoras da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), com idades variando entre dois a vinte e um anos. Os animais eram mantidos em seis diferentes propriedades do Estado de Mato Grosso do Sul. A caracterização de cada região quanto ao tipo de solo, aptidão da terra, temperatura, clima, índice efetivo de umidade e precipitação pluviométrica anual está apresentada no Apêndice A. Os animais eram manejados de forma semelhante nas propriedades, permanecendo em piquetes formados com pastagens tropicais cultivados com predominância das espécies *B. brizantha* e *B. decumbens*. O sal mineralizado e água eram fornecidos *ad libitum*. Parte desses animais recebiam esporadicamente suplementação de volumosos e/ou concentrados em razão da sua participação em exposições agropecuárias.

Foram consideradas 884 superovulações realizadas no período de 1994 a 2001 nas 318 doadoras. O critério adotado pela empresa foi o de selecionar doadoras que manifestassem ciclos estrais regulares antes de serem utilizadas, além de apresentarem as características desejáveis para a transferência de embriões (conformação, desempenho produtivo e elevado padrão genético, entre outros).

A superovulação era induzida utilizando extratos hipofisários parcialmente purificados de origem suína – PLUSET® (Serono, Roma, Itália), SUPER-OV® (Ausa International Inc., Tyler, TX) e FSH-P® (Burns-Biotec, Omaha, NE) – e de origem ovina – OVAGEN® (ICP Ltda, NZ) – administrados via intramuscular (im), em doses decrescentes com intervalo de 12 horas, durante 4 dias. As doses de cada hormônio variavam de 200 a 400 UI (Pluset), de 28 a 75 UI (Super-ov), de 10 a 16 mg (Ovagen) e

de 16 a 36 mg (FSH-P). O protocolo de superovulação era iniciado entre os dias 8 a 12 do ciclo, após um cio de referência. Em duas propriedades, parte dos animais foram superovulados em associação com um progestágeno (Syncro-Mate-B<sup>®</sup>, Sanofi Inc., Overland Park, KS, USA) implantado na orelha em qualquer momento do ciclo. No momento da colocação do implante, era aplicada uma injeção (im) de 5,0 mg de valerato de estradiol e 3,0 mg de Norgestomet. Nesses animais, o tratamento de superovulação era iniciado no 5<sup>o</sup> dia após a inserção do implante. Todos os animais receberam duas injeções (im) de 500 mg de análogo de prostaglandina F2 $\alpha$  (Cloprostenol, Lab. Cooper) administradas com intervalo de 12 horas, no terceiro dia do início da superovulação. A retirada do implante de progestágenos era realizada no período vespertino desse dia. A observação do cio era feita diariamente pela pessoa responsável da inseminação artificial (IA), durante uma hora aproximadamente, nos períodos matutino e vespertino. A IA das doadoras eram realizadas doze e vinte e quatro horas após a primeira observação do cio. A avaliação da resposta ovariana (número de corpos lúteos) era realizada via palpação retal, no dia da coleta de embriões, seis a sete dias após a IA, sendo que as fêmeas que apresentavam menos que 3 corpos lúteos não eram coletadas.

Os embriões eram coletados pelo método cervical utilizando uma sonda de Foley colocada em cada corno para realizar a lavagem uterina utilizando uma solução de PBS (*Dulbeco's phosphate-buffered saline* – Nutricell - Brasil). O líquido da lavagem passava através de um filtro onde os embriões eram retidos, junto com uma pequena quantidade de PBS. A procura dos embriões era realizada sob um estereoscópio (x 60) após colocar o líquido em placas de Petri descartáveis. A avaliação e classificação morfológica dos embriões eram realizadas conforme os critérios do IETS (1998) como segue: grau I (excelente ou bom: massa embrionária simétrica e esférica com blastômeros individuais, uniformes em tamanho, cor e densidade. Este embrião é consistente com seu estágio de desenvolvimento. Irregularidades devem ser relativamente menores, e ao menos 85% do material celular deve ser de massa embrionária viável intacta. Este julgamento deve ser baseado na porcentagem de células embrionárias representadas pelo material extravasado no espaço perivitelino. A

zona pelúcida deve ser lisa e não ter superfícies côncavas ou planas, que possam causar aderência do embrião a uma placa de Petri ou a uma palheta); grau II (regular: Irregularidades moderadas na forma geral da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais. Ao menos 50% do material celular deve compor uma massa embrionária viável, intacta); grau III (pobres: Irregularidades maiores na forma da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais. Ao menos 25% do material celular deve formar uma massa embrionária viável, intacta); e grau IV (morto ou degenerado: Embriões em degeneração, oócitos ou embriões de uma célula: não viáveis). Para fins do presente trabalho os embriões grau I, II e III foram considerados como transferíveis (ou viáveis) e os embriões de grau IV como não transferíveis (ou inviáveis). Além da qualidade morfológica, foi avaliada a capacidade dos embriões continuar seu desenvolvimento após sua transferência em fêmeas receptoras. Para tanto, 1958 embriões oriundos de doadoras de diferentes faixas etárias foram transferidos a fresco, por via cervical, em fêmeas receptoras sincronizadas com as doadoras, utilizando o inovulador francês (IMV, L' Aigle, França). O diagnóstico de prenhez era realizado por palpação retal e/ou ultra-sonografia nos dias 45 e 60 e confirmado aos 90 dias após a transferência.

### **3.2. Parâmetros analisados**

A resposta das doadoras aos tratamentos de superovulação em termos de resposta ovariana e produção de embriões (totais e viáveis) foi avaliada em função dos seguintes parâmetros:

- a) Idade das doadoras;
- b) Estação do ano em que foi realizado o tratamento de superovulação;
- c) Número de superovulações por doadora;
- d) Tipo e posologia do hormônio utilizado para promover a superovulação;
- e) Local aonde foi realizada a superovulação e coleta de embriões;
- f) Dia de início do tratamento de superovulação;
- g) Uso de progestágeno associado à superovulação;

h) Taxa de prenhez das receptoras.

### 3.3 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o Modelo Linear Geral (GLM) do SAS/STAT (SAS/STAT, 1990). Para identificar as diferenças entre as médias, quando o teste “F” foi significativo, adotou-se o teste de Tukey com 5% de probabilidade. Estimou-se que a variabilidade dos dados em resposta aos tratamentos de superovulação era semelhante intra e entre doadoras, de forma que cada superovulação foi usada como uma observação individual e não foram feitos ajustes para correlação entre observações na mesma doadora. Foi examinado o efeito da idade da doadora, dose de FSH e sua interação no número total de estruturas recuperadas e número de embriões transferíveis. O efeito da estação do ano e da propriedade foram analisadas isoladamente ou com interação da idade. O taxa de prenhez das receptoras de embriões foi avaliada em função da idade da doadora.

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  o erro padrão da média (e.p.m.) e as comparações que implicaram proporções foram analisadas pelo Teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ).

O modelo matemático utilizado foi o seguinte:

$$Y = \mu + A + \varepsilon$$

Y = Características a serem estudadas (número de estruturas totais por coleta; número de embriões transferíveis; índice de prenhez após transferência).

$\mu$  = Média geral.

A = Efeitos considerados fixos (idade das doadoras; estação do ano; tipo e posologia dos hormônios utilizados na superovulação; local em que foi realizada a superovulação e a coleta; número de superovulações prévias).

$\varepsilon$  = Resíduo.

#### 4. RESULTADOS

Das 318 doadoras submetidas ao processo de superovulação pela primeira vez, 303 (95,3%) apresentaram cio e foram inseminadas, enquanto que 15 (4,7%) não manifestaram cio e não foram inseminadas. Das que foram inseminadas, 93,7% (298/318) apresentaram uma boa resposta ovariana, com três ou mais corpos lúteos e foram coletadas, enquanto que 1,6% (5/318) apresentaram menos de três corpos lúteos e não foram coletadas. Das coletas realizadas, 73,3% (233/318) produziram uma ou mais estruturas transferíveis, 16,0% (51/318) produziram somente estruturas não transferíveis e 4,4% (14/318) não produziram qualquer estrutura. No total, 73,3% das vacas submetidas ao processo de superovulação e coleta de embriões resultou na obtenção de pelo menos um embrião transferível (Figura 1).

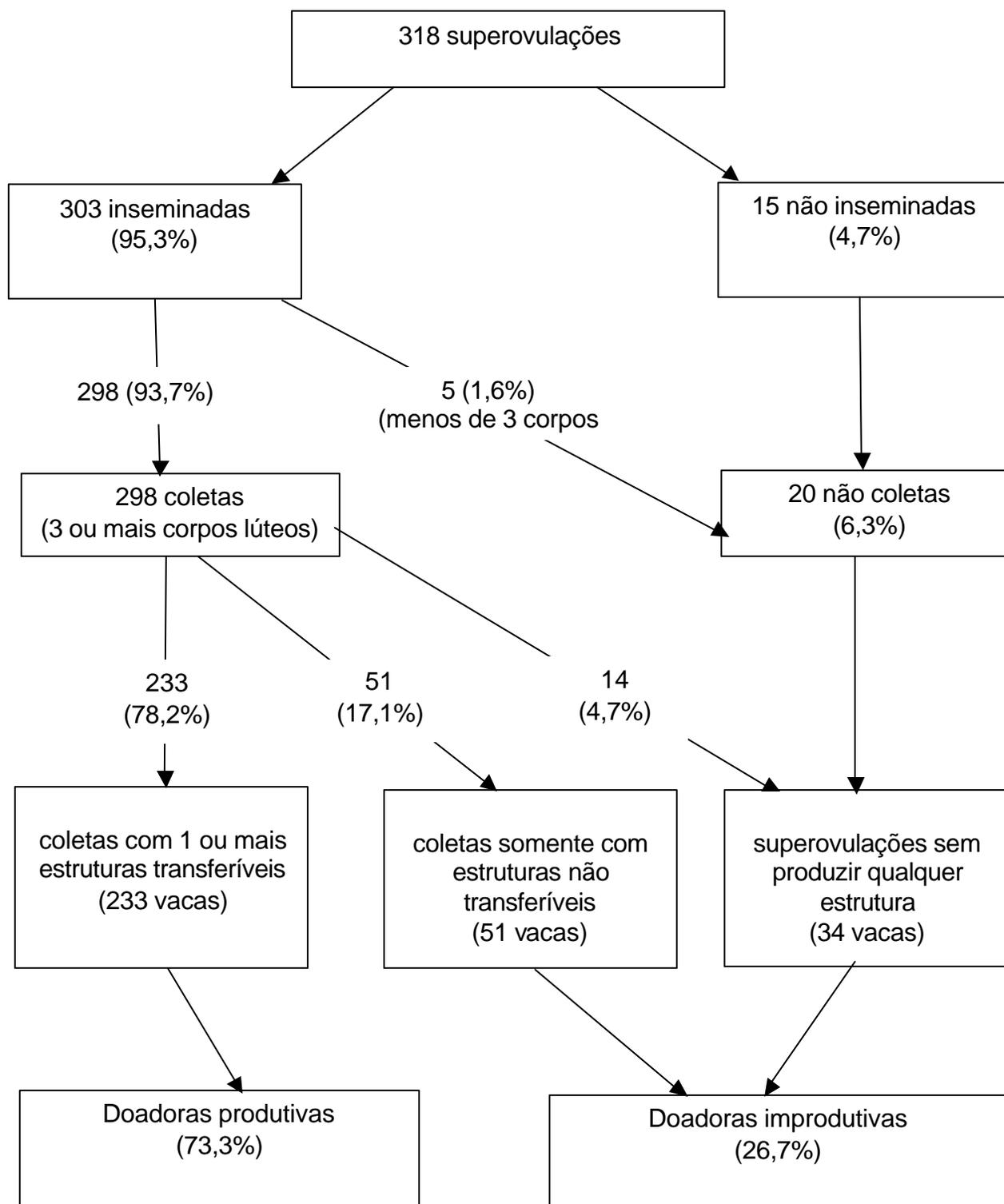


Figura 1: Desempenho de vacas Nelore submetidas à superovulação única e coleta de embriões. Mato Grosso do Sul, 1994 a 2001.

Nesses animais foram recuperados, em média,  $11,3 \pm 0,5$  embriões dos quais  $5,3 \pm 0,3$  transferíveis por vaca superovulada. Ao considerar unicamente as doadoras que responderam à superovulação e foram coletadas, o número médio de embriões recuperados foi de  $12,1 \pm 0,5$ , sendo  $5,7 \pm 0,3$  transferíveis ( $P > 0,05$ ) (Tabela 1).

Tabela 1: Resultado da coleta de embriões de vacas Nelore submetidas ao tratamento de superovulação. Mato Grosso do Sul, 1994 a 2001. média  $\pm$  e.p.m.

Discriminação	n	Total de estruturas	Total de estruturas transferíveis
Superovulações	318	$11,3 \pm 0,5$	$5,3 \pm 0,3$
Coletas	298	$12,1 \pm 0,5$	$5,7 \pm 0,3$

A análise dos resultados dos animais submetidos a mais de uma superovulação (204/318 doadoras) com intervalo de 60 dias não mostrou qualquer influencia dessa variável, em termos de produção de embriões ou qualidade dos mesmos (Tabela 2).

Tabela 2: Total de estruturas e embriões transferíveis coletados em vacas Nelore submetidas a superovulações repetidas. Mato Grosso do Sul, 1994 a 2001. média  $\pm$  e.p.m.

Número de superovulação	n	Total de estruturas	Total de estruturas transferíveis
1 <sup>a</sup>	204	$11,8 \pm 0,6$	$5,8 \pm 0,4$
2 <sup>a</sup>	193	$11,0 \pm 0,5$	$5,5 \pm 0,4$
3 <sup>a</sup>	111	$10,7 \pm 0,7$	$6,2 \pm 0,5$
4 <sup>a</sup>	66	$9,5 \pm 0,9$	$4,5 \pm 0,5$
5 <sup>a</sup>	43	$10,0 \pm 1,3$	$5,2 \pm 0,8$
6 <sup>a</sup>	24	$10,2 \pm 1,3$	$5,0 \pm 0,9$

Das 884 superovulações realizadas nas 318 doadoras, 850 (96,1%) apresentaram cio e foram inseminadas, enquanto que em 34 (3,9%) superovulações os animais não manifestaram cio e não foram inseminados. Dos animais que foram inseminados, 93,4% (826/884) apresentaram uma boa resposta ovariana e foram

coletados, enquanto que 2,7% (24/884) apresentaram menos de três corpos lúteos e não foram coletados para preservar uma possível prenhez. Das coletas realizadas, 75,0% (663/884) produziram uma ou mais estruturas transferíveis, 14,7% (130/884) produziram somente estruturas não transferíveis e 3,7% (33/884) não produziram qualquer estrutura. No total, 75,0% das superovulações resultaram na obtenção de pelo menos uma estrutura transferível. A Figura 2 ilustra os índices de aproveitamento dos animais submetidos a uma ou mais superovulações e coleta de embriões.

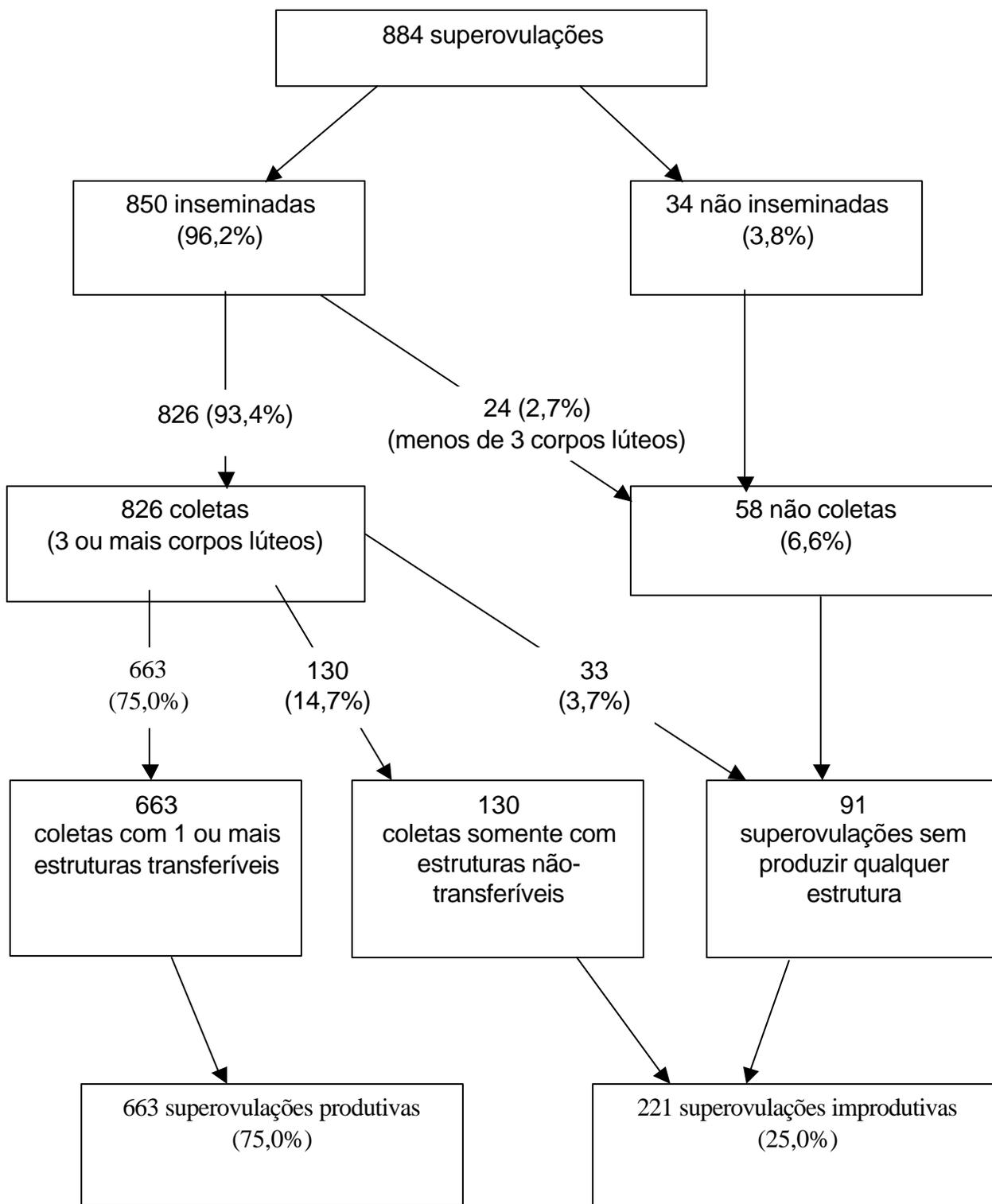


Figura 2: Desempenho de vacas Nelore submetidas a uma ou mais superovulações e coleta de embriões. Mato Grosso do Sul, 1994 a 2001.

Do total de superovulações realizadas foram recuperados, em média,  $10,1 \pm 0,3$  estruturas das quais  $5,1 \pm 0,2$  transferíveis. Ao considerar unicamente o rendimento das doadoras com boa resposta que foram coletadas o número médio de estruturas recuperadas foi de  $10,8 \pm 0,3$ , sendo  $5,5 \pm 0,2$  transferíveis (Tabela 3).

Tabela 3: Resultado da coleta de embriões de vacas Nelore submetidas a um ou mais tratamentos de superovulação. Mato Grosso do Sul, 1994 a 2001. média  $\pm$  e.p.m.

Discriminação	n	Total de estruturas	Total de estruturas transferíveis
Superovulações*	884	$10,1 \pm 0,3$	$5,1 \pm 0,2$
Coletas	826	$10,8 \pm 0,3$	$5,5 \pm 0,2$

\* 884 superovulações de 318 fêmeas doadoras.

A análise do número de estruturas coletadas e embriões transferíveis em função da idade em modelo linear e quadrático (Figura 3), não mostraram efeito significativo ( $P > 0,05$ ).

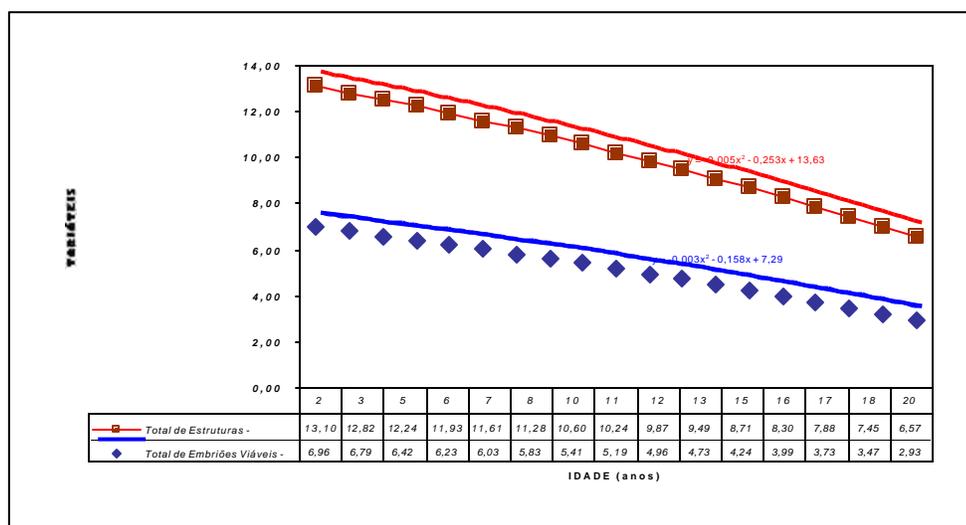


Figura 3: Gráfico da equação de regressão para total de estruturas e embriões transferíveis coletados em função da idade contínua linear e quadrática.  $Y = \text{constante}_1 (\text{idade}) + \text{constante}_2 (\text{idade}^2) + \text{intercepto}$

Porém, a análise dessas variáveis em função da idade linear (Figura 4) e quadrática (Figura 5), em modelo isolado, mostrou efeito altamente significativo ( $p < 0,001$ ).

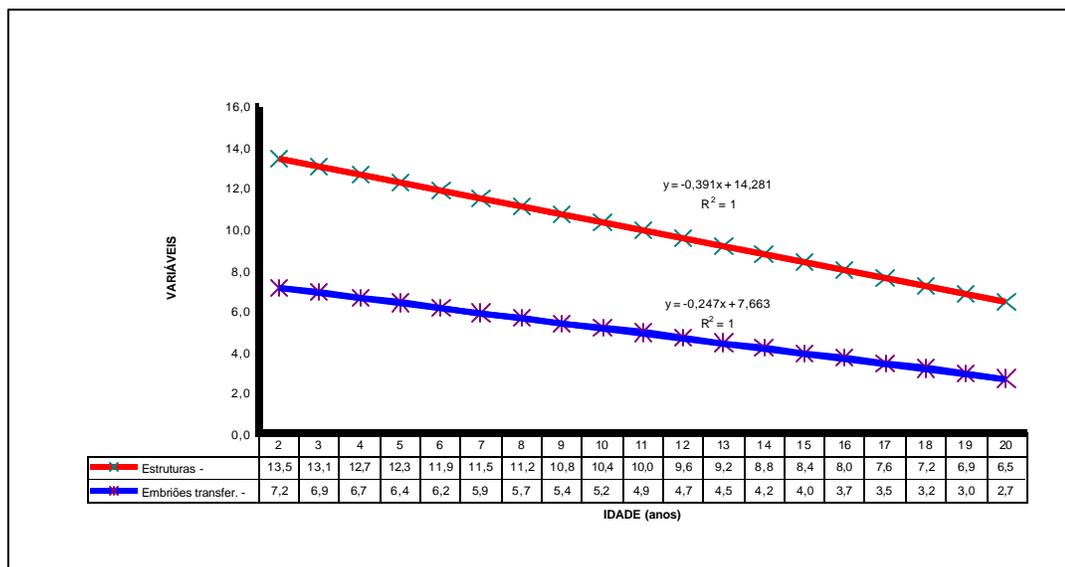


Figura 4: Gráfico da equação de regressão para total de estruturas e embriões transferíveis coletados em função da idade contínua linear.  $Y = \text{constante (idade)} + \text{intercepto}$ .

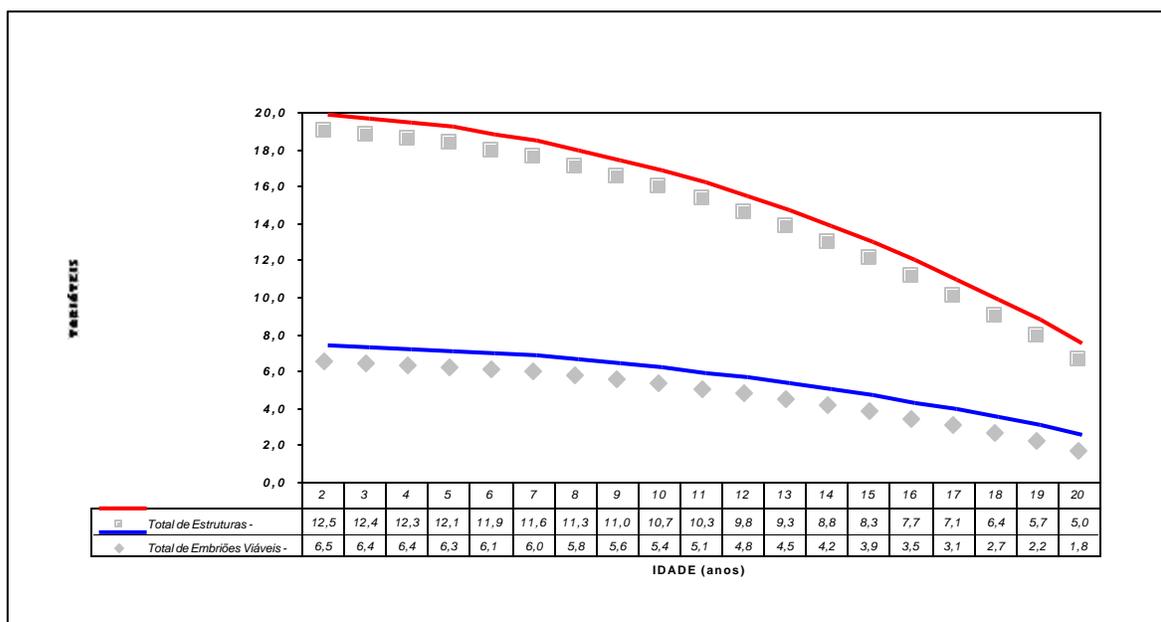


Figura 5: Gráfico da equação de regressão para total de estruturas e embriões transferíveis coletados em função da idade contínua quadrática.  $Y = \text{constante (idade}^2) + \text{intercepto}$ .

Essa diferença ( $p < 0,05$ ), também foi constatada ao distribuir em classes a idade da doadora (Tabela 4).

Tabela 4: Total de estruturas e embriões transferíveis coletados em função das classes de idade. Mato Grosso do Sul, 1994 a 2001. média  $\pm$  e.p.m.

Classes de idade	n	Total de estruturas	Total de estruturas transferíveis
2 a 8 anos	426	12,0 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	6,2 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
9 a 13 anos	294	10,2 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	5,2 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
$\geq 14$	106	7,6 $\pm$ 0,6 <sup>c</sup>	3,4 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>

\* Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

Ao analisar a taxa de prenhez das receptoras em função da procedência dos embriões, considerando a idade como variável contínua (Figura 6) observou-se que o efeito da idade das doadoras não foi significativo ( $P > 0,05$ ).

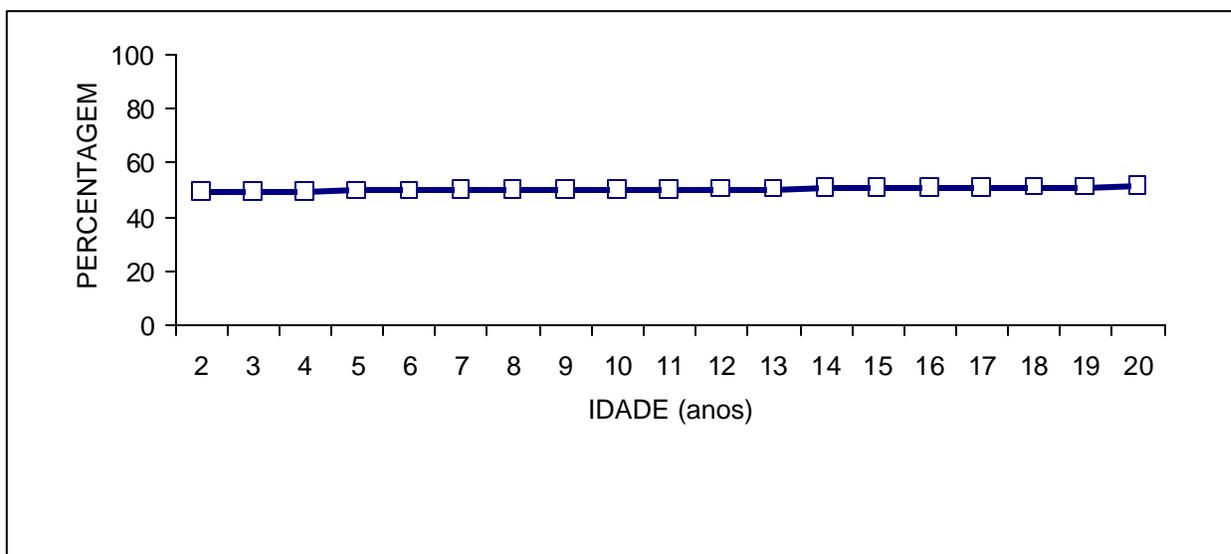


Figura 6: Gráfico da equação de regressão para o percentual de receptoras gestante em função da idade contínua linear das doadoras.  $Y = \text{constante (idade)} + \text{intercepto}$

O mesmo resultado foi obtido ao agrupar os animais em classes de idade (Tabela 5).

Tabela 5: Taxa de prenhez das receptoras em função da classe de idade das doadoras. Mato Grosso do Sul, 1994 a 2001.

Classe de idade da doadora	Embriões transferidos	Receptoras prenhes	
		N	(%)
2 a 8 anos	1010	495	49,8 <sup>a</sup>
9 a 13 anos	687	345	51,2 <sup>a</sup>
14 anos acima	261	133	49,7 <sup>a</sup>
TOTAL	1958	973	49,7 <sup>a</sup>

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados da produção de embriões das seis propriedades analisadas. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre propriedades para o total de estruturas coletada e embriões transferíveis, sendo que a propriedade 5 apresentou o maior número de estruturas recuperadas ( $12,3 \pm 1,2$ ), enquanto que a propriedade 3 teve o menor desempenho ( $6,7 \pm 1,0$ ). Por sua vez, a propriedade 2 produziu o maior número de embriões viáveis ( $6,1 \pm 0,3$ ) e a propriedade 5 o menor número desses embriões ( $4,4 \pm 0,7$ ).

Tabela 6 - Total de estruturas e embriões transferíveis coletados nas propriedades. Mato Grosso do Sul, 1994 a 2001. média  $\pm$  e.p.m.

Propriedade	n	Total de estruturas	Total de estruturas transferíveis
1	213	$11,0 \pm 0,5$ <sup>ab</sup>	$4,6 \pm 0,3$ <sup>b</sup>
2	463	$11,0 \pm 0,3$ <sup>ab</sup>	$6,1 \pm 0,3$ <sup>a</sup>
3	19	$6,7 \pm 1,0$ <sup>c</sup>	$5,0 \pm 0,9$ <sup>ab</sup>
4	51	$9,9 \pm 1,2$ <sup>abc</sup>	$5,3 \pm 0,8$ <sup>ab</sup>
5	42	$12,3 \pm 1,2$ <sup>a</sup>	$4,4 \pm 0,7$ <sup>b</sup>
6	38	$9,4 \pm 1,2$ <sup>bc</sup>	$4,5 \pm 0,9$ <sup>b</sup>

\* Médias com a mesma letra, na mesma coluna, não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

A análise da interação da idade contínua com a propriedade foi significativa ( $p < 0,05$ ) para o total de estruturas coletadas e o número de embriões transferíveis em função da idade, também foi significativo ( $p < 0,05$ ) para o número de embriões

transferíveis em função da propriedade, porém, não se observou efeito significativo ( $p>0,05$ ) para a interação da idade contínua com a propriedade.

Ao utilizar classe de idade interagindo com as propriedades, a resposta foi significativa ( $p<0,05$ ) para o número de embriões transferíveis (Tabela 7).

Tabela 7: Número de embriões transferíveis coletados em função da propriedade interagindo com as classes de idade. Mato Grosso do Sul, 1994 a 2001. média  $\pm$  e.p.m.

Propriedade	Classes de Idade	n	Embriões transferíveis
01	2 a 8 anos	130	$4,6 \pm 0,4^{ab}$
	9 a 13 anos	58	$5,6 \pm 0,7^a$
	14 anos acima	30	$3,0 \pm 0,6^b$
02	2 a 8 anos	265	$7,0 \pm 0,4^a$
	9 a 13 anos	178	$5,4 \pm 0,3^{ab}$
	14 anos acima	58	$3,8 \pm 0,5^b$
04	2 a 8 anos	16	$8,7 \pm 1,8^a$
	9 a 13 anos	20	$4,5 \pm 0,9^b$
	14 anos acima	19	$2,9 \pm 0,7^b$

\* Médias com a mesma letra dentro da coluna, para a mesma propriedade, não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

A dose do hormônio não influenciou ( $p>0,05$ ) nem o número nem a qualidade dos embriões, sendo que, no caso do tratamento PLUSET® até 50% da dose pode induzir uma superovulação comparável à dose recomendada pelo fabricante (Tabela 8).

Tabela 8: Total de estruturas e embriões transferíveis coletados em função do tipo de hormônio e da dose de superovulação. Mato Grosso do Sul, 1994 a 2001. média  $\pm$  e.p.m.

Hormônio	Dose *	N **	Total de estruturas	Total de estruturas transferíveis
PLUSET®	200 UI	12	8,8 $\pm$ 2,1	4,4 $\pm$ 1,1
	250UI	123	10,3 $\pm$ 0,6	5,8 $\pm$ 0,4
	300 UI	119	10,2 $\pm$ 0,7	5,2 $\pm$ 0,5
	400 UI	28	9,9 $\pm$ 1,5	6,3 $\pm$ 1,1
SUPER-OV®	28 a 50 UI	18	12,1 $\pm$ 2,2	4,2 $\pm$ 0,9
	60 UI	35	11,4 $\pm$ 1,4	5,0 $\pm$ 0,9
	75 UI	18	9,6 $\pm$ 1,8	4,4 $\pm$ 1,1
OVAGEN®	10 e 12 mg	26	11,3 $\pm$ 1,75	4,8 $\pm$ 1,1
	14 e 16 mg	15	8,3 $\pm$ 2,2	4,4 $\pm$ 1,3
P-FSH®	16 a 28 mg	25	10,8 $\pm$ 1,7	4,6 $\pm$ 1,1
	32 e 36 mg	11	8,0 $\pm$ 1,6	4,1 $\pm$ 1,2

\* 1 mg equivale a aproximadamente 16 UI.

\*\* Foram excluídas da análise as doses e tipos de hormônios com menos de 5 repetições.

A análise da interação da dose dos hormônios com a idade da doadora não mostrou efeito significativo ( $p > 0,05$ ) para o total de estruturas e número de embriões transferíveis coletados.

Quando se analisou o efeito entre os hormônios, sem considerar a dose utilizada, não foi observada significância para o total de estruturas e embriões transferíveis coletados ( $p > 0,05$ ) (Tabela 9).

Tabela 9 Total de estruturas e embriões transferíveis coletados em função dos hormônios utilizados. Mato Grosso do Sul, 1994 a 2001. média  $\pm$  e.p.m.

Hormônio	n	Total de estruturas	Total de estruturas transferíveis
PLUSET®	282	10,2 $\pm$ 0,4	5,6 $\pm$ 0,3
SUPER-OV®	66	11,1 $\pm$ 1,0	4,7 $\pm$ 0,6
OVAGEN®	37	10,1 $\pm$ 1,4	4,7 $\pm$ 0,8
FSH-P®	33	10,2 $\pm$ 1,4	4,5 $\pm$ 0,9

O percentual de embriões viáveis, em relação ao total de estruturas recuperadas foi de 54,6% para o Pluset®, 41,9% para o Super-ov®, 46,1% para o Ovagen® e 44,1% para o FSH-P® ( $p>0,05$ ).

Não houve efeito significativo ( $p>0,05$ ) da estação do ano no total de estruturas e embriões transferíveis coletados (Tabela 10).

Tabela 10: Total de estruturas e embriões transferíveis coletados em diferentes estações do ano. Mato Grosso do Sul, 1994 a 2001. média  $\pm$  e.p.m.

Estação do Ano	n	Total de estruturas	Total de estruturas transferíveis
Verão	214	10,8 $\pm$ 0,5	5,7 $\pm$ 0,4
Outono	215	10,5 $\pm$ 0,5	5,4 $\pm$ 0,3
Inverno	164	11,5 $\pm$ 0,6	5,6 $\pm$ 0,4
Primavera	233	10,6 $\pm$ 0,5	5,2 $\pm$ 0,4

Na análise da interação da idade com as estações do ano as respostas não foram significativas ( $p>0,05$ ).

Não houve efeito significativo ( $p>0,05$ ) entre as fêmeas que tiveram o início do protocolo de superovulação após um cio de referência e as que utilizaram implantes auricular de progestágeno (Tabela 11).

Tabela 11: Total de estruturas e embriões transferíveis coletados em função do dia em que iniciou o protocolo de superovulação. Mato Grosso do Sul, 1994 a 2001. média  $\pm$  e.p.m.

Início do protocolo	n	Total de estruturas	Total de estruturas transferíveis
8 a 12 dias pós-cio base	107	11,5 $\pm$ 0,7	5,3 $\pm$ 0,5
Syncro-mate-B®	65	10,3 $\pm$ 0,9	4,8 $\pm$ 0,7

## 5. DISCUSSÃO

### **Superovulação e produção de embriões na raça Nelore**

De forma geral, aproximadamente 75% das doadoras submetidas ao processo de superovulação produzem um ou mais embriões, sendo que 25% constituem doadoras improdutivas. Esses resultados confirmam as observações prévias de DONALDSON (1984<sub>b</sub>) e HASLER (1992) sobre a dificuldade em prever o número de embriões que serão recuperados de uma determinada doadora submetida ao processo de superovulação. O índice médio de recuperação, de aproximadamente 5 embriões transferíveis por coleta, mascara uma grande variabilidade individual da resposta, com extremos de 0 a > 40, sendo essa média influenciada por um reduzido número de doadoras (<5%) que produzem mais de 30 embriões por coleta. A análise dos fatores que explicam essa variabilidade, analisados no presente trabalho, pode contribuir para tornar menos incerto um programa de TE, tendo como doadoras vacas Nelore.

### **Efeito da superovulação repetida**

Dado o tamanho da molécula de FSH (aproximadamente 30 kD), a repetição de tratamentos de superovulação em uma determinada doadora teoricamente poderia provocar um aumento na produção de anticorpos contra gonadotrofinas exógenas, com uma concomitante redução na resposta superovulatoria subsequente (SAUMANDE *et al.*, 1978). Entretanto, o presente trabalho mostrou que superovulações consecutivas na mesma doadora não influenciam, nem o número, nem a qualidade dos embriões recuperados. Esse resultado está em concordância com CRISTIE *et al.* (1979), NELSON *et al.* (1979), HASLER *et al.* (1983), LUBBADEH *et al.* (1980), DORN *et al.* (1991) e KIM (1997<sub>b</sub>). Igualmente, foi observado que algumas vacas que não respondem à primeira superestimulação, o fazem na seguinte, e vice-versa. Essa “imprevisibilidade” de resposta ao tratamento foi constatada em doadoras superovuladas por dez ou mais vezes. Portanto, cada tratamento deve ser considerado

como único, pois a variabilidade existe não só entre indivíduos como dentro da própria fêmea que está sendo superestimulada. Conseqüentemente, com as devidas restrições inerentes a problemas de manejo ou eventuais características genéticas, uma fêmea não deve ser excluída do programa de transferência de embriões baseado no fato de não ter respondido ao primeiro tratamento de superovulação.

### **Efeito da Idade**

No presente trabalho, foi consistentemente corroborado o efeito negativo da idade na produção de embriões, relatado previamente por LERNER *et al.* (1986) e BREUEL *et al.* (1991) na espécie *B. taurus taurus* e, mais recentemente, por OLIVEIRA *et al.* (2002) em vacas Nelore. A grande variabilidade da resposta ao tratamento de superovulação requer um número considerável de repetições para evidenciar essa diferença. Essa dificuldade pode ser a causa de DONALDSON (1984<sub>a</sub>) não ter encontrado diferenças na produção de embriões relacionadas com a idade. De fato, tanto DONALDSON (1984<sub>a</sub>) quanto no presente trabalho, foram observadas vacas com idade >20 anos com resposta semelhante à observada em vacas jovens. No obstante, a diminuição no número de estruturas e embriões transferíveis aconteceu de maneira linear com a idade da doadora. Os casos esporádicos de fêmeas senis com boa resposta ovariana ao tratamento de superovulação podem eventualmente explicar a resposta curvilínea da idade em relação à produção de embriões encontrada por HASLER *et al.* (1983) e LERNER *et al.* (1986) em raças européias de corte e leite.

A diminuição da resposta ao tratamento de superovulação observada em fêmeas idosas quando comparadas com doadoras jovens, seria atribuída à redução no número de folículos presentes nos ovários nas vacas senis (ERICKSON, 1966; KATSKA & SMORAG, 1984) e não às deficiências funcionais dos ovários em resposta ao estímulo das gonadotrofinas exógenas. O fato de não ter encontrado diferença na taxa de prenhez de receptoras que receberam embriões oriundos de doadoras jovens e senis, sugere que o declínio da taxa de ovulação não está associado com a qualidade dos embriões. Igualmente, não ficou evidenciada no peso dos nascimentos provenientes de embriões das vacas jovens e senis (C.A. Zanenga, comunicação pessoal). Dessa

forma, o nascimento de produtos mais leves, freqüentemente observado em fêmeas senis, estaria relacionado a alterações no ambiente uterino das fêmeas senis e não à qualidade dos embriões produzidos por essa categoria de animais.

### **Efeito da Propriedade**

O fator propriedade influenciou significativamente o número e/ou a qualidade de embriões coletados. Analisando os fatores que afetavam os resultados em um programa de TE, HAHN (1992) também encontrou que a propriedade constitui o fator que afetava sensivelmente a produção de embriões, explicando 65% e 69,5% na variação encontrada para embriões totais e embriões viáveis, respectivamente. Esse efeito da propriedade estaria relacionado a condições de manejo dos animais, uma vez que as condições edafo-climáticas (temperatura, umidade, topografia do solo, qualidade das pastagens) seriam semelhantes. Conseqüentemente, o envolvimento do fator humano (fornecimento de alimento, aplicação dos tratamentos de superovulação, observação do cio, IA, entre outros) parece representar um ponto fundamental que determina o sucesso nas atividades de TE. Nesse sentido, dada a ausência de literatura enfocando especificamente esse aspecto, seria necessário realizar pesquisas mais aprofundadas para esclarecer essa diferença entre as propriedades.

### **Dose e tipo de FSH**

A análise dos resultados comparativos entre diversas doses dos hormônios utilizados mostrou que aproximadamente 50% da dose considerada como padrão de superovulação para gado europeu foi eficaz para induzir uma superovulação em vacas Nelore. Essa resposta poderia ser atribuída a uma maior sensibilidade dos ovários dessa espécie, conforme sugerem as observações de VISINTIN *et al.* (1999), os quais encontraram uma maior resposta ovariana de novilhas Nelore superovuladas com 300 UI de PLUSET™ em comparação a 400 e 500 UI. No caso de vacas Nelore, o presente trabalho indica que a dose máxima em que acontece o declínio na resposta ovariana parece ser superior à dose padrão de superovulação estipulada para a sub-espécie *B. taurus taurus*, independentemente da idade da doadora. Outras informações da

literatura mostram resultados controversos na análise da interação da idade da doadora com a dose de FSH na resposta ovariana. Em determinadas raças (Holandesa, Hereford) o declínio no número de estruturas recuperadas de vacas senis foi parcialmente compensado ao aumentar a dosagem de FSH (BREUEL *et al.*, 1991). Diferentemente, em vacas da raça Simental, o número médio de estruturas recuperadas nas vacas jovens aumentava ao crescer a dose de FSH enquanto que em vacas senis o número médio de estruturas recuperadas diminuía quando a dose de FSH era aumentada. As causas dessas diferenças na resposta entre as diferentes raças foi atribuída a maior taxa de ovulação natural das doadoras da raça Simental ou ao fato aparente delas apresentarem maior sensibilidade às gonadotrofinas em comparação com outras raças (BREUEL *et al.*, 1991).

Com relação ao tipo de hormônio utilizado para induzir uma superovulação, em alguns trabalhos prévios realizados com a sub-espécie *B. taurus taurus*, tem sido sugerido que a composição do hormônio (relação FSH:LH) pode ser um fator importante na produção de embriões (KELLY *et al.*, 1997). No presente estudo, não foi observada diferença significativa entre os quatro produtos avaliados.

### **Estação do ano**

Diferentemente das observações deste estudo, em que não se notou influência significativa das estações do ano na produção de embriões, GORDON *et al.* (1962) e PUTNEY *et al.* (1987 e 1989) evidenciaram efeitos gerais do meio ambiente sobre o processo reprodutivo e sobre a superovulação. Esses autores salientaram a dificuldade em medir e analisar precisamente os efeitos estacionais. Também LERNER *et al.* (1986) observaram um efeito da estação do ano no número de embriões e embriões transferíveis de doadoras coletadas nas fazendas, mas não na Central de TE, e enfatizaram a dificuldade de interpretar tais resultados. Por sua vez, GORDON (1975), CRITSER *et al.* (1980) MASSEY & ODEN (1984) e SHEA *et al.* (1984), não observaram efeito das estações do ano sobre a produção de embriões em nenhum dos grupos raciais (europeus ou zebuínos).

### **Dia do início do protocolo**

Tradicionalmente, o tratamento de superovulação é iniciado 8 a 12 dias após o estro. Dada as diferenças na dinâmica de crescimento folicular entre indivíduos, esse período pode coincidir com o início da segunda onda de crescimento folicular ou com um estágio de dominância folicular, sendo que esta última tem sido associada com uma menor resposta ao tratamento de superovulação (K0 *et al.*, 1991; ADAMS *et al.*, 1993; BUNGARTZ & NIEMANN, 1994). Conseqüentemente, a eventual eliminação do efeito da dominância folicular, pela sincronização da onda de crescimento folicular utilizando progestágenos, o tratamento de superovulação poderia resultar em um aumento da resposta ovariana ou redução dos animais que não respondem ao tratamento de superovulação (BO *et al.*, 1996). Também, os resultados do presente estudo mostraram não existir diferença em termos de produção de embriões quando o tratamento de superovulação é iniciado no meio do ciclo ou em qualquer momento do ciclo quando associado com um tratamento de progestágeno, corroborando relatos prévios de BO *et al.* (1996) em gado europeu. Esse último método, contudo, apresenta a vantagem de poder ser iniciado a qualquer momento do ciclo estral com o agrupamento das fêmeas doadoras, podendo ter implicação importante nos programas de TE, independente da idade da doadora e da dose de FSH.

## 6. CONCLUSÕES

- A idade das doadoras e o sistema de manejo (propriedade) afetam negativamente a produção e a qualidade dos embriões de vacas Nelore.
- Vacas senis (>14 anos) produzem, em média, aproximadamente 5 e 3 embriões (total e viáveis, respectivamente) a menos que vacas jovens.
- O tipo de hormônio (Pluset™, Super-Ov™, Ovagen™, FSH-P™) ou dosagem (50, 75 ou 100%) utilizada na superovulação de vacas Nelore não influencia a produção de embriões.
- A superovulação associada a um implante com progestágenos + estradiol, iniciado a qualquer momento do ciclo é tão eficiente quanto o tratamento convencional iniciado no meio do ciclo.
- A superovulação repetida por 6 ou mais vezes no mesmo animal não afeta a produção ou qualidade dos embriões.

## 7. REFERÊNCIAS

ADAMS, C.E. Effect of maternal age on ovulation, fertilization and embryonic development. In: Blandau, R.J. (Ed): **Aging Gametes**, Basel: S. Karger, A.G.,1975; pp 231-248.

ADAMS, G. P., KOT, K, SMITH, C. A., GINTHER, O. J. Selection of a dominant follicle and supresion of follicular growth in heifer. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 30, p. 259-271, 1993.

ALVAREZ, R.H. Recentes progressos na superovulação dos bovinos. **Zootecnia (Supl.)**, 32 (ún.), 3-1-, 1994.

ALVAREZ, R. H., CARVALHO, J. B. P., CARVALHO, M. I. A. B. Embriões retidos no oviduto como fator de variação na taxa final de recuperação apo lavagem uterina de vacas superovuladas. **B. industr. Anim.** v. 56, n. 1, p. 89-93, 1999.

ARCHBALD, L.F. Ovarian response in the cow to pregnant mare's serum gonadotropin and prostaglandin F2 $\alpha$ . **Theriogenology**, v. 85, n. 9, 1978 (abstract).

ARMSTRONG, D.T. Recent advances in superovulation of cattle. **Theriogenology**, v. 39, p. 7-23, 1993.

ARMSTRONG, D.T. Effect of maternal age on oocyte developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, p. 1303-1322, 2001.

BALL, B.A., LITTLE, T.V., WEBER, J.A., WOODS, G.L. Survival of day-4 embryos from young, normal mares and aged, subfertile mares after transfer to normal recipient mares. **J. Reprod. Fertil.**, v. 85, p. 187-194, 1989.

BASILE, J. R., CHEBEL, R. J., BASILE, L. F. Efeito da época do ano na transferência de embriões em vacas holandesas superovuladas com PMSG. **Braz. J. Res. Anim. Sci.**, v. 35, n. 6, p. 257-259, 1998.

BASTIDAS, P. R., RANDEL, R. D. Seasonal effects on embryo transfer results in brahman cows. **Theriogenology**, v. 28, p. 531-540, 1987.

BLANCHARD, D. T., FERGUNSON, J., LOVE L., TAKEDA, T., HENDERSON, B., HASLER, J., CHALUPA, W. Effect of dietary crude-protein type on fertilization and embryo quality in dairy cattle. **Anim. J. Vet. Res.**, v. 51, p. 905-908, 1990.

BO, G. A. ADAMS, G. P., PIERSON, R. A., MAPLETOFT, R. J. Effect of progestogen plus estradiol-17 beta treatment on superovulatory response in beef cattle. **Theriogenology**, v. 45, p. 897-910, 1996.

BOLAND, M. P., GOULDING, D., ROCHE, J. F. Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. **Theriogenology**, v. 35, p. 5-17, 1991.

BOLAND, M. P., LONERGAN, P., O'CALLAGHAN, D. Effect of nutrition on endocrine parameter, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1323-1340, 2001.

BREUEL, K.F., BAKER, R.D., BUTCHER, R.L., TOWNSEND, E.C., INSKEEP, E.K., DAILEY, R.A., LERNER, S.P. Effect of breed, age of donor and dosage of follicle stimulating hormone on the superovulatory response of beef cows. **Theriogenology**, v. 36, p. 241-255, 1991.

BROADBENT, P. J., TREGASKES, L. D., DOLMAN, D. F., SMITH, A. K. The effects of varying dose pattern of administration of ovine FSH on the response to superovulation in performance tested, juvenile simmental heifers. **Anim. Sci.**, v. 62, p. 181-186, 1996.

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. **J. Reprod. Fertil.**, v. 101, p. 583-591, 1994.

CARNEVALE, E.M., USON, M., BOZZOLA, J.J., KING, S.S., SCHIMITT, S.J., GATES, S.D. Comparison of oocytes from young and old mares with light and electron microscopy. **Theriogenology**, v. 51, p. 299, 1999 (abstract).

CARVALHO, J. B. P., ALVAREZ, R. H., MIGUEL, O., CARVALHO, M. I. A. B. Efeito do "priming" com FSH ou FSH-LH no início do ciclo estral sobre a resposta ovariana das vacas superovuladas. **B. industr. Anim.**, v. 57, n. 2, p. 187-191, 2000.

CHUPIN, D., COMBARNOUS, Y., PROCUREUR, R. Antagonistic effect of LH on FSH induced superovulation in cattle. **Theriogenology**, v. 21, p. 229, 1984.

CHRISTIE, W. B., NEWCOMB, R., ROWSON, L. E. A., Ovulation rate and egg recovery in cattle treated repeatedly with PMSG and PGF<sub>2α</sub>. **Vet. Rec.** v. 31, p. 281-282, 1979.

CRITSER, J. K., ROWE, M. P., DELCAMPO, M. R., GINTHER, O. J. Embryo transfer in cattle. Factors affecting superovulatory response, number of transferable embryos and length of post-treatment oestrus cycle. **Theriogenology**. v. 13, p. 397-406, 1980.

D'OCCHIO, M. J., NIASARI-NASLAJI, A., KINDER, J. E. Influence of varied progestogen treatments on ovarian follicle status and subsequent ovarian superstimulatory response in cows. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 45, p. 241-253, 1997.

DONALDSON, L. E. The effect of the age of donor cow on embryo production. **Theriogenology**, v. 21, p. 963-967, 1984<sub>a</sub>.

DONALDSON, L. E. The day of the estrus cycle that FSH is started and superovulation in cattle. **Theriogenology**, v. 22, p. 97-99, 1984<sub>b</sub>.

DONALDSON, L. E. Cattle breed as a source of variation in embryo transfer. **Theriogenology**, v. 21, p. 1013-1018, 1984<sub>c</sub>.

DONALDSON, L. E. Embryo production by super-ov and FSH-p. **Theriogenology**, v. 33, p. 214, 1990 (abstract).

DONALDSON, L. E., WARD, D. N. Superovulation in cattle. Dose response to SFH-W with or without LH contamination. **Theriogenology**, v. 23, p. 189, 1985 (abstract).

DONALDSON, L. E., WARD, D. N. Effects of luteinizing hormoneo embryo production in superovulated cows. **Veterinary Records**, v. 119, p. 625-626, 1986.

DORN, C. G., BAKER, J. F., LUNT, D. K., KRAEMER, D. C. Repeated, short interval superovulation in virgin heifers. **Theriogenology**. v. 35, p. 302, 1991.

ERICKSON, B. H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **J. Anim. Sci.**, v. 25, p. 800-805, 1966.

EVANS, A.C.O., ADAMS, G.P., RAWLINGS, N.C. Follicular and hormonal development in prepuberal heifers from 2 to 36 weeks of age. **J. Reprod. Fertil.**, v. 1-2, p. 463-47-, 1994.

GARCIA-WINDER, M., LEWIS, P.E., BRYNER, R.W., BAKER, R.D., INSKEEP, E.K., BUTCHER, R.L. Effect of age and norgestomet on endocrine parameters and production of embryos in superovulated beef cows. **J. Anim. Sci.**, v. 66, p. 1974-1981, 1988.

GONG J. G., WILMUT, I., BRAMLEY, T. A., WEBB, R. Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhance the superovulatory-response to FSH in heifers. **Theriogenology**, v. 45, n. 3, p. 611-622, 1996.

GORDON, I. Problems and prospects in cattle in cattle egg transfer. **Ir. Vet. J.**, v. 29, p. 21-30, 1975.

GORDON, I., EDWARDS, J., WILLIAMS, G. Use of serum gonadotrophin (PMS) in induction of twin-pregnancy in cows. **J. Agr. Sci.**, v. 59, n. 2, p 143-?, 1962.

GRADELA, A., MALHEIROS, R., URBINATTI, E. C., BARBOSA, J. C., ALMEIDA JR, I. L., ESPER, C. R. Influência do folículo dominante sobre a dinâmica folicular ovariana em vacas Nelore tratadas com FSH. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.37, n. 4, 2000.

GUILBAUALT, 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.

HASLER, J.F., MCCAULEY, A.D., SCHERMERHORN, E.C., FOOTE, R.H. Superovulatory responses of Holstein cows. **Theriogenology**, v. 19, p. 83-99, 1983.

HASLER, J. F. Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. **J. Dairy Sci.**, v. 75, p. 2857-2879, 1992.

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.

IETS **Manual of the International Embryo Transfer Society** .Third edition. Ed. D.A. Stringfellow & S.M. Seidel. Champaign, Ill, 1998, 173p.

KAFI, M., MCGOWAN, M R., JILLELLA, D., DAVIES, F., JOHNSTON, S., KIRKLAND, P. D. The effect of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) during follicular development on the superovulatory response of cattle. **Theriogenology**, v. 41, p. 223, 1994. (abstract).

KAFI, M.; MCGOWAN, M. R. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 48, p. 137-157, 1997.

KANITZ, W., SCHNEIDER, F. BECKER, F. Dose-response-relations after applications of FSH: Follicular growth and results of superovulation. **Archives of Animal Breeding**, v. 39, n. 4, p. 387-400, 1996.

KATSKA, L., SMORAG, Z. Number and quality of oocytes in relation to age of cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 7, p. 451-46-, 1984.

KELLY, P., DUFFY, P., ROCHE, J. F., BOLAND, M. P. Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. **Anim. Reprod. Sci.** v. 46, p. 1-14, 1997.

KIM, I. H., SON, D. S., LEE, H. J., LEE, D. W., SEO, K. H., RYU, I. S., YANG, B. C., LEE K. W., KO, M. S. Factors affecting on production of dairy cattle embryos. **Korean J. Emb. Trans.**, v. 12, n. 1, p. 103-110, 1997<sub>a</sub>.

KIM, H. R., KIM, D. I., PARK, C. J., KIM, C. K., CHUNG, Y. C., LEE, J. W. Studies on in vivo embryo production by FSH-P<sup>®</sup> and SUPER-OV<sup>®</sup> in Korean native cattle III. The factors influencing in vivo embryo production on days and seasons of flushing. **Korean J. Emb. Trans.**, v. 12, n. 1, p. 57-65, 1997<sub>b</sub>.

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

LERNER, S. P.; THAYNE, W. V.; BAKER, R. D.; HENSCHEN, T.; MEREDITH, S.; INSKEEP, E. K.; DAILY, R. A.; LEWIS, P.A. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. **J. Anim. Sci.**, v. 63, p. 176-183, 1986.

LIM, A.S.T, TSKOK, M.F.H. Age-related decline in fertility: a link to degenerative oocytes?. **Fertil. Steril.**, v. 68, p. 265-271, 1997.

LINDSELL, C. E., RAJKUMAR, K., MANNING, A. W., EMERCY, S. K. MAPLETOFT, R. J., MURPHY, B. D. Variability in FSH-LH ratio among batches of commercially available gonadotrophins. **Theriogenology**, v. 25, p. 167, 1986 (abstract).

LUBBADEH, W. F., GRAVES, C. N., SPAHR, S. L. Effect of repeated superovulation on ovulatory response of dairy cows. **J. Anim. Sci.** v. 50, p. 124-127, 1980.

MANIK, R. S., SINGLA, S. K., PALTA, P., MADAN, M. L. Ovarian follicular populations prior to and during superovulation in cattle: Relationship with superovulatory response. **Asian-Australian J. Anim. Sci.**, v. 11, n. 5, p. 486-490, 1998.

MASSEY, J. M., ODEN, A. J. No seasonal effect on embryo donor performance in southwest region of USA. **Theriogenology**. v. 21, p. 196-217, 1984.

MEUWISSEN, T. H. E. Optimizing pure line breeding strategies utilizing reproductive technologies. **J. Dairy Sci.**, v. 81, p. 47-54, Suppl. 2, 1998.

MONNIAUX, D., CHUPIN, D., SAUMANDE, J. Superovulatory responses of cattle. **Theriogenology**., v. 19, p. 55-81, 1983.

MORAES, G. V. **Avaliação quali-quantitativa da transferência de embriões em bovinos de MS**. 1990. 170 f. Thesis (Produção Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1990.

MURPHY, B. D., MAPLETOFT, R. J., MANNS, J., HUMPHREY, W. D. Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. **Theriogenology**. v. 21, p. 117-125, 1984.

NELSON, B. D., SEIDEL, G. E., ELSDEN, R. P. Superovulation of cows using follicle stimulating hormone and prostaglandin F2. **Theriogenology**. v. 11, p. 104, 1979.

NEWCOMB, R.; ROWSON, L.E.; TROUNSON, A.O. The Sacrewell project: an on farm demonstration of the potential of egg transfers. **Veterinary Records**, v. 1-3, p. 415-418, 1978.

OLIVEIRA, M.A. L., ANDRADE, J. C. O., LIMA, P. F., SANTOS FILHO, A. S., GUIDO, S. I., CAVALCANTI NETO, C. C., TENORIO FILHO, F., OLIVEIRA, L. R. S. Influencia da idade sobre a resposta superovulatória de doadoras Nelore. Resultados preliminares. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 26, p.246-248, 2002.

PIERSON, R. A., GINTHER, O. J. Follicular populations during the oestrus cycle in heifers. I. Influence of day. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 14, p. 165-176, 1987.

PUTNEY, D. J., MALAYER, J. R., HANSEN, P. J., THATCHER, W. W. Effect of heat-shock on protein-synthesis and secretion by bovine blastocysts and uterine endometrium. **Federation Proceedings**. v. 46, n. 3, p: 357-357, 1987.

PUTNEY, D. J., MULLINS, S., THATCHER, W. W., DROST, M., GROSS, T. S. Embryonic-development in superovulated dairy-cattle exposed to elevated ambient-temperatures between the onset of estrus and insemination **Anim. Reprod. Sci.**, v.19, n. 1-2, p, 37-51, 1989.

ROBERTS, A. J., GRIZZLE, J. M., ECHTERNKAMP, S. E. Follicular development and superovulation response in cows administered multiple FSH injections early in the oestrous cycle. **Theriogenology**, v. 42, p. 917-929, 1994.

ROMERO, A., ALBERT, J. BRINK, Z., SEIDEL, G. E. Jr. Number of small follicles in ovaries after superovulation response in cattle. **Theriogenology**, v. 35, p. 265, 1991. (abstract).

SAS/STAT User's Guide, 1990. Volume 2, **GLM-VARCOMP**, Version 6, 4th edn. SAS Institute Inc., Cary, NC, pp. 891-996.

SAUER, M.V. The impact of age on reproductive potential: lessons learned from oocyte donation. **Maturitas**, v. 3-, p.221-225, 1998.

SAUMANDE, J., CHUPIN, D., MARIAN, J. C., ORTAVANT, R., MAULEON, P. Factors affecting the variability of ovulation rates after PMSG stimulation. In: Sreenan, J. M. (ed.) **Control of Reproduction in the Cow**. Martinus Nijhoff, The Hague, 1978, pp. 195-224.

SAVIO, J. D., BONGRS, H., DROST, M., LUCY, M. C., THATCHER, W. W. Follicular dynamics and superovulatory response in Holstein cows treated with FSH-P in different endocrine states. **Theriogenology**, v. 35, p. 915-929, 1991.

SHEA, B. F., JANZEN, R. E., MC DERMAND, D. P. Seasonal variation in response to stimulation and related embryo transfer procedures in Alberta over a nine year period. **Theriogenology**, v. 21, p. 186-195, 1984.

SIDDIQUI, M. A. R., SHAMSUDDIN, M., BHUIYAN, M. M. U., AKBAR, M. A., KAMARUDDIN, K. M. Effect of feeding and body condition score on multiple ovulation and embryo production in zebu cows. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 37, n. 1, p. 37-41, 2002.

SIROIS, J., FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dynamics during the oestrus cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biol. Reprod.**, v. 39, p. 308-317, 1988.

TALBERT, G.B., KRHON, P.L. Effect of maternal age on viability of ova and uterine support of pregnancy. **J. Reprod. Fertil.**, v. 11, p. 399-4-6, 1966.

TONHATI, H., LOBO, R. B., OLIVEIRA, H. N. Repeatability and heritability of response to superovulation in Holstein cows. **Theriogenology**, v. 51, p. 1151-1156, 1999.

TOTEY, S. M., SINGH, G., TANEJA, M., PAWSHE, C. H., SINGH, G, CHILLAR, R. S. Effect of season on superovulation and embryo recovery in Sahiwal and crosses of Holstein x Sahiwal donor cows. **Indian J. Anim. Reprod.**, v. 12, p. 179-181, 1991.

VISINTIN, J. A., ARRUDA, R. P., MADUREIRA, E. H., MIZUTA, K., CELEGHINI, E. C. C., ASSUMPÇÃO, M. E. O. D., GUSMÕES, P. P. G., CANDINI, P. H. Superovulation of Nelore heifers with different FSH/LH doses and embryo freezing by *one-step* method with ethylene-glycol. Braz. **J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.36, n.5, 1999.

WICHMANN, V. **Investigations of environmental and genetic effects on the suitability of donor cows for embryo transfer.** PhD Thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany, 1990. 97 pp.

YAAKUB, H., O'CALLAGHAN, D., BOLAND, M. P. Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. **Theriogenology**, v.51, p. 1259-1266, 1999.

## **APÊNDICE**

## APÊNDICE A

### DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA EM MICRO-REGIÕES DAS PROPRIEDADES

As propriedades estão distribuídas em micro-regiões de Mato Grosso do Sul com as seguintes características:

1. Micro-região de Três Lagoas (propriedade 02 – Latitude 20° 39' 43,4" Sul / Longitude 51° 47' 28,9" Oeste; propriedade 04 – Latitude 20° 48' 16,0" Sul / Longitude 51° 39' 45,9" Oeste; propriedade 05 – Latitude 20° 57' 25,0" Sul / Longitude 51° 31' 52,9" Oeste), solo do tipo Latossolo vermelho escuro muito utilizado para pastagens cultivadas e culturas anuais; a aptidão da terra para pastagens plantadas; temperatura média anual de 23° C. Clima úmido a sub-úmido apresentando índice efetivo de umidade com valores anuais variando de 20 a 40. A precipitação pluviométrica anual varia entre 1.500 a 1750 mm anuais, excedente hídrico durante 5 a 6 meses e deficiência durante 5 meses.
2. Micro-região de Campo Grande (propriedade 01 – Latitude 20° 41' 49,0" Sul / Longitude 54° 32' 59,2" Oeste), solo do tipo Latossolo vermelho escuro muito utilizado para pastagens cultivadas e culturas anuais; a aptidão agrícola da terra é para pastagens plantadas; temperatura média anual de 22° C. Clima úmido a sub-úmido apresentando índice efetivo de umidade com valores anuais variando de 20 a 40. A precipitação pluviométrica anual varia entre 1.500 a 1750 mm anuais, excedente hídrico durante 5 a 6 meses e deficiência durante 5 meses.
3. Micro-região de Iguatemi (propriedade 03 – Latitude 23° 22' 54,5" Sul / Longitude 54° 35' 10,0" Oeste), solo do tipo Latossolo vermelho escuro e Podzólico vermelho escuro muito utilizado para pastagens cultivadas e culturas anuais; a aptidão agrícola da terra é restrita para lavoura com qualquer implementação agrícola;

temperatura média anual de 21° C. Clima úmido apresentando índice efetivo de umidade com valores anuais variando de 40 a 60. A precipitação pluviométrica anual varia entre 1750 a 2.000 mm anuais, excedente hídrico durante 7 a 8 meses e deficiência hídrica durante 3 meses.

4. Micro-região de Bodoquena (propriedade 06 – Latitude 20° 24' 58,6" Sul / Longitude 56° 30' 42,8" Oeste), solo do tipo Regossolo; a aptidão agrícola da terra é regular para pastagens plantadas; temperatura média anual de 23° - 24° C. Clima sub-úmido apresentando índice efetivo de umidade com valores anuais variando de 0 a 20. A precipitação pluviométrica anual varia entre 1.200 a 1.500 mm anuais, excedente hídrico durante 3 a 4 meses e deficiência hídrica durante 5 meses.

Fonte:

Atlas Multirreferencial – 1990

Estado de Mato Grosso do Sul

Secretaria de Planejamento e Coordenação Geral

Convênio Governo do Estado / Fundação IBGE

**IAGRO** – DEPARTAMENTO ESTADUAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA DE MATO GROSSO DO SUL. / ESCRITÓRIO REGIONAL DE AQUIDAUANA